

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL HIPOLIPEMIANTE
DE ALGUMAS CHALCONAS SINTÉTICAS UTILIZANDO
DIFERENTES MODELOS EXPERIMENTAIS**

Mestranda: Lorena dos Santos

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Rozangela Curi Pedrosa

**Florianópolis
2003**

**“AVALIAÇÃO DO POTENCIAL HIPOLIPEMIANTE
DE ALGUMAS CHALCONAS SINTÉTICAS UTILIZANDO
DIFERENTES MODELOS EXPERIMENTAIS”**

POR

LORENA DOS SANTOS

**Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Farmácia como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre em
Farmácia.**

**Orientadora: Prof.^a Dr.^a Rozangela
Curi Pedrosa**

**Florianópolis
2003**

Dedico este trabalho aos mestres Prof.^a Dr.^a Rozangela Curi Pedrosa e Prof. ^o Msc. Rogério Corrêa que foram responsáveis não somente pelo despertar da curiosidade científica, mas principalmente pelo Dom de analisar e produzir conhecimento.

AGRADECIMENTOS

À Prof.^a Dr.^a Rozangela Curi Pedrosa, com muito carinho, pela orientação, dedicação e carisma com que esteve presente neste período de trabalho.

Aos Prof.^{es} componentes da banca examinadora Dr. Ricardo J. Nunes, por sua cordialidade, atenção e disponibilidade na avaliação deste trabalho; Dr. Valdir Cechinel Filho por aceitar mais uma vez fazer parte de um momento importante de minha vida; e as Prof.^{as} Dr.^a Regina A. Vasconcelos e a Dra. Liliete C. de Souza, pelo auxílio na avaliação deste trabalho.

Ao Prof.^o Msc. Rogério Corrêa, bem como ao NIQFAR por ter gentilmente concedido a utilização dos compostos sintetizados previamente em nosso projeto de pesquisa e meu trabalho de conclusão do curso de farmácia na UNIVALI no ano 2000.

Ao programa de pós graduação em farmácia, em especial a Prof.^a Dr.^a Tânia Pasa coordenadora do programa pela competência com que desempenha seu trabalho, e a CAPES pela bolsa fornecida nos últimos seis meses de trabalho.

Aos professores Dr.^a Tânia Pasa, Msc. Carla, Dr. Mauro Laranjeiras e Dr. Valfredo Fávere pela forma solícita com que nos acolheram em seus laboratórios.

Ao Prof.^o Dr. Rosendo A. Yunes, por suas considerações e sugestões sobre a relação estrutura-atividade dos compostos testados.

Aos queridos colegas de laboratório, Jean, Gizele, Jussara, Flávia, Daiane, Eduardo, Rubia, Patrícia, Gisele, Débora pelo companherismo e partilhas.

Aos companheiros de mestrado, em especial, a Luís F. de Oliveira, Reginaldo Geremias, Tatiana Schoenfelder, Graziella E. Ronsein, Aline Cláudia de Mello e Patrik O. Rodrigues, pela convivência mais próxima, trouxeram-me muita satisfação e exemplo.

À Salete, por sua dedicação e zelo com que desempenha suas funções, e especial atenção aos usuários do laboratório de prática experimental animal.

À Márcia, por sua valiosa ajuda com a diagramação dos espectros de RMN-¹H.

Em especial a meus pais e minha irmã, que não mediram esforços para acompanhar este sonho, pela presença contínua e amor incondicional iluminando meu caminho, assim como aos amigos e familiares pela torcida e encorajamento.

A Deus, acima de tudo por Ser presença constante nesta caminhada em busca de novos horizontes.

*" De tudo ficam três coisas:
a certeza de que
estou apenas começando, a certeza
de que é preciso
continuar e a certeza de que
podemos ser
interrompidos antes de terminar.
Fazer da
interrupção um caminho novo, fazer
da queda um passo
de dança, do medo uma escada, do
sonho uma ponte e
da procura um encontro.*

*E assim...terá valido a
pena existir"*

Fernando Sabino.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	viii
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	01
1.1 ATEROSCLEROSE.....	02
1.1.1 Conceito	02
1.1.2 Incidência, aspectos econômicos e epidemiológicos	03
1.1.3 Considerações quanto aos fatores de risco.....	04
1.1.4 Aterogênese	05
1.1.5 Colesterol e aterosclerose	08
1.1.6 Lipoproteínas e aterosclerose	10
1.2 HMG-CoA REDUTASE E LIPOPROTEÍNA LIPASE	15
1.2.1 HMG-CoA redutase	15
1.2.2 Lipoproteína lipase.....	19
1.3 TERAPÊUTICA DAS DISLIPIDEMIAS	21
1.3.1 Principais fármacos utilizados no tratamento das dislipidemias.....	22
1.3.2 Novos alvos terapêuticos.....	28
1.4 CHALCONAS	30
1.4.1 Efeitos biológicos.....	31
1.5 JUSTIFICATIVA	37
2 OBJETIVOS	38
2.1 Objetivo geral	38
2.2 Objetivos específicos.....	38
3. METODOLOGIA	39
3.1 Síntese de chalconas e derivados di-bromados avaliados.....	39
3.1.1 Mecanismo geral de reação da síntese de chalconas.....	41
3.1.2 Mecanismo de reação da síntese dos derivados di-bromados.....	44
3.2 Caracterização química dos compostos sintetizados	45
3.3 Ensaios biológicos com algumas chalconas sintetizadas.....	47
3.3.1 Materiais	47
3.3.2 Animais.....	47
3.3.3 Modelo hiperlipemia induzida pela administração de Triton WR 1339.....	48
3.3.3.1 Protocolo experimental	48
3.3.3.2 Análises bioquímicas	49
3.3.3.2.1 Determinação do colesterol total	49
3.3.3.2.2 Determinação de triglicérides	50
3.3.3.2.3 Determinação do colesterol da HDL	50
3.3.4 Modelo de hiperlipemia induzida pela dieta hipercalórica.....	50
3.3.4.1 Protocolo experimental.....	51
3.3.4.2 Análises bioquímicas do tecido hepático	52

3.3.4.3 Análises bioquímicas séricas.....	52
3.4 Análise estatística.....	53
4. RESULTADOS	54
4.1 Síntese das chalconas e seus derivados sintetizados.....	54
4.2 Caracterização química das chalconas e seus derivados sintetizados	55
4.2.1 Caracterização pelos métodos de espectroscopia de IV e ponto de fusão.....	55
4.2.2 Caracterização pelo método de espectroscopia de RMN ¹ H.....	59
4.3 Ensaio biológicos com as chalconas avaliadas	65
4.3.1 Hiperlipidemia induzida por Triton WR 1339	65
4.3.1.1 Concentração sérica de colesterol total e colesterol da HDL	65
4.3.1.2 Concentração sérica de triglicérides.....	71
4.3.2 Hiperlipemia induzida pela dieta hipercalórica.....	76
4.3.2.1 Concentração sérica de colesterol total.....	76
4.3.2.2 Concentração sérica de triglicérides.....	80
4.3.2.3 Concentração sérica de colesterol da HDL	83
4.3.2.4 Concentração sérica de colesterol da LDL	86
4.3.2.5 Concentração sérica de colesterol da VLDL.....	89
4.3.2.6 Índice anti-aterogênico (IAA) das chalconas testadas.....	92
4.3.2.7 Concentração hepática de colesterol total e triglicérides	93
5.DISSCUSSÃO	95
PARTE I – ESTUDOS QUÍMICOS	95
PARTE II – ESTUDOS BIOLÓGICOS	100
5.1 Atividade hipocolesterolêmica	100
5.2 Atividade hipotrigliceridêmica	116
6 CONCLUSÕES	124
7 PERSPECTIVAS	126
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	128
ANEXOS	147
I - Espectros RMN ¹ H obtidos para caracterização de 14 chalconas.....	147
III - Certificado de credenciamento com a CEUA/PRPG-UFSC.....	155
IV - Co-autoria em artigo publicado.....	156

LISTA DE ABREVIATURAS

AMP-cíclico – adenosina monofosfatada cíclica
Apo – apoproteína
ATP – adenosina trifosfato
Br - bromo
CEPT – proteína de transferência de colesterol esterificado
CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais
-CH₃- metil
-Cl - cloro
CPK ou PKC – proteína quinase C
d - duplete
DHA - ácido
DMSO-d₆ – dimetilsulfóxido-hexadeuterado
EPA – ácido graxo poliinsaturado
EPM – erro padrão da média
FADH – flavina-adenina dinucleotídeo
GST – glutationa S-transferase
HDL – lipoproteína de alta densidade
HMG-CoA redutase – hidróxi-metil-glutaril coenzima A redutase
Hz - Hertz
IAA – índice anti-aterogênico
IDL – lipoproteína de densidade intermediária
i.p. – intra-peritoneal
IV – infra-vermelho
J – constantes de acoplamento
LCAT – lecitina colesterol acil transferase
LDL – lipoproteína de baixa densidade
LP – lipoproteína-lipase
Lp (a) – lipoproteína (a)
LPS – lipopolissacarídeo

m – multiplete

NADH – nicotinamida-adenina dinucleotídeo

-N(CH₃)₂ – dimetilamino

-NO₂ - nitro

NOS – óxido nítrico sintetase

-OCH₃ – metoxila

-OH - hidroxila

OMS – Organização Mundial da Saúde

ox-LDL – lipoproteína de baixa densidade oxidada

ppm – partes por milhão

RMN ¹H – ressonância magnética nuclear de próton

rpm – rotações por minuto

s - singlete

TG - triglicérides

TGO – transaminase oxaloacética

TGP – transaminase pirúvica

TMS - tetrametilsilano

UV – ultra-violeta

VLDL – lipoproteína de densidade muito baixa

v.o. – via oral

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Divisão das chalconas sintéticas de acordo com as substituições nos anéis.....	45
Tabela 2. Concentrações em $\mu\text{mol/Kg}$ dos compostos utilizados nos tratamentos.....	48
Tabela 3. Composição e cronograma da dieta hipercalórica.....	51
Tabela 4. Rendimentos das chalconas e seus derivados sintetizados.....	54
Tabela 5. Variação dos deslocamentos de H8 e H7, para os compostos C13-C19.....	64
Tabela 6. Variação dos deslocamentos de H7-8 e H9-10, para os compostos C11-C12...	64
Tabela 7. Concentrações séricas CT/Col. da HDL, do grupo 1, no modelo Triton.....	64
Tabela 8. Concentrações séricas CT/Col. da HDL, do grupo 2, no modelo Triton.....	68
Tabela 9. Concentrações séricas CT/Col. da HDL, do grupo 3, no modelo Triton.....	70
Tabela 10. Concentrações séricas de triglicérides, do grupo 1, no modelo Triton.....	71
Tabela 11. Concentrações séricas de triglicérides, do grupo 2, no modelo Triton.....	73
Tabela 12. Concentrações séricas de triglicérides, do grupo 3, no modelo Triton.....	75
Tabela 13. Índice anti-aterogênico calculado, compostos C1, C3, C10.....	92
Tabela 14. Classificação por faixas de redução (%) CT, Triton WR 1339.....	101
Tabela 15. Classificação por faixas de redução (%) CT, dieta hipercalórica.....	107
Tabela 16. Classificação por faixas de redução (%) Col. da LDL, dieta hipercalórica.....	114
Tabela 17. Classificação por faixas de redução (%) triglicérides, Triton WR 1339.....	116
Tabela 18. Classificação por faixas de redução (%) triglicérides, dieta hipercalórica.....	119
Tabela 19. Classificação por faixas de redução (%) Col. da VLDL, dieta hipercalórica...	121

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Biossíntese do colesterol.....	17
Figura 2. Estrutura química geral dos flavonóides e das chalconas.....	30
Figura 3. Estrutura química de compostos com atividade antiviral	33
Figura 4. Estrutura química da Licochalcona A.....	34
Figura 5. Rota sintética e substituintes dos anéis A e B das chalconas sintetizadas.....	39
Figura 6. Estrutura geral e substituintes do anel A das chalconas C11, C12, C20.....	40
Figura 7. Mecanismo reacional para síntese das chalconas.....	41
Figura 8. Substituintes dos anéis aromáticos A e B das 17 chalconas sintetizadas.....	42
Figura 9. Estrutura geral e substituintes do anel A das chalconas C11, C12, C20.....	43
Figura 10. Rota sintética e substituintes dos anéis dos derivados di-bromados	43
Figura 11. Mecanismo reacional para síntese dos derivados di-bromados.....	44
Figura 12. Numeração utilizada na identificação dos principais ¹ H das chalconas.....	61
Figura 13. Numeração utilizada na identificação das chalconas com duplas conjugadas.....	62
Figura 14. Numeração utilizada na identificação dos ¹ H dos derivados bromados.....	63
Figura 15. Concentrações séricas de CT, do grupo 1, no modelo dieta hipercalórica.....	76
Figura 16. Concentrações séricas de CT, do grupo 2, no modelo dieta hipercalórica.....	77
Figura 17. Concentrações séricas de CT, do grupo 3, no modelo dieta hipercalórica.....	79
Figura 18. Concentrações séricas de TG, do grupo 1, no modelo dieta hipercalórica.....	80
Figura 19. Concentrações séricas de TG, do grupo 2, no modelo dieta hipercalórica.....	81
Figura 20. Concentrações séricas de TG, do grupo 3, no modelo dieta hipercalórica.....	82
Figura 21. Concentrações séricas de Col. da HDL, grupo 1, modelo dieta hipercalórica.....	83
Figura 22. Concentrações séricas de Col. da HDL, grupo 2, modelo dieta hipercalórica.....	84
Figura 23. Concentrações séricas de Col. da HDL, grupo 3, modelo dieta hipercalórica.....	85
Figura 24. Concentrações séricas de Col. da LDL, grupo 1, modelo dieta hipercalórica.....	86
Figura 25. Concentrações séricas de Col. da LDL, grupo 2, modelo dieta hipercalórica.....	87
Figura 26. Concentrações séricas de Col. da LDL, grupo 3, modelo dieta hipercalórica.....	88
Figura 27. Concentrações séricas de Col. da VLDL, grupo 1, modelo dieta hipercalórica.....	89
Figura 28. Concentrações séricas de Col. da VLDL, grupo 2, modelo dieta hipercalórica.....	90
Figura 29. Concentrações séricas de Col. da VLDL, grupo 3, modelo dieta hipercalórica.....	91
Figura 30. Concentrações hepáticas de CT e TG, no modelo dieta hipercalórica.....	94
Figura 31. Estrutura geral das chalconas e seus isômeros cis e trans.....	95
Figura 32. Estrutura geral das chalconas e seus isômeros Z e E.....	96
Figura 33. Estruturas da HMG-CoA, estatinas do tipo I e do tipo II.....	104

RESUMO

Diversas evidências epidemiológicas demonstram a íntima associação das dislipidemias com aterosclerose e doenças cardiovasculares. As chalconas são cetonas aromáticas α , β -insaturadas e, alguns compostos representativos desta classe têm demonstrado uma infinidade de bioatividades; dentre elas as propriedades citoprotetoras, esteroideogênicas e antioxidantes já relatadas apontam para a possibilidade destas substâncias estarem envolvidas com a inibição do metabolismo esteróico. Com o intuito de avaliar o potencial hipolipemiante e fazer possíveis correlações entre a estrutura química e a atividade biológica, algumas chalconas foram previamente sintetizadas e caracterizadas através de técnicas espectrométricas (RMN ^1H e IV) e posteriormente utilizadas em dois modelos de “screening” bioquímico para a avaliação do potencial hipolipemiante de novos fármacos: tratamento com Triton WR 1339 e dieta hipercalórica. Nestes experimentos foi administrado aos animais 2,5 mmol/Kg de lovastatina ou 14-20 mmol/Kg das chalconas (v. o.). Após o término de cada tratamento, o perfil lipídico sérico e/ou tecidual foi determinado. Todos os resultados foram expressos em termos de média \pm EPM, n=6. Os resultados de RMN ^1H confirmam as estruturas propostas, sugerindo encontrarem-se na configuração *E*, provavelmente, devido a maior estabilidade conformacional. O efeito hipolipemiante foi verificado para as 17 chalconas e 4 derivados bromados em relação a lovastatina e, este efeito foi particularmente importante para os compostos C3 e C10. Estes efeitos sugerem que a ação destes compostos esteja voltada para: (i) inibição da síntese de colesterol; (ii) diminuição da absorção intestinal de lipídeos; (iii) regulação, provavelmente através de receptores, do catabolismo da lipoproteína LDL e; (iv) ativação da metabolização de triglicérides. Uma análise preliminar da relação estrutura-atividade dos compostos avaliados permite observar que a atividade hipolipemiante parece exigir distintos fatores estruturais: substituintes aromáticos halogenados (-Cl e -Br) tendem a aumentar a atividade, assim como substituintes desativadores (-NO₂) na posição 4 do anel aromático B, no entanto, a presença de duplas conjugadas entre os anéis, assim como substituintes aromáticos ativadores (-CH₃) tendem a diminuir a atividade hipoglicemiante, com algumas exceções para a atividade hipotrigliceridêmica.

ABSTRACT

EVALUATION OF HYPOLIPAEMIC ACTIVITY OF SOME SYNTHETIC CHALCONES USING DIFFERENT EXPERIMENTAL MODELS

Key words: synthetic chalcones, cholesterol, hypolipaemic activity. Extensive epidemiological evidence attests to the intimate association of dyslipidemia with atherosclerosis and cardiovascular diseases. Chalcones are α , β -unsaturated ketones and, several of these compounds have demonstrated different bioactivities, such as cytopreventive, estrogenic and antioxidative properties, which increase in these compounds the possibility of involvement with the sterolic metabolism. The main aim of this study was to synthesize some chalcones, which were characterized by spectroscopy methods (^1H NMR and IR) and evaluating their interference in the synthesis of cholesterol. A model Triton WR 1339 and a hypercaloric diet of 30 days were used as biochemical screening models for hypolipidemic agents. Were administrated to the animals 2,5 mmol/Kg of lovastatin or 14-20 mmol/Kg of chalcones derivatives (v. o.). After the end of each treatment, the lipid profile was analyzed. All the values were mean \pm SEM, $n=6$, $P<0.05$ were considered significant in the statistical analysis. The ^1H NMR analysis recognized the most important protons of chalconic skeleton and suggests that two protons attached to double bound carbons are enantiomers, because of this compounds conformational stability. Hypolipaemic effects were determined for 16 chalcones and 4 derivatives compounds in comparison with lovastatin. The results showed that chalcones C3 and C10 exhibited the most promising effects. These results suggest that its mode of action may be related to: (i) inhibition of the cholesterol synthesis; (ii) decrease in the intestinal absorption of lipids; (iii) regulation, probably through receptors, catabolism of the LDL lipoprotein and; (iv) activation of the triglycerides metabolism. Regarding to the chemical characteristics, the hypocholesterolemic effects of the active chalcones appear to have distinct structural features: halogenated substituents (-Cl and -Br) in both aromatic rings and the presence of electrodrawing group (NO_2) in position 4 of the aromatic ring increased this activity, whereas the presence of electrodonator substituents in aromatic ring decreased the biological activity, such as conjugated double bound between the benzenic rings, with some exception for triglycerides lower activity.

1. INTRODUÇÃO

Dados epidemiológicos demonstram que a incidência de doenças cardiovasculares em países ocidentais é considerada elevada (BROWA, 2000). No Brasil, segundo as III Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia (2001), a doença aterosclerótica é a principal causa de morte na população de meia idade. A aterosclerose é o principal processo anatomo-patológico que conduz a doenças cardiovasculares, uma doença multifatorial, que envolve lesão arterial, a qual pode provocar cardiopatia isquêmica, infarto do miocárdio e acidentes vasculares, cuja prevenção passa pela identificação e controle, não só das dislipidemias, mas do conjunto de fatores de risco (LEESON, WHINCUP, COOK *et al.*, 2000).

Os estudos genéticos, experimentais, clínicos e epidemiológicos têm demonstrado uma associação positiva entre as dislipidemias e a mortalidade e morbidade cardiovasculares, sendo estas as correlações mais consistentes e bem estabelecidas de todas as áreas da epidemiologia (YOSHIDA, BOSCO, MEDEIROS *et al.*, 2003). Vários distúrbios genéticos e adquiridos podem vir a influenciar as vias endógenas e exógenas do metabolismo lipídico, resultando em dislipidemias e predispondo ao desenvolvimento de aterosclerose (CHUN, MIN, PARK *et al.*, 1999).

Por outro lado, o processo de desenvolvimento de fármacos incorporou profundas transformações no decorrer da última década, particularmente, as mudanças voltadas ao tratamento das dislipidemias ganharam especial destaque, devido a grande incidência de mortalidade nos pacientes. Com os avanços da ciência experimental, inúmeros processos biológicos foram identificados, fornecendo assim novos alvos macromoleculares passíveis de intervenção terapêutica. A resposta a esta demanda crescente por substâncias estruturalmente inovadoras para a avaliação farmacológica estabeleceu um novo paradigma na busca por compostos-protótipo e na otimização dos já existentes. Sabe-se hoje, que mais de 50% dos fármacos disponíveis no mercado são oriundos de processos de síntese orgânica, sendo que muitos dos avanços nesta área, se referem a capacidade de produção e diversidade dos medicamentos produzidos (DIAS, CORRÊA, 2001). Dentro

deste contexto, o presente trabalho se propôs a avaliar o potencial anti-lipemiante de um grupo de chalconas sintéticas, com o objetivo de trabalhar novas alternativas no manejo das dislipidemias.

1.1 ATEROSCLEROSE

1.1.1 Conceito

Aterosclerose é uma terminologia empregada para descrever um processo dinâmico, evolutivo, que ocorre a partir de um dano endotelial de origem multifatorial, com características de reparação tecidual, em que ocorre o espessamento e endurecimento das lesões nas artérias musculares de grande e médio calibre (como as carótidas, artérias dos membros inferiores, coronárias e vasos do polígono de Willis) e, nas artérias elásticas tais como aorta e ilíacas. Esta terminologia é usada em contraposição com o termo arteriosclerose que seria um termo genérico para descrever o espessamento e endurecimento de todos os tipos de vasos sanguíneos, ou seja, o processo aterosclerótico leva a arteriosclerose (LUZ, 2001; ROSS, 1999).

As palavras aterosclerose e ateroma, que descrevem com perfeição a natureza anatomopatológica das lesões ateroscleróticas típicas, provém da junção dos vocábulos gregos, *athere*, *oma* e *skleros*, que significam, respectivamente, gordura, massa e dura. Os estudos mais recentes confirmam o clássico conceito de VIRCHOW (1856) citado por SILVA (1993), que a doença aterosclerótica tem características de uma doença inflamatória crônica da parede das artérias, fruto de uma excessiva resposta inflamatória e fibroproliferativa da parede vascular a uma grande série de possíveis fatores hostis, um processo que, na sua base, tem objetivos protetores e regenerativos.

Embora clinicamente classificada como uma doença sistêmica, a doença aterosclerótica não ocorre aleatoriamente na árvore vascular mas sim, nas chamadas áreas de predileção, estrutural e funcionalmente diferentes da restante superfície

endotelial. Natural e independentemente de todos os fatores causais da doença aterosclerótica, as razões condicionantes da localização das áreas de predileção, têm uma importância central na patogênese da aterosclerose, a qual torna-se dependente de fenômenos exclusivamente hemodinâmicos. A dinâmica do fluxo sanguíneo é responsável pela escolha das zonas que serão preferencialmente afetadas, uma vez que toda a árvore vascular está sujeita a fatores de risco de um modo sensivelmente igual. Os segmentos proximais das artérias coronárias constituem uma dessas áreas de predileção em humanos (SILVA, GASPAR, GONÇALVES, 1999; SPIROS, FRANGOS, GAHTAN *et al.* 1999; DROUET, 2002; NAVA, 2002).

1.1.2 Incidência, aspectos econômicos e epidemiológicos

As enfermidades cardíacas degenerativas, sobretudo, a aterosclerose, são apresentadas hoje, como as doenças de maior índice de mortalidade no mundo. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), somente no ano 2001, os dados epidemiológicos para esta enfermidade atingiram o valor de 52% da população mundial, seguidos de 24% para o câncer, 19% para doenças infecto-contagiosas, 14% para doenças pulmonares e, 5% para AIDS (ARQUIVOS BRASILEIROS DE CARDIOLOGIA, 2001).

Os custos do gerenciamento das doenças aterotrombóticas são dramáticos para pacientes, sistema de saúde e para a sociedade como um todo. A hospitalização e gastos com manutenção dos cuidados com a saúde (gastos diretos) e a perda de produtividade que a superlotação hospitalar vem a sofrer (custos indiretos), são os principais fatores que aumentam a demanda financeira necessária para redução dos riscos destas doenças à população (PEETERS, MAMUN, WILLEKENS, *et al.*, 2002; PAYNE, HUYBRECHTS, CARO, *et al.*, 2002).

O panorama nacional, assim como têm ocorrido em outros países em desenvolvimento, permite observar uma tendência de elevação nas projeções das doenças cardiovasculares, agravando ainda mais o quadro de morbidade e mortalidade, já elevadas nos países em desenvolvimento. No Brasil, o ônus econômico das doenças

cardiovasculares tem crescido exponencialmente nas últimas décadas (LESSA, MENDONÇA, TEIXEIRA, 1996). Em 2000, as doenças cardiovasculares foram responsáveis pela principal alocação de recursos públicos em hospitalização (aproximadamente R\$ 821 milhões), e foram a terceira causa de permanência hospitalar prolongada (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003).

Não existem dúvidas de que as seqüelas clínicas da aterosclerose representam uma cifra expressiva dos gastos em saúde. Entretanto, baseado em resultados de inúmeros ensaios clínicos randomizados, existem evidências concretas de que a redução de alguns fatores de risco, como o colesterol, por exemplo, pode diminuir significativamente muito destes eventos (LESSA, MENDONÇA, TEIXEIRA, 1996). Através de metodologias sistemáticas, podemos estimar as relações custo-efetividade para os diferentes manejos das dislipidemias e identificar subgrupos com maior impacto para a adoção de estratégias preventivas. Caso estas medidas efetivas não sejam tomadas, prevê-se uma verdadeira epidemia de doença cardiovascular com conseqüências desastrosas para a saúde pública, de forma relativamente rápida e substancial para os países em desenvolvimento, dentre os quais o Brasil é um dos representantes (AVEZUM, DUNCAN, 2001).

1.1.3 Considerações quanto aos fatores de risco

O risco de doença aterosclerótica pode ser avaliado baseando-se na análise conjunta de características e situações que podem aumentar as chances de um indivíduo desenvolver a doença; o que em geral, ocorre ao longo dos anos, de maneira acumulativa até o aparecimento da sintomatologia ou identificação da doença, através de exames de rotina que indicam o comprometimento de determinado órgão. Este conhecimento é de extrema importância e representa grande avanço na medicina preventiva, já que sua detecção precoce poderá permitir reduzir de modo significativo o desenvolvimento de doenças, ou pelo menos retardar seu início (YUSUF, REDDY, ÔUNPUU *et al.*, 2001^{a,b}).

Nenhum fator de risco isolado explica toda a variabilidade da doença aterosclerótica. Mesmo o conjunto dos principais fatores de risco já conhecidos, incluindo o colesterol, a hipertensão arterial e o tabagismo, não conseguem explicar mais de 50% da variabilidade das manifestações clínicas da doença. Por isso, é muito importante fazer uma breve revisão de todos os possíveis fatores de risco salientando que, quando na mesma pessoa coexistem vários fatores de risco, os seus efeitos prejudiciais tendem a multiplicaram-se e não apenas a somaram-se (SILVA, GASPAR, GONÇALVES, 1999; SERVOSS, JANUZZI, MULLER, 2002).

1.1.4 Aterogênese

Os vasos sanguíneos são órgãos biologicamente ativos, capazes de manter sua própria integridade e homeostasia através de mecanismos regulados na própria parede vascular. Assim, o endotélio, em resposta a determinados estímulos, libera substâncias que regulam o tônus (constritores e relaxantes) e a estrutura (promotores e inibidores da multiplicação celular) vascular. Além disso, a parede celular regula a inflamação, através, da expressão de substâncias quimiotáticas e citocinas e, através, de reações imunológicas de antígenos e anticorpos circulantes. Finalmente, o endotélio normal mantém um ambiente não-trombótico e age como uma barreira à permeabilidade de células e proteínas do sangue, prevenindo o acúmulo excessivo de LDL-colesterol (VERRI, FUSTER, 1997; SCHIEFFER, DREXLER, 2003).

A disfunção endotelial é de primordial importância para a patogênese da aterosclerose (HEITZER, SCHLINZIG, KROHN *et al.* 2001). Uma combinação de fatores de risco (fumo, diabetes, hipertensão e dislipidemia) e características hemorreológicas locais (distúrbios no padrão do fluxo sanguíneo em segmentos tortuosos ou próximo a bifurcações), através de efeitos bioquímicos e hemodinâmicos crônicos, poderiam contribuir para a perda da integridade vascular e o desencadeamento do processo de aterosclerose. Assim, um endotélio funcionalmente anormal facilita a entrada de lipídeos plasmáticos e monócitos circulantes na parede arterial, promovendo eventos de vasoconstrição, promoção de trombose, inflamação e proliferação de células do músculo

liso (VERRI, FUSTER, 1997; CASSCELLS, NAGHAVI, WILLERSON, 2003; QUYYUMI, 2003).

As teorias de aterogênese são numerosas, sendo que as primeiras hipóteses sobre os mecanismos envolvidos surgiram a partir da metade do século XIX (FRANÇOSO, COATES, 2002). Dentre elas podemos referir a teoria da resposta à retenção, a teoria lipídica, a teoria monoclonal, a teoria da incrustação, a teoria de resposta à lesão, além das teorias oxidativa, hemodinâmica, imunológica, infecciosa, da fadiga e, a hipótese do cálcio (ROSS, GLOMSET, 1976; ROSS, 1986; VERRI, FUSTER, 1997; CATERINA, 2000).

Todas estas teorias não são mutuamente exclusivas e ilustram a complexidade de todo o processo aterosclerótico. Muito provavelmente, é a ação em conjunto de todas elas ou parte delas, com um maior ou menor peso relativo que será responsável pelo desenvolvimento da doença aterosclerótica. Uma vez que, se considerada uma via comum – a disfunção endotelial – a aterosclerose pode ser explicada por uma única teoria multifatorial (BATLOUNI, 1997).

Como resultado da injúria ao endotélio, monócitos sangüíneos são quimiotaticamente atraídos para a parede da artéria, penetrando no espaço subendotelial onde, através de mecanismos complexos, transformam-se em macrófagos. Esses macrófagos incorporam grandes quantidades de partículas de LDL (lipoproteínas de baixa densidade) oxidadas e transformam-se nas chamadas células espumosas, que constituem a primeira lesão bioquímica e microscopicamente detectável do depósito de lípideos na íntima arterial; isto porque as LDL nativas são reconhecidas e não se acumulam em quantidade apreciável nos macrófagos, devendo estar modificadas para que sejam captadas em quantidade suficiente para gerar células espumosas (BATLOUNI, 1997).

Posteriormente, continua a migração de monócitos para a íntima e passam a migrar células musculares lisas, a partir da camada média, que também acumulam gotículas de lípideos e assumem o aspecto de células espumosas. Essas células passam a localizar-se, lado a lado, na superfície da íntima, onde podem ser visíveis, macroscopicamente,

como estrias de coloração amarelada, constituindo as estrias gordurosas (STARY, CHANDLER, GLAGOV *et al*, 1994; FRANÇOSO, COATES, 2002).

Com a evolução do processo, nem todas as LDL modificadas são englobadas por macrófagos e parte delas permanece depositada na matriz extracelular sob a forma de grupos de gotículas de gordura (FRANÇOSO, COATES, 2002). Ocorre, então, um denso acúmulo de lipídeos extracelular, constituindo os chamados núcleos lipídicos, formados pelo aumento e confluência dos pequenos grupos de lipídeos extracelulares. Essa lesão, denominada ateroma, leva à intensa desorganização da íntima e espessamento da parede arterial, podendo ser vista a olho nu e vir a sofrer fissuras (STARY, CHANDLER, DINSMORE *et al*, 1995).

Com a evolução do processo, ocorre a formação de tecido conjuntivo fibroso que, associado a um núcleo lipídico, denomina-se fibroateroma, contendo um núcleo e uma placa fibrosa de revestimento, localizado na camada íntima da artéria; o fibroateroma constitui a lesão básica da aterosclerose (CORTI, BADIMON, 2002).

As lesões avançadas das artérias podem sofrer complicações, tais como calcificações e ulcerações da superfície do endotélio em contato com o sangue, que podem induzir a ruptura da superfície da placa. Neste evento temos o conseqüente descarregamento na corrente sangüínea dos detritos desta ruptura, ocorrendo, então, o desenvolvimento de hematoma ou hemorragia, que termina por causar microembolias, formação de trombos, uma das mais temidas complicações, já que podem ocluir o lúmen arterial e, embora a aterosclerose seja uma doença típica da túnica íntima, em casos severos debilita de tal maneira as paredes do vaso que causa a dilatação ou aneurisma arterial. Estas situações constituem a principal causa da morbidade e mortalidade secundárias à aterosclerose (FRANÇOSO, COATES, 2002).

1.1.5 Colesterol e aterosclerose

Alguns dos muitos estudos epidemiológicos que contribuíram para comprovar a relação temporal, a força, a gradação, a consistência e a especificidade da relação da colesterolemia com a doença cardiovascular são “Los Angeles Heart Study”, “Framingham Heart Study”, “Multiple Risk Factor Intervention Trial” (MRFIT), “Honolulu Heart Program”, “Lipid Research Clinics Follow-up Study” (LRC), “Seven Countries Study”, “Ni-Hon-San Study”, “Dololo-Tel Aviv Prospective Artery Disease Study”, “Israeli Ischaemic Heart Disease Study” e “Pooling Project”, os quais permitiram observar, no geral, uma relação curvilínea entre as concentrações séricas de colesterol total e a mortalidade por doença cardíaca isquêmica, sobretudo a partir de concentrações de colesterol aproximadamente de 180 mg/dL, apesar de não existirem evidências de um limiar a partir do qual não haja risco de doenças isquêmicas (SILVA, GASPAR, GONÇALVES, 1999).

Efetivamente, no homem, o risco dependente da hipercolesterolemia é progressivo e contínuo, pensando-se que a probabilidade do desenvolvimento de doenças ateroscleróticas surge a partir dos 140 mg/dL, mas sem um limiar definido, sendo substancialmente aumentado o risco de doenças isquêmicas para valores acima dos 180-200 mg/dL (YOSHIDA, BOSCO, MEDEIROS, 2003). Para além dos grandes estudos epidemiológicos já referidos, são inúmeros os estudos prospectivos e retrospectivos, nacionais e internacionais, que demonstram concentrações significativamente mais elevadas de colesterol nos doentes de ambos os sexos com arteriopatía isquêmica, bem como nos doentes com maior extensão e progressão da doença coronária aterosclerótica aferida por coronariografia. Mesmo em sobreviventes de enfarte do miocárdio a colesterolemia continua a condicionar a morbidade e mortalidade cardíacas e a mortalidade total (SILVA, GASPAR, GONÇALVES, 1999).

Um dos expoentes de prova da malignidade da hipercolesterolemia é a aterosclerose precoce nos doentes com hipercolesterolemia familiar heterozigótica e, sobretudo, homozigótica, em que a redução em 50% ou a ausência de receptores funcionais das LDL origina concentrações dramaticamente elevadas de colesterol. Entre

os homens com hipercolesterolemia familiar heterozigótica cerca de 85% sofrem um enfarte antes dos 60 anos e nos doentes homozigóticos a doença isquêmica coronariana manifesta-se habitualmente antes dos 10 anos, estando descritos enfartes tão precocemente quanto os 18 meses de idade (SILVA, MALDONADO, COSTA, 1993).

Em geral, a concentração normal de colesterol total no plasma obtido de uma pessoa em jejum, encontra-se entre 120 a 220 mg/dL, sendo que em adultos jovens e saudáveis, o valor médio é de 175 mg/dL (GHANNEM, DARIOLI, LIMAN *et al.*, 2001). Estudos epidemiológicos indicam que pessoas com concentrações plasmáticas de colesterol acima de 200 mg/dL, e aquelas que possuem uma forma relativamente branda; na qual a concentração plasmática de colesterol encontra-se entre 240 a 280 mg/dL; têm uma tendência aumentada de desenvolverem aterosclerose, sendo recomendada adoção de dieta com baixo teor e/ou com restrição dietética de colesterol para a redução das concentrações sanguíneas deste esteroide (GHANNEM, DARIOLI, LIMAN *et al.*, 2001; OLIVEIRA, 2001).

Os ensaios dos estudos prospectivos, comparações internacionais e ensaios clínicos são admiravelmente consistentes no sentido de mostrar que uma redução a longo prazo da concentração de colesterol reduz o risco de doenças isquêmicas coronarianas em 50% aos 40 anos e em 20% aos 70 anos de idade, com valores intermediários para as idades intermédias, e que o efeito máximo de redução do risco se obtém após cinco anos de intervenção hipolipemiante continuada (GHANNEM, DARIOLI, LIMAN *et al.*, 2001).

Entretanto, se a restrição dietética não produzir uma redução adequada de colesterol, faz-se necessário a administração de fármacos com atividade hipocolesterolemiantes associados ao regime de tratamento, uma vez que a terapêutica hipolipemiante reduz o ritmo de progressão da doença aterosclerótica e, em alguns casos, induz a regressão das lesões já existentes (SCHIEFFER, DREXLER, 2003).

1.1.6 Lipoproteínas e aterosclerose

Fatores de risco como lipoproteínas e seus produtos de oxidação modulam determinados aspectos da resposta imune, assim como outros fatores de risco (hipertensão, fumo) modulam o biomecanismo celular e o estresse oxidativo. Esta combinação entre as respostas imune/inflamatórias envolve o acúmulo de células endoteliais e do músculo liso, de lipídeos e material fibroso na placa ateromatosa da parede dos vasos. Contudo, esta resposta inflamatória envolve não somente células intrínsecas à parede arterial, mas também requer o recrutamento de leucócitos, linfócitos e macrófagos circulantes nos vasos sanguíneos (GREAVES, CHANNON, 2002; SCHIEFFER, DREXLER, 2003).

As lipoproteínas são responsáveis pelo transporte dos lipídeos no plasma e são compostas por lipídeos e proteínas, estas últimas são denominadas apolipoproteínas. As apolipoproteínas têm diversas funções no metabolismo das lipoproteínas como montagem da partícula (apo B100 e B48), ligante a receptores de membrana que as captam para o interior das células (apo B100 e E) ou co-fatores enzimáticos (apo CII, CIII e AI) (MARANHÃO, 2001).

Existem cinco grandes classes de lipoproteínas: as maiores e menos densas ricas em triglicérides, os quilomícras de origem intestinal, e as lipoproteínas de muito baixa densidade ou VLDL de origem hepática. As lipoproteínas de baixa densidade, as LDL, e as lipoproteínas de alta densidade, as HDL são ricas em colesterol. Existe ainda uma quinta classe, as lipoproteínas de densidade intermediária, as IDL. Uma outra lipoproteína típica de interesse clínico é a lipoproteína (a) ou Lp(a) (THOMAS, 2001; GREAVES, CHANNON, 2002).

São complexas as inter-relações metabólicas existentes entre as lipoproteínas; elas dependem da origem de cada uma e de seus conteúdos lipídicos e protéicos. Estas atuam muitas vezes como reguladoras de processos importantes, na conversão e captação das lipoproteínas (CHUN, MIN, PARK, *et al.*, 1999).

Os quilomícras são os responsáveis pelo transporte dos lípideos da dieta, mais conhecido como transporte exógeno; suas principais apoproteínas, também, têm origem intestinal. Após a biossíntese, o quilomícra é lançado na circulação, onde, por ação da apo CII, ativa a lipoproteína lipase, uma enzima sérica que hidrolisa os triglicérides e libera ácidos graxos para o tecido adiposo e outros tecidos periféricos, ativando também triacilglicéride lipase, que desempenha a mesma função só que no tecido hepático. Durante este processo, o quilomícra doa apo CII e AI a HDL, e recebe desta a apo E. O quilomícra assim se transforma em quilomícra remanescente, rico em apo E III e apo E IV, que é captado e catabolizado pelo fígado (GREEVENBROEK, BRUIN, 1998).

O transporte de lípides de origem hepática, ou simplesmente transporte endógeno, ocorre por meio da VLDL e LDL, que caracteristicamente contém apo B100. Os triglicérides das VLDL, assim como os dos quilomícras, são hidrolizados pela lipase lipoprotéica, e também trocam de apoproteínas com o HDL. Os ácidos graxos são liberados para os tecidos e metabolizados. Como resultado destes eventos, a metabolização da VLDL dá origem ao IDL, que por sua vez é convertido em LDL, após a perda de componentes de superfície lipídicos e protéicos (MARANHÃO, 2001; THOMAS, 2001).

As VLDL trocam triglicérides por ésteres de colesterol com as HDL e LDL por intermédio da proteína de transferência de colesterol esterificado (CETP) (TALL, 1993). Tanto as VLDL como as LDL serão removidas pelo fígado por intermédio de receptores específicos, dos quais o receptor da LDL é o mais importante. A expressão destes receptores é a principal responsável pelo nível de colesterol no sangue e depende da atividade da enzima hidróxi-metil-glutaril CoA redutase (HMG-CoA redutase) que é a enzima limitante da síntese do colesterol hepático (MARANHÃO, 2001; THOMAS, 2001).

As lipoproteínas IDL e LDL são, então, sintetizadas na corrente sanguínea a partir da ação da lipoproteína lipase sobre a VLDL, sendo a LDL captada pelo fígado ou tecidos periféricos utilizadores de colesterol via receptores para apo B100, muito mais eficientes que os receptores para apo E. Nestes tecidos a LDL sofre hidrólise, liberando colesterol

livre e aminoácidos. A captação da LDL e a liberação do colesterol, no fígado em particular, exerce três efeitos importantes, atuando na inibição da síntese endógena de colesterol, na ativação da enzima acil-colesterol-acil-transferase (ACAT) para a esterificação e armazenamento do colesterol e na modulação do número de receptores para apo B100 na membrana dos hepatócitos (PEASE, LEIPER, 1996).

As partículas de lipoproteínas de alta densidade, HDL, não possuem local de síntese exato; porém, aceita-se que estas partículas são formadas tanto no plasma (a partir das frações lipídicas liberadas no catabolismo do quilomícra e do VLDL) quanto no compartimento extravascular (fígado e intestino). As apo AI e AII representam o principal conteúdo protéico da HDL. O colesterol livre da HDL é esterificado pela ação da lecitina colesterol acil transferase (LCAT). A HDL atua, assim, como um captador de lipídeos e apoproteínas remanescentes do catabolismo de outras lipoproteínas, carregando o colesterol até o fígado onde será eliminado no chamado catabolismo reverso do colesterol (FIELDING, FIELDING, 1995).

A base para a relação entre o colesterol e a doença coronariana é a lipoproteína LDL, que quando se encontra em concentrações elevadas, costuma originar lesões proeminentes das paredes arteriais. As concentrações recomendadas das frações lipoprotéicas têm variado bastante ao longo do tempo e, atualmente, os valores recomendados de colesterol na lipoproteína LDL são os seguintes: menor que 100 mg/dL para pacientes com doença arterial coronariana ou risco para a mesma, menor que 130 mg/dL para pacientes com dois ou mais fatores de risco e menor que 160 mg/dL para pacientes com 0-1 fator de risco (YOSHIDA, BOSCO, MEDEIROS, 2003).

A elevação dos valores de LDL plasmática pode aumentar a velocidade de sua adesão na parede arterial, onde sofre processo de oxidação por agentes, tais como, ânions superóxido, óxido nítrico e peróxido de hidrogênio, transformando-se em LDL oxidadas (ox-LDL), as quais são capazes de provocar citotoxicidade no endotélio vascular e desencadear eventos que resultaram na formação de uma placa aterosclerótica (AVIRAM, 2000; KÁDÁR, GLASZ, 2001).

Estudos recentes mostraram que as concentrações de triglicérides parecem ser um forte e independente fator predisponente de risco futuro de infarto do miocárdio, particularmente, quando os níveis de colesterol também são elevados (TALMUD, HAWE, MILLER *et al*, 2002). Vários estudos prospectivos e do tipo caso-controle têm demonstrado uma relação significativa entre os níveis plasmáticos de triglicérides e risco de cardiopatia isquêmica. Uma recente meta-análise mostrou que para cada 1 mmol de aumento nos níveis plasmáticos de triglicérides, o risco de doença coronariana aumenta em 32% para os homens e 78% para as mulheres. Não há ainda, porém, consenso sobre a importância da hipertrigliceridemia como fator de risco isolado (AVIRAM, 2000).

Há evidências suficientes que demonstram que o excesso de triglicérides amplifica o risco de cardiopatia isquêmica, quando associado com outros fatores de risco, como hipercolesterolemia ou aumento de LDL (SLATER, PARAFIORITI, TORTORA *et al.*, 2002; FRUCHART, DURIEZ, 2002). Segundo a American Association of Clinical Endocrinologist, 2000, através do estudo Prospective Cardiovascular Munster (PROCAM) demonstrou que as concentrações de triglicérides maiores que 200 mg/dL em conjugação com concentrações de LDL maiores que 160 mg/dL aumentam substancialmente os riscos de doenças cardiovasculares. Outro estudo revelou que os pacientes no terço superior da curva de trigliceridemia (média de 229 mg/dL) e com a relação colesterol total/HDL também no terço superior (média de 5,7), tinham 3 vezes maior risco de doença coronariana comparados a indivíduos com trigliceridemia menor ou com relação colesterol total/HDL mais baixa (WIERZBICKI, MIKHAILIDIS, 2002).

Em relação ao colesterol da HDL, estudos epidemiológicos têm estabelecido uma correlação entre o aumento do risco de doenças ateroscleróticas coronarianas à medida que diminuem as concentrações de colesterol da HDL, sendo considerados desejáveis valores maiores ou iguais a 35 mg/dL. Cada 1 mg/dL de aumento nas concentrações de colesterol da HDL corresponde a aproximadamente 3% de redução em eventos vasculares (YOSHIDA, BOSCO, MEDEIROS, 2003).

Diferentes características estruturais e de composição das lipoproteínas HDL têm sido amplamente estudadas uma vez que, a HDL não compõe uma partícula única e uniforme, possuindo variações de acordo com a fase de sua atividade. A fração HDL₃ é precursora da HDL₂, que se forma pela incorporação da apolipoproteína C, de fosfolipídeos e de colesterol liberados durante a lipólise, sendo estas duas frações as mais importantes. Alguns estudos mostram que pacientes com coronariopatias apresentam menores quantidades de HDL₂, fração que parece estar envolvida com a capacidade de maior remoção de colesterol dos tecidos (NEWTON, KRAUSE, 2002).

Estudos de intervenção da modificação lipídica têm demonstrado que agentes terapêuticos promotores do aumento das concentrações de colesterol da HDL são responsáveis pela redução dos índices de doenças cardiovasculares. Os efeitos anti-aterogênicos relacionados a lipoproteína HDL, ainda não foram bem elucidados, porém, seu importante papel no transporte reverso do colesterol e seus efeitos benéficos sobre as funções endoteliais são explicações plausíveis para estas ações protetoras (WIERZBICKI, MIKHAILIDIS, 2002).

O mecanismo, através do qual a lipoproteína HDL altera o processo da doença aterosclerótica, tem sido comentado em alguns estudos, nos quais pressupõe-se que as altas concentrações de colesterol da HDL tendem a facilitar o efluxo de colesterol através da parede arterial, desta forma, proporcionando o transporte de colesterol e outros lipídeos das artérias para o fígado, a fim de serem excretados pela bile como esteróides fecais ou sais biliares. A procura por novas terapias que sejam mais eficientes no aumento dos índices de colesterol da HDL, tem sido extensivamente relatada; estudos clínicos avaliaram a possibilidade do uso de HDL sintético como uma nova modalidade no tratamento das síndromes agudas coronarianas (NEWTON, KRAUSE, 2002). Uma vez que, a redução da LDL torna-se o alvo primário no tratamento das dislipidemias, também vem sendo reconhecido o importante papel do aumento dos níveis de colesterol da HDL na prevenção de doenças cardiovasculares (WIERZBICKI, MIKHAILIDIS, 2002).

1.2 HMG-CoA REDUTASE E LIPOPROTEÍNA LIPASE

1.2.1 HMG-CoA redutase

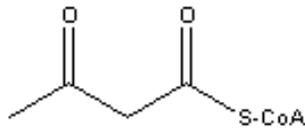
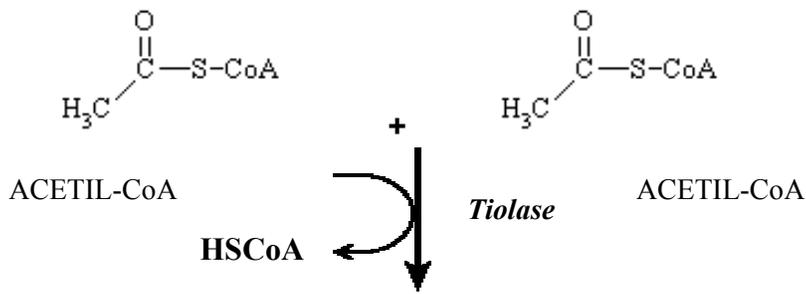
Já na década de 70, foi demonstrado que a regulação da biossíntese do colesterol ocorria, principalmente, pela inibição enzimática da HMG-CoA redutase, responsável pela catálise de um dos primeiros passos na via biossintética do colesterol (DENNIS, BOSCH, 2000; OLIVEIRA, 2001). A enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA redutase) é responsável pela conversão do substrato HMG-CoA a mevalonato, pelo processo catalítico que constitui um dos principais passos na biossíntese do colesterol. A análise tridimensional obtida por cristalografia de raio-X permite determinar a estrutura da enzima, normalmente formada por um tetrâmero protéico rigorosamente associado, porém, somente o dímero protéico é essencial para que ocorra a catálise. O sítio ativo desta molécula situa-se de maneira centralizada e é idealmente desenhado para a ligação e catálise de dois substratos específicos: HMG-CoA e NADPH (ISTVAN, 2003).

A respeito deste sítio de ligação, a enzima HMG-CoA possui uma estrutura helicoidal incomum a outras enzimas, conhecida como “cis-loop”, que permite o posicionamento apropriado de diversos resíduos de aminoácidos (Ser⁶⁸⁴, Asp⁶⁹⁰, Lis⁶⁹¹, Lis⁶⁹²) que se ligam a porção HMG. Uma outra porção do “loop” apresenta uma região contendo Glu⁵⁵⁹ e His⁸⁶⁶, dois resíduos muito importantes para a ligação à porção CoA; esta estrutura helicoidal envolve o sítio ativo enzimático, protegendo-o da água e criando uma ligação restrita à porção CoA do substrato (ISTVAN, 2003).

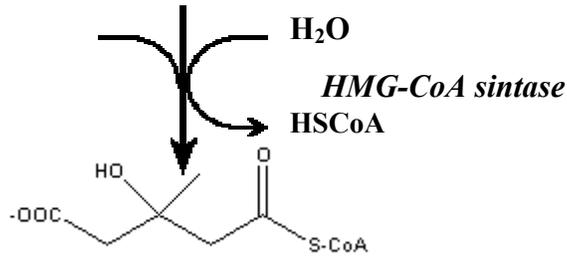
A enzima HMG-CoA redutase está envolvida em diferentes mecanismos reguladores da biossíntese do colesterol, tais como: a inibição retroativa, onde o colesterol atua como inibidor da enzima (STEINER, GATLIN, LENNON *et al.*, 2001); a ação hormonal, provavelmente controlando a produção da enzima ou provocando modificações covalentes por mecanismos de fosforilação e desfosforilação; ou ainda via transcrição do gene da enzima, levando à estimulação da “síntese de novo” do colesterol (GOLDSTEIN, BROWN, 1990).

A expressão dos genes da HMG-CoA redutase e dos receptores para LDL, na biossíntese do colesterol, ocorre por uma provável sinalização, que acontece quando o colesterol livre é liberado dos lisossomos. Desta forma, tem-se um mecanismo de regulação da síntese por “feedback” negativo, não ocorrendo a expressão genética dos receptores da HMG-CoA redutase e LDL, quando os níveis de colesterol estão adequados à demanda celular. Esta regulação, no entanto, não parece envolver mudanças no estado de fosforilação ou desfosforilação da enzima (EDWARDS, TABOR, KAST *et al.*, 2000).

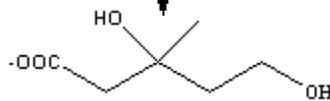
A transcrição, tradução, “turnover” protéico e regulação da eficiência catalítica pela fosforilação e desfosforilação da enzima HMG-CoA redutase são os mecanismos atualmente propostos para a regulação da biossíntese do colesterol (GOLDSTEIN, BROWN, 1990). Pode-se, então, entender os motivos que levam a expressão da enzima chave na biossíntese do colesterol (Figura 1), e a sua importância como alvo terapêutico para o desenvolvimento de agentes farmacológico potenciais nas doenças dislipidêmicas, em especial as cardiovasculares (SCOTT, 2002).



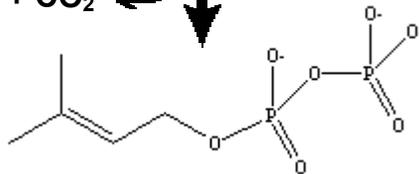
ACETATOACETIL-CoA



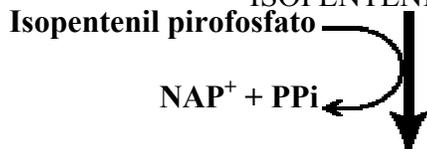
3-HIDROXI-3-METILGLUTARIL-CoA



MEVALONATO



ISOPENTENIL PIROFOSFATO



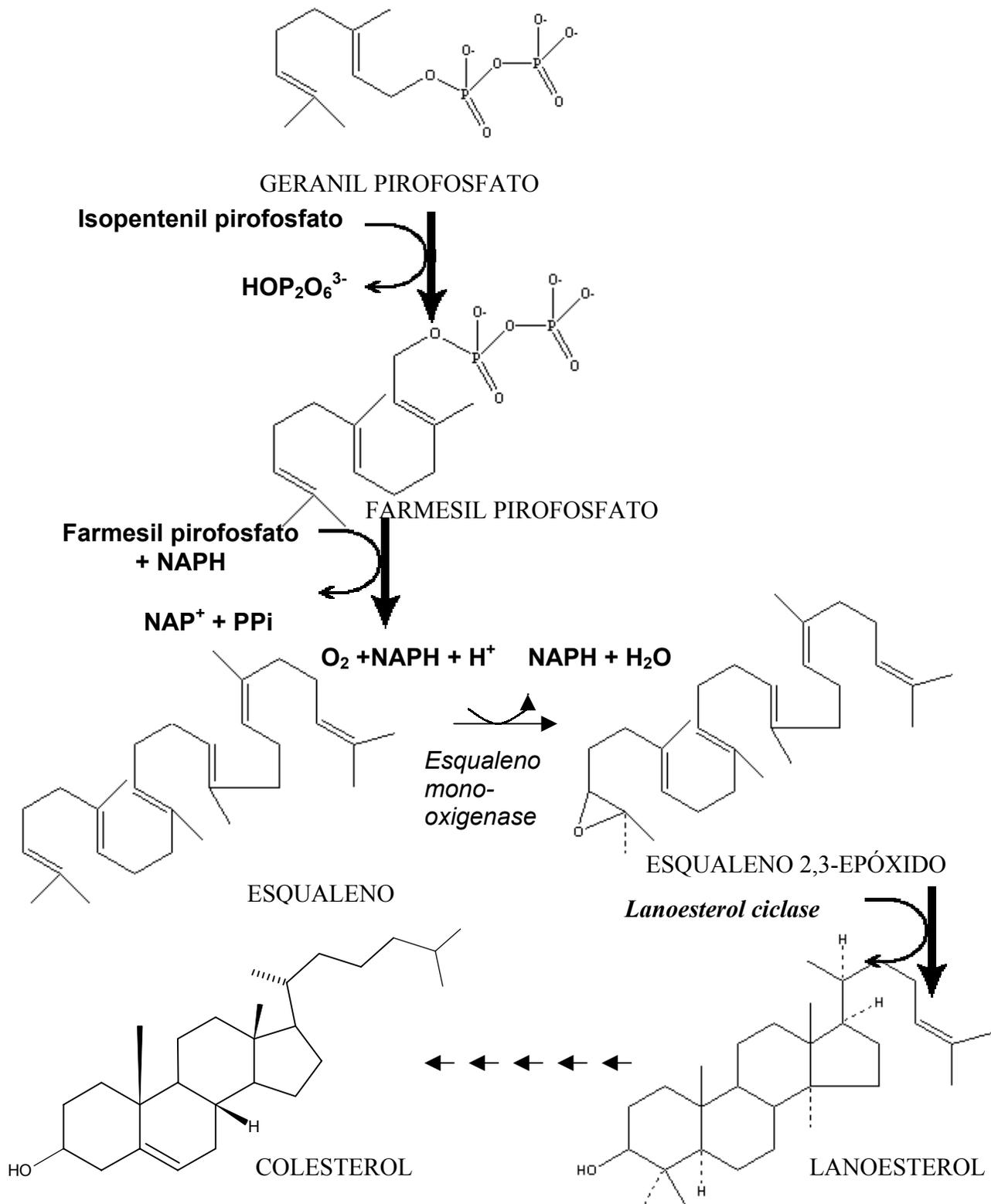


Figura 1. Biossíntese do colesterol segundo relatado por ISTVAN, 2003.

1.2.2 Lipoproteína-lipase

A lipoproteína-lipase é uma enzima chave no metabolismo de triglicérides existentes nos quilomícros e nas lipoproteínas VLDL. O gene desta enzima tem 35 Kb de comprimento, contendo 10 exons e é mapeado pelo cromossomo 8p22 (DEEB, PENG, 1989). Os principais órgãos responsáveis pela síntese desta enzima são aqueles envolvidos na liberação de ácidos graxos, como o coração, o músculo esquelético e o tecido adiposo. No coração, esta liberação ocorre também nas células intersticiais mesenquimais e, não somente, nos miócitos cardíacos. Este fato pode ser comprovado, através, da detecção de elevadas concentrações de mRNA da lipoproteína lipase nestas células (STEIN, STEIN, 2003).

A atividade lipolítica da lipase marca o evento inicial na mobilização de triglicérides, liberando ácidos graxos como fonte de energia. Esta atividade em células adiposas é regulada por hormônios (epinefrina, norepinefrina, glucagon, hormônio adrenocorticotrópico) que estimulam a adenilato ciclase das células adiposas. O aumento do nível de adenosina monofosfatada ciclíca (AMP cíclico) estimula a proteína cinase que por sua vez ativa a lipase pela fosforilação do AMP, desencadeando o evento da lipólise (HEEREN, BODMAN, NIEMEIER *et. al.*, 2002).

O papel anti-aterogênico da lipoproteína lipase no plasma é bem documentado e seu mecanismo de ação está ligado a sua atividade catalítica, resultando em diminuição das concentrações de triglicérides e aumento das concentrações do colesterol da HDL no plasma (HEEREN, BODMAN, NIEMEIER *et. al.*, 2002).

Estudos utilizando camundongos têm demonstrado uma redução de 18 vezes na incidência de aterosclerose, com conseqüente redução dos níveis lipídicos plasmáticos (SHIMADA, ISHIBASHI, INABA *et al*, 1996). Também foram relatadas reduções de 30% na área de superfície da lesão, e 50% no corte transversal da artéria aorta aterosclerótica, quando têm-se uma super-expressão da lipoproteína-lipase em coelhos transgênicos (FAN, UNOKI, KOJIMA *et al*, 2001). Estas análises de regressão servem como base

experimental para teorias que postulam que os níveis de HDL-colesterol estão inversamente correlacionados com o acúmulo de colesterol na artéria aorta; enquanto, os baixos níveis de triglicérides plasmáticos estão correlacionados diretamente com a redução da superfície lesionada na aterosclerose (CHIBA, MIURA, SAWAMURA *et al.*, 1997; STEIN, STEIN, 2003).

O mecanismo pró-aterogênico da lipoproteína-lipase é complexo e envolve não somente as atividades catalíticas já citadas, mas também o recrutamento ou balanço positivo de colesterol éster. Estas evidências são confirmadas em estudos, onde ocorre uma redução de lesões ateroscleróticas, quando o gene da lipoproteína-lipase está ausente, em macrófagos, por exemplo; e nos quais têm-se um aumento da aterosclerose através da super-expressão do gene da lipoproteína-lipase (BEAUCHAMP, LETENDRE, RENIER, 2002; ZAMBON, DEEB, PAULETTO *et al.*, 2003).

A lipoproteína-lipase em culturas celulares age como transferase de colesterol éster intracelular, um processo que não está ligado as atividades lipolíticas, estando dissociado do metabolismo das lipoproteínas. O papel da lipoproteína lipase, de captação do colesterol éster, também foi estudado *in vivo* em glândulas mamárias de ratas lactantes (CHAJEK-SHAUL, FRIEDMAN, HALPERIN *et al.*, 1981). Esta atividade transferase induz ao enriquecimento das células de músculo liso da artéria aortas expostas ao colesterol oleato, sugerindo que na parede aórtica, a lipoproteína-lipase pode desempenhar um papel de agente potenciador do processo aterosclerótico (STEIN, STEIN, 2003).

A avaliação do balanço entre as propriedades pró e anti-aterogênicas da lipoproteína-lipase, em animais e em humanos, tem como objetivo promover bases para a discussão do papel desta enzima no processo patológico de doenças cardiovasculares, uma vez que, sua possível utilização como alvo terapêutico, tem despertado interesse no desenvolvimento de agentes farmacológicos que regulem sua atividade em humanos (DUGI, BRANDAUER, SCHMIDT *et al.*, 2003; PILLARISSETTI, SAXENA, 2003).

1.3 TERAPÊUTICA DAS DISLIPIDEMIAS

Designam-se dislipidemias as alterações metabólicas lipídicas decorrentes de distúrbios em qualquer fase do metabolismo lipídico, que ocasionem repercussão nas concentrações séricas das lipoproteínas (GOTTO, 1993). A apresentação laboratorial das dislipidemias compreende quatro situações bem definidas: (i) hipercolesterolemia isolada; (ii) hipertrigliceridemia isolada; (iii) hiperlipidemia mista; (iv) diminuição isolada do HDL-colesterol ou em associação com aumento do LDL-colesterol e/ou dos triglicérides. De acordo com sua etiologia, as dislipidemias podem ser primárias, conseqüentes de causas genéticas, algumas só se manifestando quando há influência ambiental; ou podem ser secundárias quando causadas por outras doenças ou uso de medicamentos (SINGH, MEHTA, 2002).

A terapêutica das dislipidemias, de comprovada eficiência, tem por finalidade fundamental a prevenção primária e secundária das doenças ateroscleróticas cardiovasculares, cerebrovasculares e periféricas. Eventualmente, pode objetivar a regressão de xantomas e a diminuição dos riscos de pancreatite aguda e deve ser indicada sistematicamente e mantida indefinidamente (SANTOS, 2001).

A determinação do perfil global de risco cardiovascular é o primeiro passo da prevenção, permite a identificação dos fatores de risco do doente e de sua potencial interação. O resultado desta análise vai condicionar o nível de intervenção do tratamento, sendo esta talvez, a parte mais delicada e complexa da prevenção e a que exige um conhecimento mais profundo dos fatores de risco e da metodologia preventiva. Dela depende a decisão do uso de fármacos, com seus custos econômicos e potenciais efeitos secundários. No plano individual, só uma abordagem racional de cada caso permitirá obter uma relação custo/benefício da medicina preventiva que seja favorável ao doente e à sociedade, uma vez que somente a existência de um elevado perfil global de risco cardiovascular justifica o recurso aos fármacos hipolipemiantes (PERDIGÃO, 1999).

A terapêutica deve ser iniciada com mudanças no estilo de vida, que compreendem adequação à: (i) terapia nutricional, reduzindo a ingestão de colesterol alimentar, ácidos graxos trans e saturados, álcool e café não filtrado, e aumento da ingestão de ácidos graxos insaturados, fitoesteróis, soja, substâncias antioxidantes, fibras dietéticas; (ii) programa de exercícios físicos aeróbicos, atingindo a zona de 60% a 80% da frequência cardíaca máxima, com busca e manutenção do peso ideal; (iii) abordagem cognitivo-comportamental e farmacoterapêutica de combate ao tabagismo; (iv) promoção do equilíbrio emocional. Não sendo atingidos os objetivos propostos, deve ser considerada a introdução de fármacos isolados ou associados, dependendo das necessidades, com manutenção da dietoterapia. Excepcionalmente, outras medidas podem vir a ser adotadas, caso não ocorra sucesso no uso desses fármacos ou pela impossibilidade do paciente perseverar nos objetivos propostos (SANTOS, 2001).

Dentre os medicamentos que possuem diferentes mecanismos de ação, são destacados aqueles de uso em nosso país, onde encontram-se disponíveis: os inibidores competitivos da 3-hidróxi-3-metilglutaril coenzima A redutase (HMG-CoA redutase), as resinas sequestradoras de ácidos biliares, os ácidos fíbricos, ácidos nicotínicos, inibidores de lipase, ácidos graxos ômega-3, agentes antioxidantes e fibras dietéticas (HOPKINS, 2000; ELLEGARD, BOSAEUS, ANDERSSON, 2000; HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2000).

1.3.1 Principais fármacos utilizados no tratamento das dislipidemias

Os inibidores competitivos da HMG-CoA redutase são fármacos obtidos, após extensas pesquisas focadas em produtos antimicrobianos (DOI, ENDO, 1978; ALBERTS, CHEN, KURON *et al*, 1980) ou através de síntese e são comumente conhecidos como estatinas. As estatinas constituem a classe terapêutica com maior potencial na redução do perfil hiperlipêmico e concentram sua ação sobre a síntese endógena de colesterol, através da inibição competitiva com a HMG-CoA redutase, uma enzima do retículo endoplasmático e dos peroxissomas que catalisa a conversão da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A em mevalonato, passo bioquímico limitante e regulador do processo de síntese (WIERZBICKI, 2001; OLIVEIRA, 2001).

A inibição da HMG-CoA redutase leva a uma diminuição do colesterol endógeno, caracterizando um aumento do número e da atividade funcional dos receptores de LDL de membrana (apo B/apo E) e um aumento proporcional, via receptores, da depuração plasmática das lipoproteínas com apo B 100 ou apo E; sendo elas: VLDL, IDL e LDL. Este processo ocorre em todas as células nucleadas, porém, é de suma importância no fígado, já que é órgão central da homeostasia do colesterol endógeno, responsável pela síntese de ácidos biliares, pela produção e secreção de lipoproteínas (TOLMAN, 2000).

As estatinas são, amplamente, utilizadas na terapêutica como fármacos redutores da hiperlipemia e da doença aterosclerótica. Os primeiros agentes, e até hoje conhecidos como de primeira escolha, na classe de estatinas foram a lovastatina, pravastatina e sinvastatina, sendo todos derivativos de metabólitos secundários de fungos e, algumas vezes, são denominados estatinas “naturais”. Todos demonstram reduzir a LDL, a progressão da estenose da artéria coronária, as ocorrências de eventos coronarianos e, na maioria dos testes, a significativa diminuição de mortes por infarto do miocárdio. Mais recentemente, outras estatinas sintéticas, foram desenvolvidas, e três destas a atorvastatina, cerivastatina e fluvostatina, estão em uso clínico, ao passo que a itavaestatina (NK-104) e a rosuvaestatina (ZD-4522) estão em fase final de testes. Todos estes agentes são capazes de reduzir o colesterol plasmático. Contudo, há controvérsias quanto ao fato de as estatinas “sintéticas” e “naturais” apresentarem propriedades idênticas ou se existem diferenças clinicamente significativas (WIERZBICKI, 2001).

A semelhança estrutural destes fármacos com a porção HMG do HMG-CoA, acredita-se, ter um papel chave na ação inibitória dos mesmos sobre a HMG-CoA redutase. Este é o fundamento pelo qual se afirma que as estatinas possuem um mecanismo geral de ação farmacológica, apesar de apresentarem diferentes características relacionadas ao comportamento farmacocinético, potencial de interações medicamentosas e propriedades de solubilidade (SCHIEFFER, DREXLER, 2003).

De maneira geral, estes fármacos são bem tolerados, mas podem ocasionar efeitos colaterais em até 2% dos pacientes, sendo a miopatia e a hepatotoxicidade os efeitos

mais importantes. Também, são relatados efeitos de desconforto gastrointestinal, dores musculares e elevações de enzimas hepáticas. Essas alterações são transitórias, desaparecendo espontaneamente ou com a suspensão do medicamento. Elevações de até três vezes o valor inicial da TGO, TGP e até 10 vezes da CPK não requerem interrupção do tratamento, porém necessitam de mais investigações (CHRISTIANS, JACOBSON, FLOREN, 1998). Rabdomiólise pode ocorrer na presença de associação com imunossupressores, fibratos, ácido nicotínico e eritromicina. Eventuais distúrbios do sono, também, são relatados por alguns pacientes (BARTH, MANCINI, 1995; TOLMAN, 2000).

Além disso, outros efeitos adversos, embora esporádicos e, raramente, significativos, têm sido atribuídos às estatinas como: síndrome de lúpus iatrogênico, dermatomiosite, reações de hipersensibilidade e exantemas, enteropatias exudativas, icteríceas colestáticas e síndrome de Valter (anomalias vertebrais, atresia anal, fístula traqueo-esofágica e displasia renal e radial). Não são indicadas para mulheres grávidas e em fase de aleitamento e, para aquelas com possibilidades de engravidar. Estudos a longo prazo demonstraram boa tolerância às estatinas em indivíduos acima de 20 anos e idosos (TOLMAN, 2000). Estão contra-indicados na presença de doença hepática e de elevações persistentes das transaminases hepáticas e das bilirrubinas. Podendo ser utilizadas por doentes renais crônicos (TOLMAN, 2000).

Outro grupo de fármacos utilizados no tratamento das dislipidemias são as resinas de troca iônica que se ligam aos ácidos biliares, impedindo sua reabsorção, bloqueando seu ciclo entero-hepático e aumentando o número de receptores para LDL, causando assim o aumento da eliminação dos ácidos biliares nas fezes, reduzindo desta forma as concentrações de colesterol no plasma. Conseqüentemente diminuem o colesterol total e o colesterol da LDL (até 30%). Como aumentam a síntese das VLDL, podem elevar os triglicérides (10% - 20%), no entanto, esta elevação costuma desaparecer dentro de quatro semanas, retornando aos valores de pré-tratamento (EINARSSON, ERICSSON, EWERTH *et al*, 1991).

Os efeitos adversos associados as resinas sequestradoras de sais biliares são: obstipação, náuseas, vômitos e meteorismo. Nos idosos, crianças e portadores de doença renais, pode induzir acidose hipercolesterolemica. Pode ocorrer aumento das enzimas hepáticas, principalmente, se usada associada as estatinas (AST, FRISHMAN, 1990; KAJINAMI, TAKEKOSHI, 2002).

Os ácidos fibrícos, também, são fármacos de primeira escolha no tratamento das hipertrigliceridemias endógenas, com aumento correspondente das VLDL plasmáticas, sempre que houver falha da intervenção dietética específica; podendo também ser utilizados na disbetalipoproteinemia e hiperlipidemias mistas quando os triglicérides forem muito elevados. São de uso alternativo nas hipercolesterolemias (BARTH, MANSINI, 1995; SOSKA, 1999). Além do clofibrato, fármaco inicialmente introduzido a partir de 1962, fazem parte deste grupo: bezafibrato, fenofibrato, genfibrozila, etofibrato e citofibrato, todos em uso no Brasil (BERTOLAMI, 2001).

O mecanismo de ação destes fármacos é complexo e, ainda não totalmente esclarecido. Admite-se que (TIKKANEN, 1992; BERTOLAMI, 2001) eles reduzem a síntese hepática das VLDL, em decorrência do menor fluxo de ácidos graxos livres para o fígado; estimulam a atividade da enzima lipoproteína lipase; aumentam a excreção de colesterol hepático pelas vias biliares; aumentam a afinidade dos receptores B/E pelas LDL; provocam a redistribuição das subfrações de LDL, diminuindo a concentração relativa das LDL pequenas e densas (mais aterogênicas); reduzem a lipemia pós-prandial; tornam as LDL, *in vitro*, menos suscetíveis à oxidação; podem diminuir os níveis circulantes de Lp (a) por mecanismos ainda não esclarecidos; além da possível ação inibidora da enzima HMG-CoA redutase, interferindo deste modo na cascata de síntese do colesterol hepático (DIAMENT, FORTI, GIANNINI, 1999).

Os ácidos fibrícos, apesar de bem tolerados, apresentam efeitos indesejáveis, como distúrbios gastrointestinais, tontura, cefaléia, visão embaçada, aumento de peso corpóreo, diminuição da libido, leucopenia e anemia (OLIVEIRA, 2001).

Recentes estudos têm demonstrado que o ácido nicotínico e seus derivados, em determinadas doses farmacológicas, constituem a única classe terapêutica de hipolipemiantes que reduz todas as subfrações lipídicas, sendo um fármaco economicamente, viável no tratamento de várias formas de dislipidemias (ROBINSON, SLOAN, ARNOLD, 2001).

Estes compostos inibem a lipase hormônio-sensível, intracelular, do tecido adiposo, diminuindo a liberação de ácidos graxos para o fígado e, conseqüentemente trabalhando na redução da síntese hepática de VLDL, que tem como conseqüência a diminuição, na produção da lipoproteína LDL (5% a 25%) e, nos índices de degradação da lipoproteína HDL (aumento de 15% a 35%), podendo também reduzir os níveis de triglicérides (20% a 50%) (CHEN, MAGRO, 1999). Nos hepatócitos, o ácido nicotínico reduz a mobilização intracelular de ácidos graxos, reduzindo por conseqüência a síntese e acoplamento dos triglicérides à apo B100. Como resultado, as lipoproteínas com apo B100, VLDL e LDL, não constituídas adequadamente, são degradadas, antes de sua liberação para o plasma (KAMANNA, KASHYAP, 2000).

Os efeitos adversos observados na terapêutica com niacina compreendem: rubor facial, hiperglicemia, hiperuricemia, dispepsia, náusea, dor abdominal, alterações do trânsito intestinal, úlcera péptica e, sintomas vasomotores, sendo estes sintomas a causa comum do abandono da terapia (OLIVEIRA, 2001).

No tratamento da hipertrigliceridemia um dos fármacos mais conhecidos é o Orlistat, quimicamente, definido como tetrahidrolipstatin, um derivado hidrogenado do liptantin, um potente inibidor das lipases, naturalmente, produzido pelo *Streptomyces toxytricini* (ROS, 2000). Este composto age no lúmen intestinal ligando-se, covalentemente, aos sítios catalíticos das lipases gástrica e pancreática, o que é confirmado pela observação clínica de seu efeito residual prolongado. Com a inibição da lipase, a lipólise dos triglicérides provenientes da dieta é substancialmente reduzida, sendo 30% dos triglicérides ingeridos, excretados inalterados nas fezes. É, comumente, utilizado no tratamento de indivíduos obesos ou com sobrepeso, sendo que, a alteração

lipídica esperada é composta de redução de triglicérides e elevação de HDL-colesterol. Além destes efeitos, a redução expressiva de LDL-colesterol, valorizou clinicamente o efeito hipolipemiante do Orlistat (MCNEELY, BENFIELD, 1998; BERTOLAMI, 2001).

No entanto, ainda não existem estudos em relação aos efeitos do Orlistat, sobre importantes fatores de risco relacionados à manifestação da aterosclerose (BERTOLAMI, 2001; WIERZBICKI, REYNOLDS, CROOK, 2002).

A suspeita de uma possível hepatotoxicidade do Orlistat, tem sido alvo de vários estudos. Alguns casos de doenças hepáticas crônicas e agudas induzidas por este fármaco são descritos em alguns trabalhos, principalmente casos de hepatite subsequente ao uso de fármacos como o Orlistat (BARBARE, IMBERT, BENKIRANE, 2001; FINER, 2002).

Outras importantes alternativas terapêuticas para as hipertrigliceridemias são os ácidos graxos ômega-3 (EPA e DHA) que reduzem os triglicérides por diminuir a produção de VLDL no fígado (HSU, LEE, CHEN, 2000; WEBER, RAEDERSTORFF, 2000). Os ácidos graxos ômega-3 em alguns estudos, também, apresentam propriedades antitrombóticas e antiarrítmicas (BERTOLAMI, 2001).

Alguns estudos *in vivo*, indicam que a suplementação de 1g/dia de ômega-3 apresentou propriedades atenuantes da injúria coronariana, reduzindo em 10% os eventos cardiovasculares (morte, infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral) em portadores de doenças coronarianas (BERTOLAMI, 2001), mantendo também seus efeitos benéficos em estudos com ratos hiperlipêmicos (KU, OKU, KANEDA *et al*, 1999). O papel da suplementação farmacológica desses ácidos na prevenção da aterosclerose clínica ainda não está totalmente estabelecido (BERTOLAMI, 2001).

Muitos trabalhos têm demonstrado a íntima relação entre o aumento do estresse oxidativo e a disfunção endotelial no processo aterosclerótico. Estudos recentes

comprovam que o estresse oxidativo pode agir diretamente no desenvolvimento de doenças arteriais coronarianas (HEITZER, SCHLINZIG, KROHN *et al.*, 2001). Teoricamente, os antioxidantes poderiam exercer efeitos favoráveis tanto nas lesões iniciais da aterosclerose, como nas lesões intermediárias e avançadas, com as respectivas implicações clínicas, a longo, médio ou curto prazo (BATLOUNI, 1997; HARRIS, DEVARAI, JIALAL, 2002).

O Probucol, potente agente antioxidante, que adicionalmente reduz o colesterol da LDL e da HDL em cerca de 10% e 15-20%, respectivamente, não altera os níveis de triglicérides. Sabe-se que ele diminui a absorção intestinal de colesterol e aumenta a captação de LDL, por via não mediada por receptores. Este fármaco causa um aumento na excreção de ácidos biliares, diminui a síntese hepática e a secreção das VLDL, diminui a síntese e aumenta o catabolismo de apo-AI e AII, estimula a proteína de transferência (CEPT), aumenta a transferência do colesterol das HDL para outras lipoproteínas e retira o colesterol das células. Entretanto, devido ao fato de diminuir o colesterol da HDL ele é pouco utilizado como agente hipolipemiante (BERTOLAMI, 2001).

1.3.2 Novos alvos terapêuticos

Do ponto de vista histórico, os produtos naturais sempre desempenharam um papel muito importante no processo de desenvolvimento de fármacos. A maior parte dos fármacos comercializados é de origem natural ou de produtos sintéticos inspirados em produtos naturais. Tanto os métodos clássicos de isolamento dos produtos naturais quanto a utilização de processos de síntese química na avaliação destas substâncias são uma fonte promissora de novos compostos protótipos (STROBEL, 2002; MACIAS, MARIN, OLIVEROS-BASTIDAS *et al.*, 2003; de las HERAS, RODRIGUEZ, BOSCA *et al.*, 2003).

Apesar do grande número de pessoas acometidas por doenças cardiovasculares associadas aos elevados níveis plasmáticos de lipídeos, ainda são poucas as opções terapêuticas disponíveis para a prevenção ou tratamento destas enfermidades (OLIVEIRA, 2001).

A efetividade na redução da concentração dos lipídeos plasmáticos, na clínica, tem obtido suporte no crescente número de contribuições, indicando a significância da prevenção primária e, particularmente, secundária dos riscos cardiovasculares. Enquanto estes estudos indicam claramente a necessidade de potentes agentes redutores dos níveis de colesterol, outros caminhos do metabolismo lipídico vêm ganhando interesse, como alternativas terapêuticas. Estes caminhos estão sendo avaliados, na expectativa, de responder da forma mais completa, as aspirações farmacológicas de novos fármacos para o mercado farmacêutico (SIRTORI, 1995).

Os novos alvos terapêuticos para as dislipidemias, estão sendo encontrados nos mecanismos de regulação lipídica, nos processos de absorção, distribuição e deposição tecidual. Em adição aos recentes fármacos com maiores potenciais sistêmicos na redução dos lipídeos plasmáticos (em particular os inibidores da HMG-CoA redutase), agentes não-sistêmicos, incluindo os fármacos seqüestradores de colesterol, estão recebendo maiores atenções (SIRTORI, 1995). Os inibidores da acil coenzima A colesterol aciltransferase, constituem outra área em desenvolvimento, ou seja, fármacos que interferem na esterificação do colesterol nos tecidos, particularmente, na parede arterial; porém, o maior problema destes fármacos, aparentemente, está na baixa tolerabilidade e na falta de provas experimentais conclusivas de redução nas concentrações plasmáticas de colesterol em humanos (STEIN, STEIN, 2003).

A elevação congênita das concentrações séricas de colesterol das lipoproteínas LDL e HDL, também, pode agir como alvo terapêutico: a indução de enzimas microssomais tem sido testada, porém, não apresentou importância clínica; fármacos com atividade endócrino e hipolipemiante, possivelmente apresentariam melhores resultados (SIRTORI, 1995). Há outros alvos que podem ser citados, como a correção do modelo de lipoproteína caracterizado por “lipoproteína pequena e de baixa densidade” e o desenvolvimento de fármacos de ação específica sobre os sistemas da proteína de transferência colesteril ester e lipoproteína lipase (PILLARISSETTI, SAXENA, 2003). Além disto, alguns trabalhos têm dado enfoque a enzimas como esqualeno sintetase, esqualeno

epoxidase e oxidoesqualeno ciclase, como possíveis alvos terapêuticos (CHUGH, RAY, GUPTA, 2003).

Finalmente, novas áreas em desenvolvimento incluem os sistemas de lipoproteínas recombinantes e terapias gênicas, nestas estão sendo estudados casos de transferência gênica na parede arterial para induzir a proteção e desobstrução das oclusões (SIRTORI, 1995; STEIN, STEIN, 2003).

1.4 CHALCONAS

As chalconas, consideradas como intermediários essenciais na biossíntese dos flavonóides, são abundantemente encontradas na natureza em plantas rasteiras ou superiores (KANEKO, HWANG EI, OHNISHI *et al*, 2003). Quimicamente, possuem a nomenclatura (2*E*)-1,3-difenilprop-2-en-1-ona, sendo definidas como cetonas aromáticas α , β -insaturadas, constituídas por dois anéis benzênicos conectados por uma ponte de 3 carbonos, tendo conjugados um grupamento carbonílico e uma porção olefínica. Diferentemente dos flavonóides, as chalconas não possuem o anel pirânico, que é formado pela adição do oxigênio à posição 2 das chalconas e subsequente ciclização com a cadeia de 3 átomos de carbono e o anel A (Figura 2) (CESARIN, FERREIRA, BRAZ, 2001).

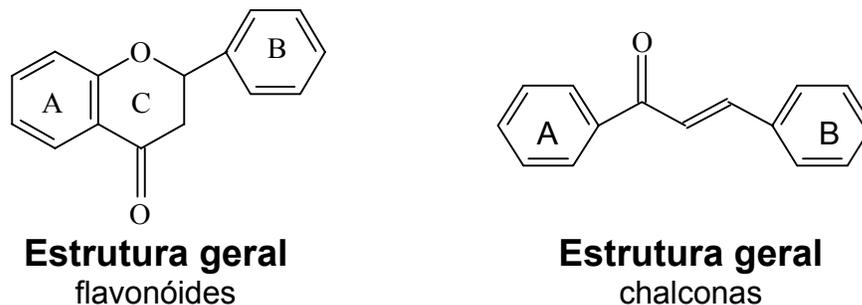


Figura 2. Estrutura química geral dos flavonóides e de seus precursores, as chalconas, demonstrando a designação dos anéis aromáticos (A, B e C).

De acordo com a natureza dos substituintes, podemos classificar as interações quanto aos efeitos estéricos causados por substituintes volumosos, aos efeitos eletrônicos decorrentes da diferença de eletronegatividade entre átomos ou grupos substituintes, ou a presença de sítios ácido/base de Lewis possibilitando a formação de ligações de hidrogênio e/ou complexos intra- e intermoleculares (CESARIN, FERREIRA, BRAZ, 2001). Desta forma, as alterações estruturais mais descritas para as chalconas são: substituições nos anéis A e B em diferentes posições (JURCSAK, ZAMINI, 1999) e adições halogênicas na dupla ligação olefínica (BIEBER, 1999). Os processos de isomerizações cis-trans para as chalconas, também foram relatados (IWATA, NISHINO, INOUE *et al.*, 1997).

1.4.1 Efeitos biológicos

Diversos experimentos utilizando culturas celulares *in vitro*, demonstraram a ação de algumas chalconas na inibição da proliferação celular de tumores malignos em diferentes linhagens celulares humanas como: HGC-27 (câncer gástrico) (SHIBATA, 1994); HeLa (carcinoma cervical) (IWATA, NISHINO, NAGATA *et al.*, 1995); PANC-1 (câncer pancreático); GOTO (neuroblastoma); MCF-7 (câncer de mama) (CALLISTE, LE BAIL, TROUILLAS, 2001); K562 e HL-60 (leucemia) (SAYDAM, AYDIN, SAHIN *et al.*, 2003).

A atividade citotóxica de algumas chalconas já foi relacionada a diferentes mecanismos de ação dentre os mais citados estão: (i) inibição da incorporação celular da timina, uridina e leucina, inibindo desta forma a síntese de RNA, DNA e proteínas; (ii) inibição não-competitiva da interação entre 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno e a glutathione S-transferase (GST) (DIMMOCK, ELIAS, BEAZELY *et al.*, 1999); (iii) desestabilização dos microtúbulos, através da competição com a colchicina pelo sítio ativo da tubulina, provocando um decréscimo no crescimento tumoral, alquiação do processo mitótico (LAWRENCE, MCGOWN, DUCKI, 2000; LAWRENCE, RENNINSON, MCGOWN, 2001); (iv) inibição da interação entre a oncoproteína MDM2 e a proteína de supressão tumoral p53, levando a um aumento da atividade transcripcional da p53, reativando a integridade genômica (STOLL, RENNEN, HANSEN *et al.*, 2001); (v) inibição da liberação de histamina, possivelmente através da inibição da proteína C quinase (PKC), já que está

enzima constitui um importante receptor para certos tipos de tumores, exercendo uma atividade antitumoral (MIDDLETON, FUJIKI, SAVLIWALA *et al.*, 1987).

A aplicação das chalconas na quimioprevenção do câncer está relacionada a interação com ácidos nucléicos e enzimas relacionadas como já foi relatado, no entanto é no tratamento quimioterápico que estes compostos ganham destaque, devido a seu potencial de restaurar a sensibilidade celular, através da inibição da glicoproteína-P (uma proteína de membrana responsável pela exportação de fármacos para o meio extracelular), a qual após longa exposição ao tratamento quimioterápico encontra-se ativa e super expressa, o que acaba inibindo a ação quimioterápica (BOIS, BENEY, BOUMENDJEL *et al.*, 1998).

Em relação a atividade antibacteriana, a efetividade das chalconas e seus derivados contra microorganismos Gram positivos é frequentemente, maior do que contra bactérias Gram negativas, no entanto, alguns análogos também podem inibir o crescimento de microorganismos Gram negativos (OPLETALOVÁ, 2000). Já foram relatadas inibições para as bactérias: *Micrococcus luteus* (INAMORI, BABA, TSUJIBO *et al.*, 1991), *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* (ALCARÁZ, BLANCO, PLUIG *et al.*, 2000), *Staphylococcus epidermidis* (DIMMOCK, ELIAS, BEAZELY *et al.*, 1999), dentre outras.

O mecanismo de ação através do qual as chalconas e seus análogos exercem seus efeitos antifúngicos, ainda não foi completamente elucidado, no entanto, a hipótese de maior repercussão sugere que a presença e reatividade da porção vinílica da molécula, torna possível a interação com os grupos tiols de enzimas, como quitina sintase e β -(1,3)-glucana sintase, que catalisam a síntese do maior número de polímeros da parede celular fúngica, agindo desta forma, como agente fungicida e fungistático. Da mesma forma, como é esperada a redução da ligação olefínica é responsável pelo desaparecimento da atividade antifúngica destes compostos (OPLETALOVÁ, SEDIVY, 1999; LÓPEZ, CASTELLI, ZACCHINO *et al.*, 2001).

Diversas chalconas e alguns análogos avaliados apresentaram inibição para os fungos: *Candida albicans* (SATO, TISUCHIYA, AKAGIRI *et al.*, 1997; HEGAZI, EL HADY, 2001), *Cladosporium cucumersinum* (GAFNER, WOLFENDER, MAVI *et al.*, 1996), *Cryptococcus neoformans* (ELSOHLY, JOSHI, NIMROD *et al.*, 2001) e *Saccharomyces cerevisiae* (LOPÉZ, CASTELLI, ZACCHINO *et al.*, 2001).

A atividade antiviral de uma grande variedade de chalconas, foi identificada, após modificações moleculares na estrutura química de uma flavona 4',5-dihidroxi-3,3',7-trimetoxiflavona (Figura 3), isolada da *Agastache rugosa* KUNTZE, que apresentava potente atividade contra o picornavírus (ISHITSUKA, OHSAWA, OHIWA *et al.*, 1982). A abertura da cadeia carbônica do anel C desta flavona, originou inicialmente a chalcona 4'-metoxi-2'-hidroxi-4,6'-dimetoxichalcona (Figura 3), que proporcionou a perda da atividade contra o picornavírus, inibindo fortemente outro tipo de vírus, o rinovírus humano (ISHITSUKA, NINOMIYA, OHSAWA *et al.*, 1982).

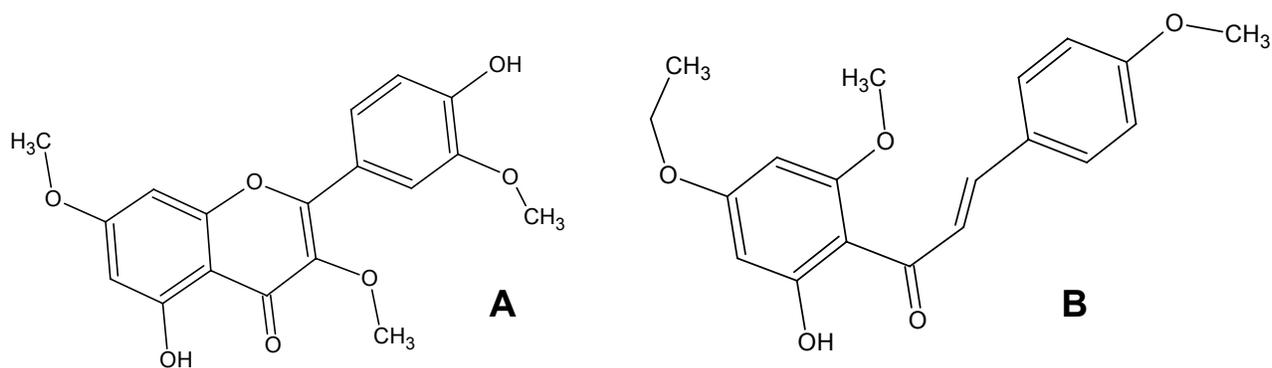


Figura 3. Estrutura química da 4',5-dihidroxi-3,3',7-trimetoxiflavona (A) e da 4'-etoxi-2'-hidroxi-4,6-dimetoxichalcona (B).

Acredita-se que as chalconas contendo um grupo aril hidroxi podem adotar arranjos estéricos favoráveis à coordenação com íons metálicos, além disso podem bloquear a etapa de desmembramento viral, embora, não exerça efeito na anexação ou entrada de partículas virais no interior da célula (SANTOS, 2000). No entanto, assim como um grande número de fármacos antivirais, as chalconas não impossibilitam a resistência e a dependência dos vírus mutantes, apesar de reduzir a infectividade o vírus resistente não perde sua atividade patológica (YASIN, AL NAKIB, TYRREL, 1990).

Além do rinovírus humano tipo-2, algumas chalconas apresentaram ação antiviral para o polivírus tipo-1 (cepa de Mahoney), rinovírus tipo-9, ECHO-6 e parainfluenza virus (EDENHARDER, RAUSCHER, PLATT, 1997; DIMMKOK, ELIAS, BEAZELY *et al.*, 1999). HATANO e cols. (1988), citam outra importante inibição viral relatada para a Licochalcona (Figura 4), ela atua inibindo a formação de células OKM-1, as quais são infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana.

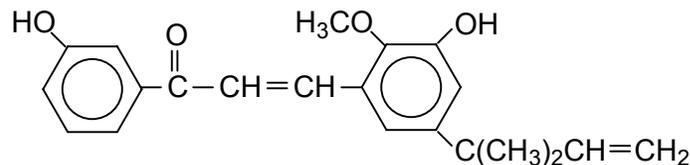


Figura 4. Estrutura química da Licochalcona A

O estudo dos efeitos das chalconas sobre a atividade protozoária tem sido intensamente relatados tanto para a forma epimastigota (forma flagelada encontrada na corrente sanguínea do hospedeiro, responsável pelo processo de reprodução) quanto para a forma promastigota (forma flagelada infectante, responsável pela reprodução parasitária) (LUNARDI, GUZELA, 1998). Dentre os parasitas estudados encontram-se: *Leishmania major*, *Leishmania donovani*, *Plasmodium falciparum*, *Tripanossoma cruzi* (RAM, SAXENA, SRIVASTAVA *et al.*, 2000; SAIRAFIANPOUR, KAISER, CHRISTENSEN *et al.*, 2002; LUNARDI, GUZELA, RODRIGUES *et al.*, 2003).

Muitas elucidações necessitam ser feitas em relação ao metabolismo energético mitocondrial e outros aspectos bioquímicos parasitários, para que seja possível elucidar o mecanismo de ação das chalconas. Alguns estudos têm sugerido: (i) inibição do consumo de O₂ e produção de CO₂; (ii) inibição da incorporação da timidina ao DNA parasitário, dificultando o processo de replicação; (iii) inibição da enzima desidrogenase mitocondrial (ZHAI, CHEN, BLOM *et al.*, 1999; CHEN, ZHAI, CHRISTENSEN *et al.*, 2001). Questiona-se ainda a ação citotóxica direta das chalconas sobre os parasitas, ou a simples ativação macrofagocitária que seria responsável pelo processo de morte parasitária (KAYSER,

KIDERLEN, 2001). Os baixos índices de resistência apresentados após tratamento com as chalconas sugerem que alguns compostos, como a 1-(2,5-diclorofenil)-3-(4-quinolinil)-2-propen-1-ona, sejam ativos contra parasitas resistentes à fármacos como a cloroquina (LI, KENYON, COHEN *et al.*, 1995).

A atividade anti-inflamatória de uma série de chalconas e seus derivados têm instigado uma série de idéias promissoras, no sentido de incentivar a pesquisa e utilização destas moléculas como novos agentes anti-inflamatórios, combinando se possível uma potente inibição na liberação de mediadores químicos, que ocorre na degranulação de neutrófilos e mastócitos, e na ativação de microglias e macrófagos (DIMMOCK, ELIAS, BEAZELY *et al.*, 1999).

Já foram citadas para diferentes chalconas diversas propriedades anti-inflamatórias, as possíveis ações destes fármacos são comumente relatadas através da: (i) inibição da liberação de β -glucuronidase e lisosima de neutrófilos estimulados com formil-Met-Leu-Phe/citochalasina B (HSIEH, TSAO, WANG *et al.*, 2000); (ii) inibição dos efeitos da formação de óxido nítrico, em microglias estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS), agindo como seqüestradores de óxido nítrico (HERENCIA, LOPÉZ-GARCIA, UBEDA *et al.*, 2002; ROJAS, PAYA, DOMINGUEZ *et al.*, 2002); (iii) supressão da expressão da enzima ciclooxygenase-2 (COX-2) (KO, TSAO, YU *et al.*, 2003); (iv) supressão da biossíntese da Interleucina-1 (IL-1) (DIMMOCK, ELIAS, BEAZELY *et al.*, 1999).

Em geral, os parâmetros estruturais necessários para uma interessante atividade anti-inflamatória estão na presença de substituintes na posição orto do anel aromático A, grupamentos eletrosacadores, grupos lipofílicos no anel V e a presença do grupo cetônico α , β -insaturado (KO, TSAO, YU *et al.*, 2003).

Um número de chalconas polihidroxiladas apresentou atividade estrogênica, interagindo diretamente com o receptor, estimulando a resposta transcripcional estrogênio-dependente e promovendo o crescimento de células como as MCF 7, estrogênio-dependentes (DIMMOCK, ELIAS, BEAZELY *et al.*, 1999).

O estudo da aplicabilidade biológica destes compostos sintéticos indicou potente atividade antinociceptiva em testes de analgesia com camundongos, utilizando o ácido acético (i. p.) como indutor de constrição abdominal. A chalcona 1,3-difenil-2-propen-1-ona (numerada neste estudo como 7), apresentou valor de ID₅₀ de 99,7 µmol/Kg, tornando-se equipotente a aspirina e ao paracetamol, dois fármacos tradicionais amplamente utilizados na clínica (CORREA, CECHINEL-FILHO, SANTOS *et al.*, 2001).

Dentre as inúmeras atividades já descritas para as chalconas, podemos citar, ainda, o potencial de inibição enzimática para: (i) glutathione S-transferase (GST), contribuindo na sensibilização celular tumoral aos fármacos quimioterápicos (SCHECTER, ALAOUI-JAMALI, BATISTI *et al.*, 1992); (ii) epóxido hidroxilase citosólica, diminuindo a citotoxicidade celular (MORISSEAU, DU, NEWMAN *et al.*, 1998); (iii) enzimas mitocondriais como succinoxidase, desidrogenase, fumarato redutase, monoamino oxidase, auxiliando na atividade anti-parasitária (CHEN, ZHAI, CHRISTENSEN, 2001); (iv) 15-hidroxi prostaglandina desidrogenase, prevenindo a formação de úlcera gástrica (DIMMOCK, ELIAS, BEAZELY *et al.*, 1999); (v) iodotironina monodeiodinase de ratos, inibindo a catálise da triiodotironina (FUJITA, SAKUMA, SUMIYA *et al.*, 1992).

1.5 JUSTIFICATIVA

As doenças cardiovasculares constituem, atualmente, a principal causa de morte em indivíduos na faixa etária de 40 a 50 anos, além de representarem a maior redução na expectativa de vida, cerca de duas vezes os índices de doenças como o câncer (ROSS, 1999). O impacto econômico das doenças cardiodegenerativas foi avaliado pela Associação Americana do Coração, em 2001 e, estima-se atingir a margem dos 300 bilhões de dólares anuais; o tratamento farmacêutico representa em torno de 2-6% do total de custos despendidos à estes pacientes (MANSUR, GOMES, AVAKIAN *et al.*, 2001).

Várias classes de compostos orgânicos biossintetizados pelas plantas como alcalóides, terpenóides, flavonóides têm gerado resultados interessantes na prevenção de doenças cardiovasculares, em modelos experimentais *in vivo* e *in vitro* (ANILA, VIJAYALAKSHMI, 2002, KERCKHOFFS, BROUNS, HORNSTRA *et al.*, 2002). Em vista destes resultados e da multifuncionalidade biológica e acentuada ocorrência natural das chalconas (intermediários essenciais na biossíntese dos flavonóides) se caracteriza condições experimentais ideais para o estabelecimento de estudos que avaliem parâmetros estruturais na obtenção de compostos biologicamente ativos, que possam auxiliar na terapêutica das doenças cardiodegenerativas (DIMMOCK, ELIAS, BEAZELY *et al.*, 1999; SPRIBILLE, FORKMANN, 1982).

E finalmente é importante ressaltar que a avaliação da atividade hipolipemiante, apesar de muitos estudos em relação a plantas ricas em flavonóides em geral (MIRANDA, STEVENS, IVANOV *et al.*, 2000), para as chalconas só foi relatada em estudos preliminares realizados na NIQFAR/UNIVALI onde se evidenciou, através da hiperlipidemia induzida por Triton WR 1339, uma significativa atividade do composto 1-fenil-3-(4-clorofenil)-2-propen-1-ona em relação aos grupos controle normal e Triton WR 1339 (SANTOS, 2000).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Avaliar o potencial de 16 chalconas e 4 derivados bromados, previamente sintetizados, como agentes hipolipemiantes, considerando parâmetros estruturais das moléculas, para a obtenção de dados que correlacionem a estrutura química com a atividade biológica aferida, orientando desta forma a síntese de novos compostos bioativos.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar, através da espectroscopia de ressonância magnética nuclear de próton, os compostos C11 a C20 e B1 a B4, previamente sintetizados e, ainda, não caracterizados por este método;
- Avaliar o potencial hipolipemiante de 16 chalconas e 4 derivados sintéticos, através de um “screening” na pesquisa de novos fármacos, utilizando o modelo de hiperlipemia aguda induzida pela administração de Triton WR 1339 (em ratos);
- Determinar o potencial hipolipemiante das chalconas e seus derivados sintéticos em estudo, através do modelo de hiperlipemia crônica induzida pela dieta hipercalórica (em ratos);
- Realizar um estudo preliminar da correlação estrutura-atividade das chalconas estudadas;
- Avaliar de maneira preliminar os possíveis mecanismos de ação envolvidos no efeito hipolipemiante das chalconas e derivados sintéticos avaliados.

3. METODOLOGIA

3.1 Síntese das chalconas e dos derivados di-bromados avaliados

Os compostos avaliados neste trabalho foram sintetizados pela mestrandia Lorena dos Santos, enquanto graduanda do curso de Farmácia, em um projeto financiado pelo ProBIC/UNIVALI, que gerou o trabalho de conclusão de curso intitulado “Síntese de chalconas de interesse biológico”, sob a orientação do Prof.º Rogério Corrêa e co-orientação do Prof.º Valdir Cechinel Filho do Núcleo de Investigações Químico-Farmacêuticas–NIQFAR, pertencente a Universidade do Vale de Itajaí – UNIVALI.

Os métodos utilizados para a síntese dos compostos propostos basearam-se na condensação aldólica, sendo que foram utilizados dois diferentes meios reacionais para a síntese (Figura 5).

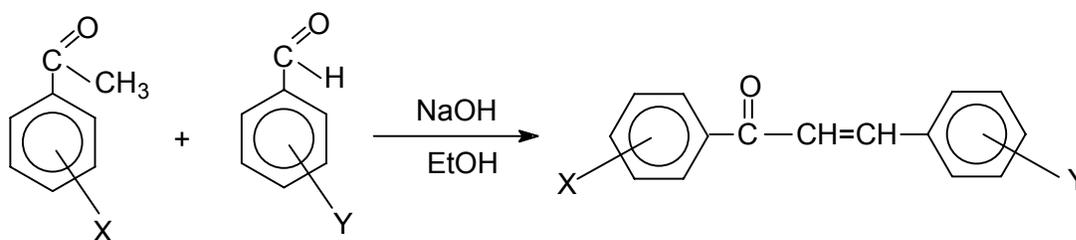


Figura 5. Rota sintética para a obtenção das chalconas

Como principal método, iniciou-se o processo de síntese preparando uma mistura equimolar de um benzaldeído substituído (23g; 22mL) e uma acetofenona substituída (26g; 20,15mL), dissolvidos em 100mL de água, em meio básico (11g de hidróxido de sódio) - o NaOH é muito cáustico e pode causar queimaduras severas. A solução foi deixada sob agitação mecânica a temperatura ambiente durante uma noite, ou até que a agitação não fosse mais possível. A formação do produto reacional foi acompanhada cromatograficamente e, caracterizada pelo aparecimento de um precipitado colorido característico, ao término da reação, o produto foi filtrado num Buchner e lavado

sucessivas vezes com água destilada fria, até que as águas de lavagens se apresentaram neutras ao teste com papel de tornassol. O produto foi, então, lavado com 20ml de álcool retificado gelado e submetido à secagem por dessecador à vácuo, na presença de pentóxido de fósforo. A chalcona impura foi recristalizada com álcool retificado aquecido a 50°C, novamente filtrada e seca, obtendo-se o produto puro. Não se fez necessário à utilização de outros métodos de purificação como cromatografia de coluna (VOGEL, 1988).

Nas reações que necessitaram de condições energéticas mais drásticas, a mistura foi submetida a um refluxo contínuo, acompanhado cromatograficamente, para a monitoração do término da reação. Caso não houvesse precipitação, a mistura sofria uma extração com clorofórmio, a qual foi seca com sulfato de magnésio anidro, o solvente foi evaporado e o resíduo purificado foi recristalizado (LAWRENCE, RENNINSON, MCGOWN *et al.*, 2001).

Em outro método testado, a mistura equimolar de benzaldeído e acetofenona em meio reacional, após agitação por uma noite foi vertida em água e depois neutralizada com HCl 10% p/v, e o produto obtido foi recristalizado em água-etanol 92,5% (PANDEYA, SRIRAN, NATH *et al.*, 1999).

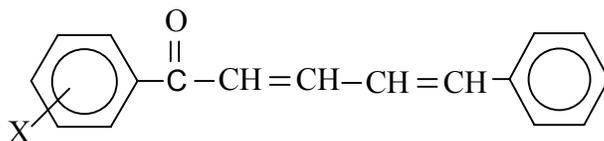


Figura 6. Estrutura geral das chalconas obtidas a partir do cinamaldeído

3.1.1. Mecanismo geral de reação da síntese de chalconas

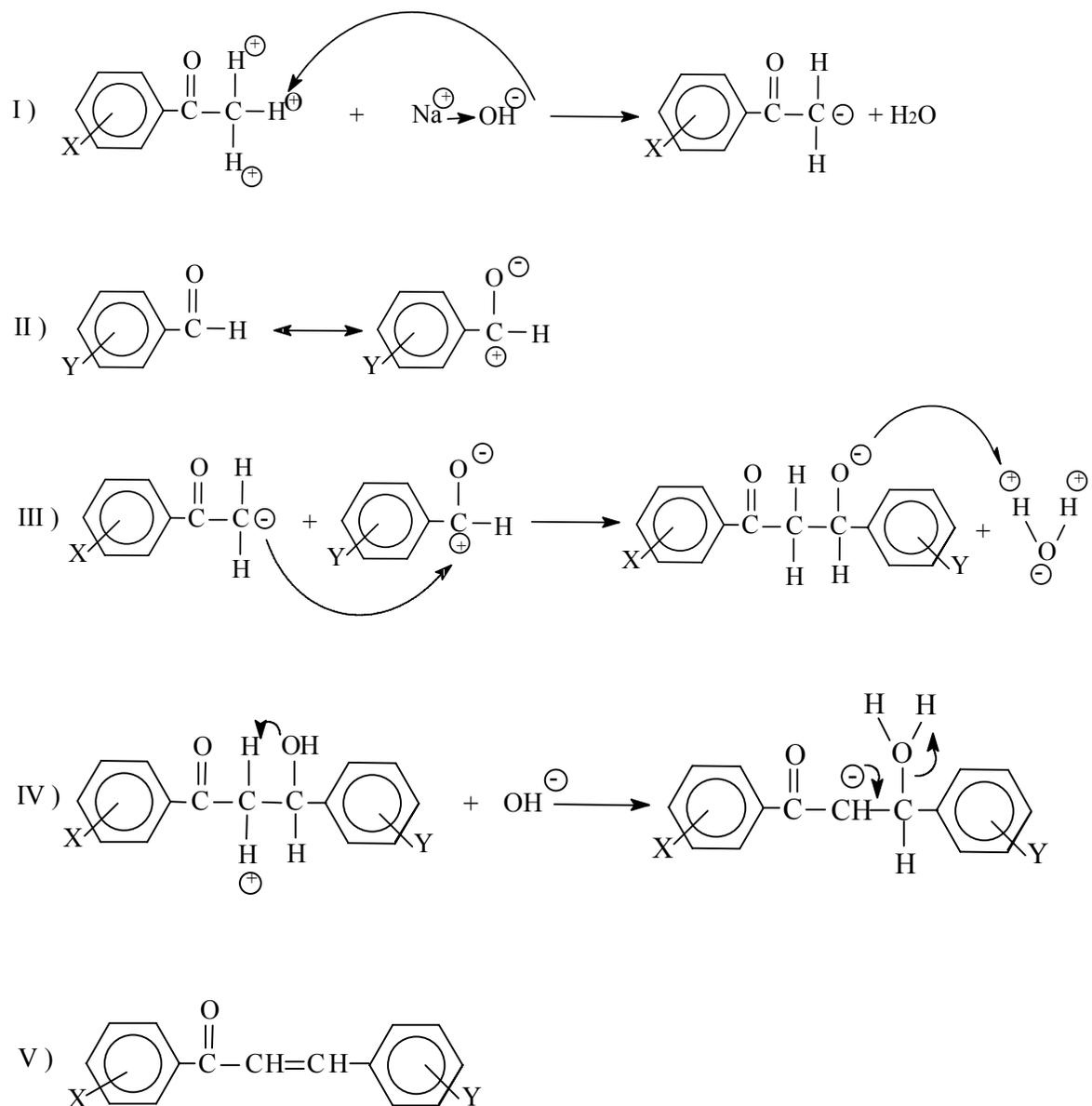
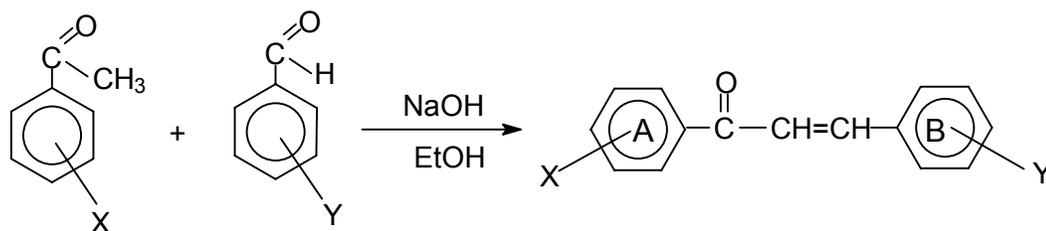


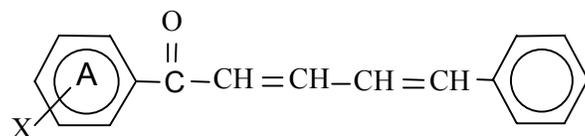
Figura 7. Mecanismo reacional para síntese das chalconas



COMPOSTOS	X	Y
C1	4-Cl	4-H
C2	3,4-Cl	4-N(CH ₃) ₂
C3	4-Cl	4-Cl
C4	4-CH ₃	4-Cl
C5	4-Br	4-Cl
C6	4-Br	4-Cl
C7	4-H	4-H
C8	4-H	4-Cl
C9	3,4-Cl	4-H
C10	3,4-Cl	4-Cl
C13	4-H	4-CH ₃
C14	4-H	4-OH
C15	4-H	4-NO ₂
C16	4-H	4-OCH ₃
C17	4-H	2-OCH ₃
C18	4-CH ₃	4-N(CH ₃) ₂
C19	4-CH ₃	3-OCH ₃

Figura 8. Substituintes dos anéis aromáticos A e B das 17 chalconas sintetizadas

As chalconas obtidas a partir do cinamaldeído, foram sintetizadas pelo mesmo método da condensação aldólica, sendo submetidas aos mesmos procedimentos de purificação e identificação. Quimicamente apresentam a estrutura geral (Figura 9), com maior conjugação no sistema insaturado carbonil-olefina, que possibilita classificar este grupo como derivados substituídos do butadieno (SANTOS, 2000).



COMPOSTOS	X
C11	4-OCH ₃
C12	2-OH
C20	H

Figura 9. Substituintes do anel aromático A das 3 chalconas sintéticas obtidas a partir do cinamaldeído

Os derivados di-bromados foram obtidos através de reação equimolar de chalconas substituídas previamente sintetizadas, com o bromo (Br₂) (SOLOMONS, 1996). O método utilizado foi a halo-adição, conforme a rota sintética abaixo:

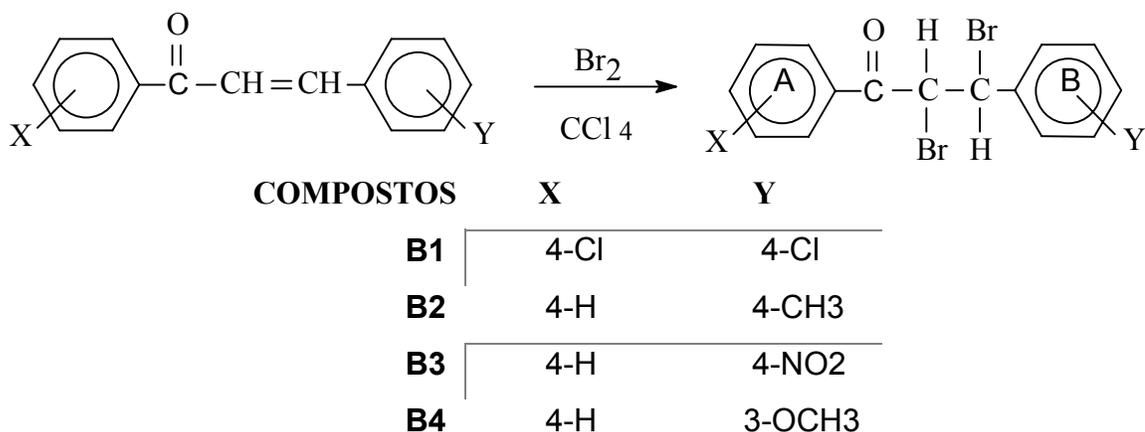


Figura 10. Rota sintética e substituintes dos anéis A e B dos 4 derivados di-bromados sintetizados.

A chalcona foi dissolvida primeiramente em tetracloreto de carbono anidro, adicionada em balão e submetida à agitação (solução 1). Uma solução de bromo em tetracloreto de carbono anidro foi gotejada lentamente sobre a solução 1, sob agitação

constante, à temperatura ambiente. Este gotejamento conferia a solução 1, uma coloração avermelhada que desaparecia com a agitação.

O término da reação foi confirmado por cromatografia de camada delgada, a mistura ao término da reação foi caracterizada apresentando uma coloração vermelha. O solvente do produto final foi evaporado à temperatura ambiente, depois de seco em dessecador na presença de pentóxido de fósforo, os compostos foram submetidos a recristalização com álcool retificado aquecido a 50°C, e então determinados os rendimentos. Não houve necessidade da utilização de outros métodos de purificação, uma vez que os compostos já se mostraram puros (VOGEL,1988) Posteriormente foram realizadas as caracterizações físico-químicas e estruturais (SANTOS, 2000).

3.1.2 Mecanismo de reação da síntese dos derivados di-bromados

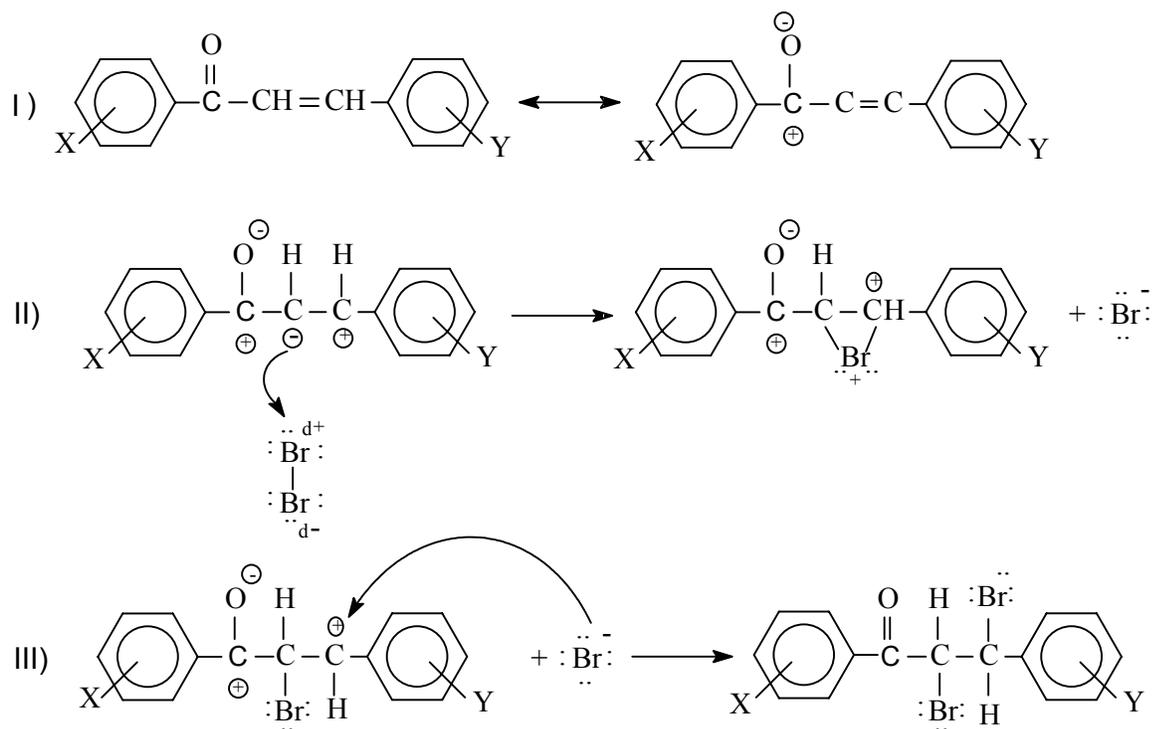


Figura 11. Mecanismo reacional para síntese dos derivados di-bromados

Para o presente trabalho, propôs-se uma divisão dos compostos estudados em três grupos, de acordo com os efeitos ativadores nas reações de substituições eletrofilicas em anéis aromáticos das estruturas protótipos, conforme a tabela abaixo, esta divisão permitiu melhor classificação e interpretação das atividades biológicas aferidas.

Tabela 1. Classificação das chalconas de acordo com a presença de grupos substituintes com seus efeitos ativadores nas reações de substituição eletrofilica em aromáticos.

Substituintes	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Moléculas protótipo sem substituintes	C7, C20		
Substituintes desativadores	C1, C3, C5, C6, C8, C9, C10, C15, B1, B3		
Substituintes ativadores	C11, C12, C13, C16, C17, C19, B2, B4		

3.2 Caracterização química dos compostos sintetizados

O andamento das reações durante os procedimentos reacionais, bem como a pureza preliminar dos compostos, utilizando-se comparação com padrões dos reagentes, foram monitorados por cromatografia de camada delgada. Os procedimentos de purificação foram os usuais, por recristalização com solventes adequados. A caracterização de todos os compostos sintetizados foi realizada através de ponto de fusão (NIQFAR/UNIVALI), espectroscopia no infravermelho (NIQFAR/UNIVALI) e espectroscopia de ressonância magnética nuclear de próton (Central de análises químicas/UFSC).

Na técnica de cromatografia em camada delgada (CCD) foram utilizadas placas de silicagel Merck 60 F₂₅₄ pré-revestidas, com espessura de 200 µm, a base de alumínio. Em todos os procedimentos cromatográficos usou-se gradientes do sistema de solventes hexano: acetato de etila, atingindo diversas polaridades. Os solventes utilizados foram adquiridos comercialmente. Os “spots”, nas placas de cromatografia de camada delgada, foram visualizados através de luz UV (ondas curtas).

Para a recristalização dos compostos foi utilizado álcool etílico retificado, aquecido a uma temperatura de 54°C.

Os pontos de fusão, dos compostos obtidos, foram determinados com os equipamentos Microquímica APF-301 e Quimis 203, não sendo corrigidos.

As análises espectrométricas no infravermelho foram realizadas em espectrômetro interfotométrico, com transformada de Fourier, MB-100 - BOMEM Instruments. As amostras sólidas foram prensadas com brometo de potássio - KBr, obtendo-se pastilhas transparentes. Os espectros foram obtidos registrando transmitância versus número de onda (cm⁻¹).

Os espectros de RMN ¹H foram obtidos em espectrômetro de ressonância magnética nuclear Brucker AC-200F. Os deslocamentos químicos foram expressos em δ (ppm) em relação a um padrão de referência de tetrametilsilano (TMS). O solvente utilizado foi o dimetilsulfóxido-hexadeuterado (DMSO-d₆) adquirido comercialmente. As constantes de acoplamento (J) foram expressas em Hertz (Hz). As multiplicidades dos sinais são indicadas como segue: s=singlete, d=dublete, dd=duplodublete, t=tripleto e m=multiplote. Os espectros RMN¹H foram realizados na Central de Análises Químicas do Departamento de Química da UFSC.

3.2 Ensaio biológico com as chalconas C1, C3, C5 a C13, C15 a C17, C19, C20, e B1 a B4

3.2.1 Materiais

As chalconas sintéticas avaliadas neste trabalho foram cedidas pelo Núcleo de Investigações Químico-Farmacêuticas–NIQFAR, da Universidade do Vale de Itajaí – UNIVALI. As chalconas C2, C4, C16 e C18 foram excluídas dos ensaios biológicos por insuficiência quantitativa dos produtos de síntese.

Os reagentes Triton WR 1339, clorofórmio p.a., etanol p.a., metanol p.a., DMSO p.a. foram adquiridos junto à Sigma Chemical C.O. (St. Louis, MO, USA). Utilizou-se a Lovastatina Ranbaxy® 10 mg da linha genérica. Foram utilizados para as dosagens bioquímicas conjuntos de diagnósticos com princípios metodológicos enzimáticos da empresa Labtest Diagnóstica®.

3.2.2 Animais

Nos ensaios biológicos foram utilizados ratos Wistar EPM-M1, machos, de 45 e 120 dias, com peso variando de 130 ± 25 g e 200 ± 20 g, respectivamente. Estes animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina, ao Departamento de Bioquímica/CCB.

Os animais foram pesados e distribuídos em grupos de 6 indivíduos, de acordo com o peso obtido. Os mesmos permaneceram no laboratório por um período mínimo de adaptação de 7 dias antes da realização dos experimentos, mantidos em gaiolas plásticas, sob temperatura ambiente controlada ($\pm 25^{\circ}\text{C}$), com ciclo claro/escuro de 12 horas, recebendo dieta comercial e água *ad libitum*. Antes do início de cada experimento, os animais permaneceram em jejum de 12 horas.

O presente projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)/UFSC sob o número n ° 23080. 009607 / 2002 - 88, para a utilização dos animais, com o ofício de aprovação nº 149/CEUA/DAP/PRPG, o qual consta em anexo, no item III.

3.2.3 Modelo da Hiperlipidemia Induzida por Triton WR-1339

Para o estudo dos possíveis efeitos das chalconas e seus derivados sobre o metabolismo esteróico, utilizou-se inicialmente um modelo experimental, para “screening” de novos fármacos hipolipemiantes, segundo SCHURR e cols. (1972), para elevar os níveis lipêmicos séricos, de forma aguda com a administração do Triton WR-1339. Este detergente causa uma elevação sérica de colesterol e triglicérides em um tempo médio de 8 horas. Como avaliação bioquímica foram utilizados os parâmetros: concentração sérica de colesterol total, triglicérides e colesterol da HDL.

3.2.3.1 Protocolo experimental

Foram utilizados ratos Wistar EPM-M1 (n=6, 200 ± 20 g) que foram distribuídos em diferentes grupos experimentais. Antes de cada experimento os animais permaneceram em jejum de 12 horas. Todos os ratos receberam 0,5 mL de uma solução 0,9 % NaCl de Triton WR-1339 (62,5 mg/ml, i. p.), para indução da hiperlipidemia, e parte dos animais foram tratados com 1 mL das chalconas ou 1 mL da lovastatina (v. o.) junto com a administração de Triton WR-1339, as concentrações dos compostos avaliados são apresentadas na tabela abaixo. Um grupo controle recebeu somente Triton WR 1339 e, outro grupo normal não recebeu tratamento.

Tabela 2. Concentrações em mmol/Kg e em mg/Kg, dos compostos utilizados nos tratamentos de hiperlipemia induzida por Triton WR 1339 ou dieta hipercalórica.

COMPOSTOS	CONCENTRAÇÃO	
	mmol/Kg	mg/Kg
LOVASTATINA	2,5	1
GRUPO 1		
C7	28,85	6

C20	25,64	6
GRUPO 2		
C1	24,00	6
C3	21,66	6
C5	18,67	6
C6	20,91	6
C8	24,74	6
C9	21,66	6
C10	19,26	6
C15	23,71	6
B1	13,73	6
B3	14,53	6
GRUPO 3		
C11	22,73	6
C12	24,00	6
C13	27,03	6
C16	25,21	6
C17	25,21	6
C19	25,21	6
B2	15,71	6
B4	15,07	6

Após 8 horas da administração de Triton WR-1339, os animais foram anestesiados com éter etílico e, amostras de sangue foram coletadas via plexo ocular anterior, centrifugadas para a obtenção de amostras séricas, as quais posteriormente foram utilizadas para as determinações bioquímicas. Após a coleta sanguínea os animais foram sacrificados.

3.2.3.2 Análises bioquímicas

3.2.3.2.1- Determinação das concentrações de colesterol total

As determinações de colesterol total foram realizadas por método enzimático colorimétrico segundo ALLAIN e cols. (1974), onde os ésteres de colesterol são hidrolisados pela colesterol esterase a colesterol livre e ácidos graxos. O colesterol livre é

oxidado pela colesterol oxidase a colest-4-en-ona e peróxido de hidrogênio. Na presença de peroxidase e peróxido de hidrogênio, o fenol e a 4 aminoantipirina são oxidados formando a antipirilquinonímia que tem absorvidade máxima em 500nm.

3.2.3.2 Determinação das concentrações de triglicérides

As determinações de triglicérides foram realizadas mediante utilização do método enzimático colorimétrico, proposto por MCGOWAN e cols. (1983), onde o glicerol liberado na hidrólise dos triglicérides, catalisado pela lipoproteína-lipase é convertido pela ação da glicerolquinase em glicerol-3-fosfato, que é oxidado a dihidroxiacetona e peróxido de hidrogênio na presença de glicerolfosfato oxidase. A reação de acoplamento que ocorre entre o peróxido de hidrogênio, 4-aminoantipirina e um corante fenólico é catalisada pela peroxidase produzindo a quinoneimina que tem máximo de absorbância em 540nm.

3.2.3.3 Determinação das concentrações de colesterol da HDL

O colesterol da HDL foi determinado através da precipitação quantitativa das lipoproteínas VLDL e LDL, pelo ácido fosfotúngstico e cloreto de magnésio, seguido de centrifugação. Após centrifugação, o colesterol da HDL foi determinado no sobrenadante utilizando o método enzimático colorimétrico proposto por ALLAIN e cols. (1974), já apresentado anteriormente.

3.2.4 Modelo da Hiperlipidemia Induzida pela Dieta Hipercalórica

Um segundo modelo experimental foi avaliado somente para as chalconas que se mostraram ativas no primeiro modelo apresentado anteriormente, neste segundo modelo, proposto por ROTHWELL e cols (1982), a hiperlipidemia foi induzida de forma crônica, através da administração de dieta hipercalórica durante um período de 30 dias (Tabela 3). Como avaliação bioquímica foram utilizados os parâmetros: concentração sérica de colesterol total, triglicérides, HDL-colesterol, VLDL e LDL-colesterol e, para os compostos

que apresentaram melhores resultados neste modelo foram determinadas as concentrações hepáticas de colesterol total e triglicérides.

Tabela 3. Composição e cronograma da dieta hipercalórica, proposta por ROTHWELL e cols (1982)

ORDEM	COMPONENTES DA DIETA	PESOS (g)	DIAS
1	Biscoito de chocolate Suspiros Cheetos	5g de cada componente a cada dia *	1 ° dia 2 ° dia 3 ° dia
2	Pé-de-moleque Chocolate Biscoito de chocolate	5g de cada componente a cada dia *	4 ° dia 5 ° dia 6 ° dia
3	Amendoim Baconzitos Suspiros	5g de cada componente a cada dia *	7 ° dia 8 ° dia 9 ° dia
4	Cheetos Rosquita de leite Amendoim	5g de cada componente a cada dia *	10 ° dia 11 ° dia 12 ° dia
5	Amendoim Biscoito de chocolate Baconzitos	5g de cada componente a cada dia *	13 ° dia 14 ° dia 15 ° dia
6	Rosquita de leite Baconzitos Amendoim	5g de cada componente a cada dia *	16 ° dia 17 ° dia 18 ° dia
7	Bolacha sortida Batata frita Amendoim	5g de cada componente a cada dia *	19 ° dia 20 ° dia 21 ° dia
8	Chocolate Queijo Pé-de-moleque	5g de cada componente a cada dia *	22 ° dia 23 ° dia 24 ° dia
9	Bolacha sortida Pé-de-moleque Queijo	5g de cada componente a cada dia *	25 ° dia 26 ° dia 27 ° dia
10	Queijo Rosquita de leite Bolacha sortida	5g de cada componente a cada dia *	28 ° dia 29 ° dia 30 ° dia

* Foi acrescido mais 15g de ração comercial padronizada para complementação da dieta, equivalente ao período de um dia.

3.2.4.1 Protocolo experimental

Foram utilizados ratos Wistar EPM-M1 (120 ± 25 g) que permaneceram durante 7 dias, em adaptação, com livre acesso a comida e água, depois disto foram distribuídos em diferentes grupos: grupo normal (dieta comercial padrão); grupo hipercalórico (dieta hipercalórica); grupo fármaco controle (dieta padrão + lovastatina); grupo fármaco teste (dieta hipercalórica + lovastatina); grupo teste normal (dieta padrão + chalconas); grupo teste hipercalórico (dieta hipercalórica + chalconas). Tanto as chalconas quanto a lovastatina, foram administradas diariamente (v. o.) nas concentrações apresentadas na Tabela 2. Amostras de sangue foram coletadas via plexo ocular anterior no tempo zero e após 30 dias de tratamento, sendo centrifugadas para a obtenção das amostras séricas, as quais foram submetidas as análises bioquímicas, e para algumas chalconas o fígado foi retirado para dosagem de colesterol e triglicérides.

3.2.4.2 Análises bioquímicas do tecido hepático

Para a determinação tecidual de colesterol e triglicérides, procedeu-se a extração de lipídeos, onde alíquotas do fígado foram lavadas em solução de cloreto de sódio (NaCl) 0,85%. As amostras foram secas em papel filtro, pesadas (cerca de 100 mg) e homogeneizadas (1:3, p/v) em água destilada. Após centrifugação a 7.000 rpm durante 10 minutos, as amostras foram utilizadas para avaliação do conteúdo de colesterol e triglicérides, pela metodologia colorimétrica enzimática, já descrita anteriormente. A concentração de proteína no homogenato foi determinada conforme método de LOWRY e cols. (1951) modificado por HARTREE (1972), utilizando albumina como padrão e os resultados apresentados em termos de $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína.

3.2.4.3 Análises bioquímicas séricas

Para a avaliação do perfil lipêmico dos animais foram utilizados os parâmetros: concentração sérica de colesterol total, triglicérides e colesterol da HDL, através de métodos enzimáticos já descritos anteriormente no item 3.2.3.2.

Como complemento à avaliação do perfil lipídico, este modelo nos permitiu determinar, através de cálculo matemático os valores séricos das concentrações de colesterol das lipoproteínas VLDL e LDL, utilizando para isto a fórmula proposta por FRIEDEWALD e cols. (1972), válida se as concentrações de triglicérides não ultrapassarem o valor de 400 mg/dL ou 4,5 mmol/L, onde:

- Colesterol da LDL = colesterol total – [Colesterol da HDL – Colesterol da VLDL]
- Colesterol da VLDL = $\frac{\text{triglicérides}}{5}$

O índice anti-aterogênico (IAA) foi calculado como análise complementar, através de tratamento matemático dos dados, onde:

- $$\text{IAA [\%]} = \left\{ \frac{\text{Colesterol da HDL}}{\text{Colesterol total} - \text{Colesterol da HDL}} \right\} \times 100$$

3.3 Análise Estatística

Todos os dados obtidos foram analisados estatisticamente utilizando-se o testes ANOVA One Way suplementado pelo teste de comparação múltipla de Turkey-Kramer quando se fez necessário, admitindo-se um nível de significância de $p < 0,05$, $p < 0,01$, e $p < 0,001$.

4. RESULTADOS

4.1 Síntese das chalconas sintéticas e seus derivados

Em geral, os processos de síntese foram realizados em um intervalo de 4 a 24 horas, sendo que o término da reação foi de fácil visualização e identificação através do uso da técnica de cromatografia de camada delgada. Observou-se, concomitante ao término da reação o aparecimento de um precipitado colorido característico, o qual foi reconhecido como o produto formado.

Os compostos sintetizados a partir do cinamaldeído (C11, C12 e C20) apresentaram maior conjugação no sistema insaturado carbonil-olefina. Esta conjugação adicional possibilita classificar esse subgrupo como derivados substituídos do butadieno, podendo estes ser utilizados como dienos em reações de ciclização do tipo Diels-Alder.

Foram obtidos, em geral, compostos com bom grau de pureza, não sendo necessário utilizarmos o método de cromatografia em coluna. Os rendimentos obtidos compreendem a faixa de 50-99% (Tabela 4).

Tabela 4. Rendimentos das chalconas e seus derivados sintetizados

COMPOSTO	REND.%	REND. g
C1	98%	77,59*
C2	87%	10,00*
C3	89%	41,78*
C4	80%	10,00*
C5	97%	09,62*
C6	77%	06,81*
C7	77%	35,00*
C8	74,13%	23,12*
C9	68%	25,66*
C10	96%	52,03*

C11	80%	10,00*
C12	96%	19,88*
C13	90%	27,50*
C14	98%	15,38*
C15	90%	36,17*
C16	99%	30,75*
C17	94%	48,41*
C18	81%	13,00*
C19	85%	16,90*
C20	50%	10,00*
B1	85%	1,53*
B2	90%	1,54*
B3	96%	1,57*
B4	97,6%	1,63*

*Os rendimentos foram calculados após procedimento de recristalização (álcool à 54°C).

4.2 Caracterização química das chalconas e seus derivados sintetizados

4.2.1 Métodos de espectroscopia de infra-vermelho e ponto de fusão

Todos os compostos foram previamente sintetizados e identificados nos laboratórios do NIQFAR/UNIVALI, sob a orientação dos professores Valdir Cechinel Filho e Rogério Corrêa.

C 1 (2E)-1-(4-clorofenil)-3-fenilprop-2-en-1-ona

PM: 242,5g; p.f. (°C): 85-92; Rend.: 98%; FT-IV (Pastilha KBr, cm^{-1}): 1661 (ν C=O), 1606 (ν C=C).

C 2 (2E)-1-(3,4-diclorofenil)-3-[4-(dimetilamino)fenil]prop-2-en-1-ona

PM: 320g; p.f. (°C): 124-126; Rend.: 85%; FT-IV (Pastilha KBr, cm^{-1}): 1649 (ν C=O), 1612 (ν C=C).

C 3 (2E)-1,3-di(4-clorofenil)prop-2-en-1-ona

PM: 277g; p.f. (°C): 160-163; Rend.: 89%; FT-IV (Pastilha KBr, cm^{-1}): 1657 (ν C=O), 1605 (ν C=C).

C 4 (2E)-3-(4-clorofenil)-1-(4-metilfenil)prop-2-en-1-ona

PM: 240,5 g; p.f. (°C): 160-163; Rend.: 80%; FT-IV (Pastilha KBr, cm^{-1}): 1657 (ν C=O), 1605 (ν C=C).

C 5 (2E)-1-(4-bromofenil)-3-(4-clorofenil)prop-2-en-1-ona

PM: 321,4g; p.f. (° C): 161-164; Rend.: 97%; FT-IV (Pastilha KBr, cm^{-1}): 1657 (ν C=O), 1604 (ν C=C).

C 6 (2E)-1-(4-bromofenil)-3-fenilprop-2-en-1-ona

PM: 286,9g; p.f. (°C): 157-160°C; Rend.: 64,8%; FT-IV (Pastilha KBr, cm^{-1}): 1660 (ν C=O), 1605 (ν C=C).

C 7 (2E)-1,3-difenilprop-2-en-1-ona

PM: 208g; p.f. (°C): 70,4-73,2; Rend.: 77%; FT-IV (Pastilha KBr, cm^{-1}): 1661 (ν C=O), 1605 (ν C=C).

C 8 (2E)-3-(4-clorofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona

PM: 242,5g; p.f. (°C): 122-125; Rend.: 74,13%; FT-IV (Pastilha KBr, cm^{-1}): 1658 (ν C=O), 1604 (ν C=C).

C 9 (2E)-1-(3,4-diclorofenil)-3-fenilprop-2-en-1-ona

PM: 277g; p.f. (°C): 96-100; Rend.: 68%; FT-IV (Pastilha KBr, cm^{-1}): 1661 (ν C=O), 1605 (ν C=C).

C 10 (2E)-3-(4-clorofenil)-1-(3,4-diclorofenil)prop-2-en-1-ona

PM: 311,5g; p.f. (°C): 120-123; Rend.: 96 %; FT-IV (Pastilha KBr, cm^{-1}): 1661 (ν C=O), 1602 (ν C=C).

C 11 (2E,4E)-1-(4-metoxifenil)-5-fenilpenta-2,4-dien-1-ona

PM: 264g; p.f. (°C): 84-86; Rend.: 80%; FT-IV (Pastilha KBr, cm^{-1}): 1653 (ν C=O), 1602 (ν C=C).

C 12 (2E,4E)-1-(2-hidroxifenil)-5-fenilpenta-2,4-dien-1-ona

PM: 250g; p.f. (°C): 118,5-129,2; Rend.: 96%; FT-IV (Pastilha KBr, cm^{-1}): 1650 (ν C=O), 1605 (ν C=C).

C 13 (2E)-3-(4-metilfenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona

PM: 222g; p.f. (°C): 95,6-100; Rend.: 96%; FT-IV (Pastilha KBr, cm^{-1}): 1656 (ν C=O), 1596(ν C=C).

C 14 (2E)-3-(4-hidroxifenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona

PM: 224g; p.c. (°C): alteração da coloração a 305°C; Rend.: 98 %; FT-IV (Pastilha KBr, cm^{-1}): 1650 (ν C=O), 1596 (ν C=C).

C 15 (2E)-3-(4-nitrofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona

PM: 253g; p.f. (°C): 166,6-174,8; Rend.: 90 %; FT-IV (Pastilha KBr, cm^{-1}): 1658 (ν C=O), 1608 (ν C=C).

C 16 (2E)-3-(4-metoxifenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona

PM: 238g; p.f. (°C): 119-122; Rend.: 99,94%; FT-IV (Pastilha KBr, cm^{-1}): 1659 (ν C=O), 1600 (ν C=C).

C 17 (2E)-3-(2-metoxifenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona

PM: 238g; p.f. (°C): 59-60; Rend.: 94%; FT-IV (Pastilha KBr, cm^{-1}): 1661 (ν C=O), 1601 (ν C=C).

C 18 (2E)-3-[4-(dimetilamino)fenil]-1-(4-metilfenil)prop-2-en-1-ona

PM: 265g; p.f. (°C): 119-122; Rend.: 81%; FT-IV (Pastilha KBr, cm^{-1}): 1645 (ν C=O), 1606 (ν C=C).

C 19 (2E)-3-(3-metóxifenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona

PM: 238g; p.f. (°C): 51-54; Rend.: 85 %; FT-IV (Pastilha KBr, cm^{-1}): 1661 (ν C=O), 1605 (ν C=C).

C 20 (2E,4E)-1,5-difenilpenta-2,4-dien-1-ona

PM: 234g; p.f. (°C): 97-99,5; Rend.: 50 %; FT-IV (Pastilha KBr, cm^{-1}): 1656 (ν C=O), 1600 (ν C=C).

B1 2,3-dibromo-1,3-di(4-clorofenil)propan-1-ona

PM: 437g; p.f (°C): 159-162; Rend.: 85%; FT-IV (Pastilha KBr, cm^{-1}): 1687 (ν C=O).

B2 2,3-dibromo-3-(4-metoxifenil)-1-fenilpropan-1-ona

PM: 382g; p.f. (°C): 140-144; Rend.: 90 %; FT-IV (pastilha KBr, cm^{-1}): 1685 (ν C=O).

B3 2,3-dibromo-3-(4-nitrofenil)-1-fenilpropan-1-ona

PM: 413g; p.f. (°C): 128-131; Rend.: 96 %; FT-IV (pastilha KBr, cm^{-1}): 1682 (ν C=O).

B4 2,3-dibromo-3-(3-metoxifenil)-1-fenilpropan-1-ona

PM: 398g; p.f. (°C): 94-99; Rend.: 97,6 %; FT-IV (pastilha KBr, cm^{-1}): 1687 (ν C=O).

4.2.2 Espectroscopia de RMN ¹H dos compostos sintetizados

Os compostos C1 a C10 já haviam sido identificados pelo método de RMN ¹H, seguem, portanto, os resultados destas análises dispostos individualmente:

C 1 (2E)-1-(4-clorofenil)-3-fenilprop-2-en-1-ona

H¹ –RMN (DMSO-d₆, ppm): 7,28 (d, 1H, CH=CH), 7,39 (d, 1H, CH=CH, J = 15,72), 7,47-7,78 (m, 9H, Ar).

C 2 (2E)-1-(3,4-diclorofenil)-3-[4-(dimetilamino)fenil]prop-2-en-1-ona

H¹ –RMN (DMSO-d₆, ppm): 3,01 (s, 6H, N-(CH₃)₂), 7,28 (d, 1H, CH=CH), 7,41 (d, 1H, CH=CH, J = 15,71), 7,51-7,75 (m, 7H, Ar).

C 3 (2E)-1,3-di(4-clorofenil)prop-2-en-1-ona

H¹ –RMN (DMSO-d₆, ppm): 7,28 (d, 1H, CH=CH), 7,42 (d, 1H, CH=CH, J = 15,71), 7,47-7,87 (m, 8H, Ar).

C 4 (2E)-3-(4-clorofenil)-1-(4-metilfenil)prop-2-en-1-ona

H¹ –RMN (DMSO-d₆, ppm): 2,43 (s, 3H, CH₃), 7,51 (d, 1H, CH=CH), 7,41 (d, 1H, CH=CH, J = 15,70), 7,44-7,80 (m, 8H, Ar).

C 5 (2E)-1-(4-bromofenil)-3-(4-clorofenil)prop-2-en-1-ona

H¹ –RMN (DMSO-d₆, ppm): 7,28 (d, 1H, CH=CH), 7,43 (d, 1H, CH=CH, J = 15,69), 7,54-7,75 (m, 8H, Ar).

C 6 (2E)-1-(4-bromofenil)-3-fenilprop-2-en-1-ona

H¹ –RMN (DMSO-d₆, ppm): 7,27 (d, 1H, CH=CH), 7,38 (d, 1H, CH=CH, J = 15,63), 7,51-7,75 (m, 9H, Ar).

C 7 (2E)-1,3-difenilprop-2-en-1-ona

H¹ –RMN (DMSO-d₆, ppm): 6,38 (d, 1H, CH=CH), 6,89 (d, 1H, CH=CH, J =15,72), 7,25-7,76 (m, 10H, Ar).

C 8 (2E)-3-(4-clorofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona

H¹ –RMN (DMSO-d₆, ppm): 7,28 (d, 1H, CH=CH), 7,42 (d, 1H, Ar, J = 15,71), 7,25-7,76 (m, 9H, Ar).

C 9 (2E)-1-(3,4-diclorofenil)-3-fenilprop-2-en-1-ona

H¹ –RMN (DMSO-d₆, ppm): 7,27 (d, 1H, CH=CH), 7,39 (d, 1H, CH=CH, J = 15,70), 7,50-7,93 (m, 8H, Ar).

C 10 (2E)-3-(4-chlorophenyl)-1-(3,4-dichlorophenyl)prop-2-en-1-one

H¹ –RMN (DMSO-d₆, ppm): 7,29 (d, 1H, CH=CH), 7,43 (d, 1H, CH=CH, J =15,69), 7,54-7,94 (m, 7H, Ar).

Os dados obtidos através da análise dos dados espectrais de RMN ¹H das chalconas C11 a C20 e seus derivados B1 a B4, os quais ainda não tinham sido avaliados por este método, estão dispostos abaixo individualmente, onde os deslocamentos químicos são dados em ppm. Os dados referentes a peso molecular, rendimento, ponto de fusão e espectroscopia de infravermelho encontram-se no item 4.2.2, as cópias dos espectros obtidos encontram-se no item II dos anexos.

Nos espectros foram observados sinais em 2,51 ppm e 3,42 ppm referentes a incorporação do solvente utilizado na dissolução dos compostos DMSO e, a água incorporada ao mesmo, respectivamente. Estes resultados estão condizentes com os valores obtidos na literatura (PAVIA, LAMPMAN, KRIZ, 1979; GIL, GERALDES, 1987).

Os principais prótons identificados na descrição dos dados de RMN ^1H são especificados de acordo com a numeração proposta nas figuras acima das listagens conforme descrito a seguir:

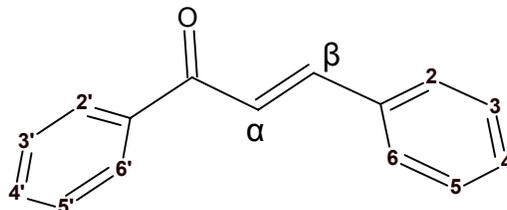


Figura 12. Distribuição numérica utilizada na identificação dos principais prótons das chalconas

C 13 (2E)-3-(4-metilfenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona

RMN ^1H (DMSO- d_6 , ppm): 7,28 (d, 2H, **H3'**, **H5'**, J = 6), 7,55 (d, 1H, **H α** , J = 16), 7,63 (d, 1H, **H β** , J = 16), 7,68-7,94 (m, 5H, **H2**, **H3**, **H5**, **H6**, **H4'**), 8,15 (d, 2H, **H2'**, **H6'**, J = 6).

C 14 (2E)-3-(4-hidroxifenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona

RMN ^1H (DMSO- d_6 , ppm): 6,02 (d, 2H, **H3'**, **H5'**, J = 8), 6,30 (d, 2H, **H3**, **H5**, J = 8), 6,94-7,44 (m, 5H, **H2**, **H6**, **H4'**, **H α** , **H β**), 7,61 (d, 2H, **H-2'**, **H-6'**, J = 8).

C 15 (2E)-3-(4-nitrofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona

RMN ^1H (DMSO- d_6 , ppm): 7,57 (d, 1H, **H α** , J = 16), 7,65 (d, 1H, **H β** , J = 16), 7,70-8,20 (m, 7H, **H2**, **H3**, **H5**, **H6**, **H3'-H5'**), 8,29 (d, 2H, **H2'**, **H6'**, J = 10).

C 16 (2E)-3-(4-metoxifenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona

RMN ^1H (DMSO- d_6 , ppm): 3,83 (s, 3H, OCH $_3$), 7,03 (d, 2H, **H3'**, **H5'**, J = 8), 7,54, (d, 1H, **H α** , J = 16), 7,62 (d 1H, **H β** , J = 16), 7,67-7,89 (m, 5H, **H2**, **H3**, **H5**, **H6**, **H4'**), 8,14 (d, 2H, **H2'**, **H6'**, J = 8).

C 17 (2E)-3-(2-metoxifenil)-1-fenilprop-2-en-1ona

RMN ^1H (DMSO- d_6 , ppm): 3,91 (s, 3H, OCH $_3$), 7,06-8,03 (m, 7H, **H3-H6**, **H3'-H5'**), 7,56 (d, 1H, **H α** , J = 14), 7,63 (d, 1H, **H β** , J = 14), 8,13 (d, 2H, **H2'**, **H6'**, J = 8).

C 18 (2E)-3-[4-(dimetilamino)fenil]-1-(4-metilfenil)prop-2-en-1-ona

RMN ¹H (DMSO-d₆, ppm): 2,40 (s, 3H, CH₃), 3,01 (s, 6H, N(CH₃)₂), 6,74 (d, 2H, **H3**, **H5**, J = 10), 7,35 (d, 2H, **H3'**, **H5'**, J = 8), 7,65-7,72 (m, 4H, H₂, H₆, **H α** , **H β**), 8,02 (d, 2H, **H2'**, **H6'**, J = 8).

C 19 (2E)-3-(3-metóxfenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona

RMN ¹H (DMSO-d₆, ppm): 3,84 (s, 3H, OCH₃), 7,04 (d, 2H, **H3'**, **H5'**, J = 8), 7,38-8,01 (m, 5H, **H2**, **H4-H6**, **H4'**), 7,57 (d, 1H, **H α** , J = 14), 7,64 (d, 1H, **H β** , J = 14), 8,17 (d, 2H, **H2'**, **H6'**, J = 8).

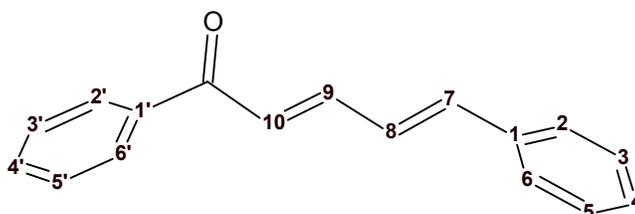


Figura 13. Distribuição numérica utilizada na identificação dos principais prótons das chalconas com duplas conjugadas

C 11 (2E,4E)-1-(4-metoxifenil)-5-fenilpenta-2,4-dien-1-ona

RMN ¹H (DMSO-d₆, ppm): 3,86 (s, 3H, OCH₃), 7,09 (d, 2H, **H3'**, **H5'**, J = 8), 7,22-7,62 (m, 5H, **H2-H6**), 7,37 (d, 2H, **H9**, **H10**, J = 16), 7,45 (d, 2H, **H7**, **H8**, J = 16), 8,04 (d, 2H, **H2'**, **H6'**, J = 8).

C 12 (2E,4E)-1-(2-hidroxifenil)-5-fenilpenta-2,4-dien-1-ona

RMN ¹H (DMSO-d₆, ppm): 6,81 (d, 2H, **H3**, **H5**, J = 8), 6,89-7,63 (m, 5H, **H3'-H6'**, **H2**, **H4**, **H6**), 7,37 (d, 2H, **H9**, **H10**, J = 16), 7,45 (d, 2H, **H7**, **H8**, J = 16), 7,88 (d, 1H, **H6'**).

C 20 (2E,4E)-1,5-difenilpenta-2,4-dien-1-ona

RMN ¹H (DMSO-d₆, ppm): 7,37 (d, 2H, **H3'**, **H5'**, J = 8), 7,24-7,67 (m, 6H, **H2-H6**, **H4'**), 7,58 (d, 2H, **H9**, **H10**, J = 14), 7,65 (d, 2H, **H7**, **H8**, J = 14), 8,02 (d, 2H, **H2'**, **H6'**, J = 8).

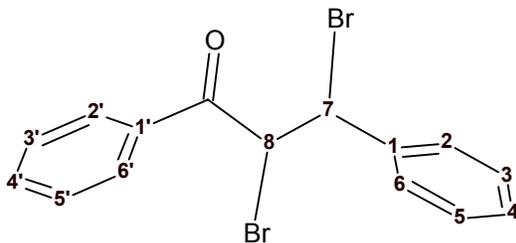


Figura 14. Distribuição numérica utilizada na identificação dos principais prótons dos derivados bromados

B1 2,3-dibromo-1,3-di(4-clorofenil)propan-1-ona

RMN ^1H (DMSO- d_6 , ppm): 5,83 (d, 1H, **H-8**, $J = 12$), 6,73 (d, 1H, **H-7**, $J = 12$), 7,53 8 d, 2H, **H3**, **H5**, $J = 8$), 7,74 (d, 2H, **H3'**, **H5'**, $J = 8$), 7,88 (d, 2H, **H2**, **H6**, $J = 8$), 8,31 (d, 2H, **H2'**, **H6'**, $J = 8$).

B2 2,3-dibromo-3-(4-metoxifenil)-1-fenilpropan-1-ona

RMN ^1H (DMSO- d_6 , ppm): 4,74 (s, 3H, OCH_3), 5,79 (d, 1H, **H-8**, $J = 12$), 6,70 (d, 1H, **H-7**, $J = 12$), 7,42-7,98 (m, 7H, **H2**, **H3**, **H5**, **H6**, **H3'-H5'**), 8,29 (d, 2H, **H2'**, **H6'**, $J = 8$).

B3 2,3-dibromo-3-(4-nitrofenil)-1-fenilpropan-1-ona

RMN ^1H (DMSO- d_6 , ppm): 5,99 (d, 1H, **H8**, $J = 12$), 6,79 (d, 1H, **H7**, $J = 12$), 7,62-8.32 (m, 9H, **H2'**, **H3'**, **H5'**, **H6'**, **H2-H6**).

B4 2,3-dibromo-3-(3-metoxifenil)-1-fenilpropan-1-ona

RMN ^1H (DMSO- d_6 , ppm): 3,84 (s, 3H, OCH_3), 5,75 (d, 1H, **H8**, $J = 12$), 6,69 (d, 1H, **H7**, $J = 12$), 6,93-7,78 (m, 7H, **H2**, **H4-H6**, **H3'-H5'**), 8,30 (d, 2H, **H2'**, **H6'**, $J = 8$).

Na tabela 4, podemos verificar as variações dos deslocamentos químicos dos prótons H7 e H8, em relação aos diferentes substituintes nos anéis aromáticos das chalconas C13, C15-C17 e C19 quando comparados a chalcona C7, apresentando $\Delta\delta$ positivos que mostram uma tendência de movimentação dos sinais referentes aos prótons H7 e H8 para campo baixo quando temos substituições nos anéis.

Tabela 5. Variação ($\Delta\delta$) dos deslocamentos químicos de H-8 e H-7, para os compostos C13, C15-C17, C19, em relação a chalcona C7.

Hidrogênios	C13-C7	C15-C7	C16-C7	C17-C7	C19-C7
H-7	0,74	0,76	0,73	0,74	0,75
H-8	1,17	1,19	1,16	1,18	1,19

Da mesma forma, a tabela 5 demonstra $\Delta\delta$ dos deslocamentos para os prótons H7-H8 e H9-H10 das chalconas C11 e C12, em relação a chalcona C20, onde observa-se o contrário, os sinais dos prótons H7-H8 e H9-H10 tendem a movimentar-se para campo alto quando comparados ao composto sem substituintes.

Tabela 6. Variação ($\Delta\delta$) dos deslocamentos químicos de H7-H8 e H9-H10, para os compostos C11 e C12, em relação a chalcona C20.

Hidrogênios	C11-C20	C12-C20
H7-H8	-0,21	-0,20
H9-H10	-0,20	-0,20

4.3 Ensaio biológicos com as chalconas C1, C3, C5 a C13, C15 a C17, C19 a C20 e B1 a B4

4.3.1 Hiperlipidemia Induzida por Triton WR-1339

4.3.1.1 Concentração sérica de colesterol total e colesterol da HDL

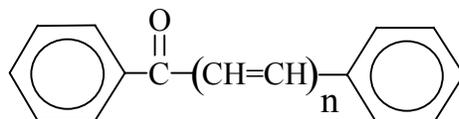
Ao analisar os níveis de colesterol total dos animais tratados com Triton WR 1339 e as chalconas do grupo 1 (moléculas protótipo), observa-se uma clara redução estatisticamente significativa ($p < 0,001$) em relação ao grupo controle tratado somente com este detergente (Tabela 7). Neste grupo o composto C7 apresentou a melhor redução nos níveis de colesterol (34,96%). No entanto, nenhum dos compostos testado atingiu os valores de redução semelhante aos obtidos após tratamento com a lovastatina.

Em relação ao grupo controle normal, os compostos C7 e C20, também, não foram capazes de normalizar os níveis de colesterol total com a mesma eficiência que a lovastatina.

Quanto às concentrações de colesterol da lipoproteína HDL, observa-se uma tendência de aproximação aos valores expressos no grupo controle normal, no entanto, não se observou aumento destas concentrações, quando temos como parâmetro de comparação o grupo Triton WR 1339.

Tabela 7. Concentrações séricas de colesterol total e colesterol da HDL (mg/dL) após 8 horas da indução de hiperlipidemia pelo Triton WR 1339 (62,5 mg/mL, i. p.) em ratos tratados com as chalconas ou lovastatina (v. o.) e grupos controles.

GRUPO 1 – MOLÉCULAS PROTÓTIPO



n=1	n= 2
C7	C20

Tratamento	Concentração dos compostos (mmol/Kg)	Colesterol total (mg/dL)		Colesterol da HDL (mg/dL)
		Concentrações	% Redução	Concentrações
Normal	-	108,59±7,36	-	41,38±7,42
Triton	-	205,38±10,28 ***	-	189,68±17,17 ***
Lovastatina	2,50	72,37±3,40 ^a	64,76	122,58±10,92 ^a
C7	28,85	133,58±12,76 ^a	34,96	76,18±6,24 ^a
C20	25,64	155,39±16,60 *	24,34	89,02±11,31 ^{a**}

Todos os resultados foram expressos em termos de média ± EPM, n=6. (%) Redução em relação ao tratamento com Triton WR 1339. (***) , (**) e (*) diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo normal (p<0,001), (p<0.01) e (p<0.05), respectivamente, (^a) diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Triton WR 1339 (p<0,001).

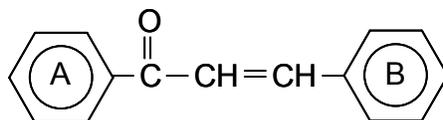
As chalconas do grupo 2 (com substituintes aromáticos desativadores) apresentaram os melhores valores, estatisticamente significativos ($p < 0,001$) de redução dos níveis de colesterol total em relação ao grupo Triton WR 1339 (Tabela 8). As reduções mais expressivas foram às obtidas com os compostos C10 (67,88%) e B1 (64,59%), os quais se aproximaram do valor de redução obtido para o fármaco de referência, lovastatina (64,76%).

Em relação ao grupo controle normal, os valores de colesterol total obtidos após tratamento com os compostos C10 e B1, novamente foram os mais significativos, reduzindo estatisticamente ($p < 0,001$), os níveis de colesterol total. Com a exceção dos compostos C1, C8 e C9, os compostos do grupo 2 apresentaram uma tendência em reduzir os níveis de colesterol total, alcançando valores abaixo dos obtidos para o controle normal.

Curiosamente, as concentrações de colesterol da HDL, obtidas com as chalconas do grupo 2, não sofreram aumento, quando comparadas ao grupo Triton WR 1339, apesar dos tratamentos com alguns compostos (C1, C8, C9, C15, B1 e B3) mostrarem-se capazes de manter os valores de colesterol da HDL acima dos valores obtidos para o controle normal.

Tabela 8. Concentrações séricas de colesterol total e colesterol da HDL (mg/dL) após 8 horas da indução de hiperlipidemia pelo Triton WR 1339 (62,5 mg/mL, i. p.) em ratos tratados com as chalconas ou lovastatina (v. o.) e grupos controles.

GRUPO 2 – SUBSTITUINTES DESATIVADORES



Anel A/B	Anel A	Anel B
C3 - 4-Cl C5 - 4-Br / 4-Cl C10 - 3,4Cl / 4-Cl B1 - 4-Cl / 4-Cl	C1 - 4-Cl C6 - 4-Br C9 - 3,4-Cl	C8 - 4-Cl C15 - 4-NO ₂ B3 - 4-NO ₂

Tratamento	Concentração dos compostos (mmol/Kg)	Colesterol total (mg/dL)		Colesterol da HDL (mg/dL)
		Concentrações	% Redução	Concentrações
Normal	-	108,59±7,36	-	41,38±7,42
Triton	-	205,38±10,28 ***	-	189,68±17,17 ***
Lovastatina	2,50	72,37±3,40 ^a	64,76	122,58±10,92 ^a
C1	24,00	148,92±7,44 ^{b*}	27,49	83,95±9,33 ^{a*}
C3	21,66	79,86±4,65 ^a	61,11	25,96±1,48 ^a
C5	18,67	81,88±7,66 ^a	60,13	38,11±5,06 ^a
C6	20,91	79,93±5,83 ^a	61,08	23,77±2,43 ^a
C8	24,74	147,59±13,58 ^c	28,14	69,07±11,04 ^a
C9	21,66	176,33±13,56 ***	14,14	81,16±10,42 ^a
C10	19,26	65,96±6,94 ^{a*}	67,88	28,02±4,09 ^a
C15	23,71	84,40±6,68 ^a	58,90	51,66±13,10 ^a
B1	13,73	72,72±13,03 ^a	64,59	67,93±7,50 ^a
B3	14,53	95,81±9,79 ^a	53,35	42,98±4,90 ^a

Todos os resultados foram expressos em termos de média ± EPM, n=6. (%) Redução em relação ao tratamento com Triton WR 1339.

(***) e (*) diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo normal (p<0,001) e (p<0,05), respectivamente,

(^a), (^b) e (^c) diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Triton WR 1339 (p<0,001), (p<0,01) e (p<0,05), respectivamente.

Os resultados das avaliações dos níveis séricos de colesterol total dos animais tratados com Triton WR 1339 e as chalconas do grupo 3 (com substituintes ativadores), assim como dos grupos 1 e 2, apresentaram reduções significativas ($p < 0,001$), sendo os compostos C17 (60,24%) e B4 (67,48%), os que apresentaram melhores resultados, levando-se em consideração os valores obtidos para o grupo Triton WR 1339 (Tabela 9).

As concentrações séricas de colesterol total para os compostos B4, C17, C13, C12 e C19 apresentaram redução dos valores quando comparados com o controle normal. Sendo que a redução da concentração de colesterol total obtida com a lovastatina foi ultrapassada somente pelo composto B4.

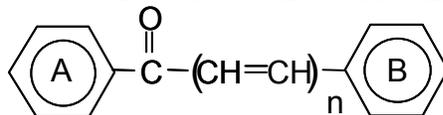
Quanto as concentrações séricas de colesterol da HDL, nenhum dos compostos testados do grupo 3, foram capazes de provocar aumento nas concentrações deste esterol lipoproteico.

Em relação ao grupo controle normal, os compostos C11, C16, C17, C19 e B4 demonstraram aumento significativo nos valores de colesterol da HDL, sendo que os três primeiros apresentaram valores muito próximos aos obtidos no tratamento com a lovastatina.

Em geral, o grupo 3 apresentou resultados na redução do colesterol total, de menor desempenho, em comparação com os outros dois grupos já citados.

Tabela 9. Concentrações séricas de colesterol total e colesterol da HDL (mg/dL) após 8 horas da indução de hiperlipidemia pelo Triton WR 1339 (62,5 mg/mL, i. p.) em ratos tratados com as chalconas ou lovastatina (v. o.) e grupos controles.

GRUPO 3 – SUBSTITUINTES ATIVADORES



Anel A	Anel B
C11 – 4-OCH ₃ (n=2)	C13 – 4-CH ₃ , (n=1) C17 – 2-OCH ₃ , (n=1)
C12 – 2-OH (n=2)	C16 – 4-OCH ₃ , (n=1) B2 – 4-CH ₃ , (n=1)
	C19 – 3-OCH ₃ , (n=1) B4 – 4-OCH ₃ , (n=1)

Tratamento	Concentração dos compostos (mmol/Kg)	Colesterol total (mg/dL)		Colesterol da HDL (mg/dL)
		Concentrações	% Redução	Concentrações
Normal	-	108,59±7,36	-	41,38±7,42
Triton	-	205,38±10,28 ***	-	189,68±17,17 ***
Lovastatina	2,50	72,37±3,40 ^a	64,76	122,58±10,92 ^a
C11	22,73	140,50±8,39 ^a	31,59	109,01±11,71 ^a ***
C12	24,00	102,24±7,16 ^a	50,22	31,04±9,62 ^a
C13	27,03	101,48±7,25 ^a	50,59	39,07±4,55 ^a
C16	25,21	137,63±6,40 ^a	32,99	106,32±10,96 ^a ***
C17	25,21	81,64±7,11 ^a	60,24	101,49±7,84 ^a ***
C19	25,21	107,42±11,12 ^a	47,70	90,71±10,83 ^a *
B2	15,71	128,9±10,28 ^a	37,24	61,29±11,24 ^a
B4	15,07	66,78±6,87 ^c	67,48	111,61±7,34 ^a ***

Todos os resultados foram expressos em termos de média ± EPM, n=6. (%) Redução em relação ao tratamento com Triton WR 1339.

(***), (*) diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo normal (p<0,001), (p<0,05),

(^a), (^c) diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Triton WR 1339 (p<0,001), (p<0,05), respectivamente.

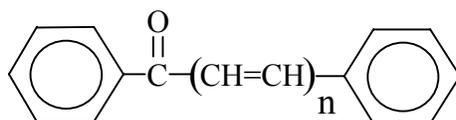
4.3.1.2 Concentrações séricas de triglicérides

Somente o composto C7 do grupo 1, apresentou uma pequena redução (1,92%), apesar de não significativa estatisticamente, nas concentrações séricas de triglicérides em relação ao grupo Triton WR 1339. No entanto, estes compostos demonstraram valores séricos de triglicérides mais baixos que os valores obtidos com a lovastatina (Tabela 10).

Levando-se em consideração, o grupo controle normal, nenhum dos compostos testados no grupo 1, aproximou-se dos valores obtidos pelo controle. Fato este também observado para a lovastatina.

Tabela 10. Concentrações séricas de triglicérides (mg/dL) após 8 horas da indução de hiperlipidemia pelo Triton WR 1339 (62,5 mg/mL, i. p.) em ratos tratados com as chalconas ou lovastatina (v. o.) e grupos controles.

GRUPO 1 – MOLÉCULAS PROTÓTIPO



n=1	n= 2
C7	C20

Triglicérides (mg/dL)			
Compostos	Concentração dos compostos (mmol/Kg)	Concentrações	% Redução
Normal	-	96,46±3,41	-
Triton WR 1339	-	541,60±23,87 ***	-
Lovastatina	2,50	632,49±25,33	-
C7	28,85	531,17±9,62 ***	1,92
C20	25,64	577,53±11,92 ***	-

Todos os resultados foram expressos em termos de média ± EPM, n=6. (%) Redução em relação ao tratamento com Triton WR 1339.

(***) diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo normal (p<0,001).

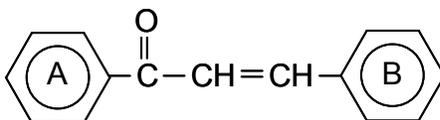
Como se pode observar na Tabela 11, referente ao tratamento com as chalconas do grupo 2, os dados obtidos para a concentração sérica de triglicérides, em relação ao grupo Triton WR 1339, permitem avaliar dois perfis dos compostos testados. As chalconas C3 (90,20%), C5 (89,03%), C6 (88,54%), C10 (83,98%), C15 (86,59%) B1 (83,28%) e B3 (81,92%) apresentaram significativas reduções, quando comparados os valores às concentrações séricas de triglicérides do grupo controle Triton WR 1339, enquanto alguns compostos demonstraram aumento significativo nas concentrações de triglicérides variando entre 17,40% (C12) a 76,48% (C13).

Em relação ao grupo controle normal, as reduções dos valores de triglicérides pelos compostos C3, C5, C6, C10, C15 B1 e B3, mostrou-se numa tendência de normalizar as concentrações séricas deste lipídeo (Tabela 11).

O tratamento com a lovastatina, em relação ao controle normal, não foi suficiente para normalizar os valores séricos de triglicérides, o que tornou mais interessante a redução observada para os compostos C3, C5, C6, C10, C15, B1 e B3 (Tabela 11).

Tabela 11. Concentração sérica de triglicérides (mg/dL) após 8 horas da indução de hiperlipidemia pelo Triton WR 1339 (62,5 mg/mL, i. p.) em ratos tratados com as chalconas ou lovastatina (v. o.) e grupos controles.

GRUPO 2 – SUBSTITUINTES DESATIVADORES



Anel A/B	Anel A	Anel B
C3 - 4-Cl	C1 - 4-Cl	C8 - 4-Cl
C5 - 4-Br / 4-Cl	C6 - 4-Br	C15 - 4-NO ₂
C10 - 3,4Cl / 4-Cl	C9 - 3,4-Cl	B3 - 4-NO ₂
B1 - 4-Cl / 4-Cl		

Triglicérides (mg/dL)

Compostos	Concentração dos compostos (mmol/Kg)	Concentrações	% Redução
Normal	-	96,46±3,41	-
Triton WR 1339	-	541,6±23,87 ***	-
Lovastatina	2,50	632,49±25,33	-
C1	24,00	679,89±10,18 ^a ***	-
C3	21,66	53,08±4,36 ^a	90,20
C5	18,67	59,39±5,44 ^a	89,03
C6	20,91	62,07±11,84 ^a	88,54
C8	24,74	780,75±10,92 ^a ***	-
C9	21,66	787,68±5,85 ^a ***	-
C10	19,26	86,744±4,45 ^a	83,98
C15	23,71	72,64±10,08 ^a	86,59
B1	13,73	90,72±10,55 ^a	83,28
B3	14,53	97,93±10,40 ^a	81,92

Todos os resultados foram expressos em termos de média ± EPM, n=6. (%) Redução em relação ao tratamento com Triton WR 1339.

(***) diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo normal (p<0,001),

(^a) diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Triton WR 1339 (p<0,001).

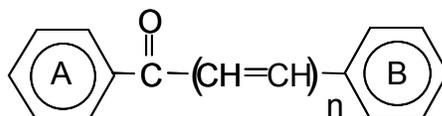
Os resultados obtidos com os compostos do grupo 3, em relação ao grupo Triton WR 1339, apresentaram somente uma redução de 12,19% nas concentrações séricas de triglicérides, causada pelo composto B2 (Tabela 12).

Apesar da redução dos valores séricos de triglicérides, observada para este composto (B2), não há proximidade com os valores obtidos para o grupo controle normal.

Entretanto, a lovastatina, visada como fármaco de referência, também não apresentou redução significativa quando comparada aos controles normal e hipercalórico. Em comparação aos resultados obtidos nos grupos controle, os compostos B2 e C19 apresentaram melhores resultados que a lovastatina.

Tabela 12. Concentrações séricas de triglicérides (mg/dL) após 8 horas da indução de hiperlipidemia pelo Triton WR 1339 (62,5 mg/mL, i. p.) em ratos tratados com as chalconas ou lovastatina (v. o.) e grupos controles.

GRUPO 3 – SUBSTITUINTES ATIVADORES



Anel A	Anel B
C11 – 4-OCH ₃ (n=2)	C13 – 4-CH ₃ , (n=1) C17 – 2-OCH ₃ , (n=1)
C12 – 2-OH (n=2)	C16 – 4-OCH ₃ , (n=1) B2 – 4-CH ₃ , (n=1)
	C19 – 3-OCH ₃ , (n=1) B4 – 4-OCH ₃ , (n=1)

Triglicérides (mg/dL)			
Compostos	Concentração dos compostos (mmol/Kg)	Concentrações	% Redução
Normal	-	96,46±3,41	-
Triton WR 1339	-	541,6±23,87 ***	-
Lovastatina	2,50	632,49±25,33 ***	-
C11	22,73	806,96±19,39 ^a ***	-
C12	24,00	635,82±13,15 ^a ***	-
C13	27,03	955,82±16,14 ^a ***	-
C16	25,21	792,9±19,08 ^a ***	-
C17	25,21	718,21±7,74 ^a ***	-
C19	25,21	615,39±18,55 ^a ***	-
B2	15,71	475,59±8,22 ***	12,19
B4	15,07	912,93±14,31 ^a ***	-

Todos os resultados foram expressos em termos de média ± EPM, n=6. (%) Redução em relação ao tratamento com Triton WR 1339.

(***) diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo normal (p<0,001),

(^a) diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Triton WR 1339 (p<0,001).

4.3.2 Hiperlipidemia Induzida pela Dieta Hipercalórica

4.3.2.1 Concentrações séricas de colesterol total

Como se pode observar na Figura 15, as concentrações séricas de colesterol total, encontraram-se significativamente menores ($p < 0,001$), em relação aos valores da dieta hipercalórica, com redução de 31,77% para o composto C7 e 32,70% para o composto C20. No entanto, a lovastatina, apresentou redução de 58,52%.

Em relação a dieta normal, os compostos testados não se mostraram capazes de reduzir as concentrações séricas de colesterol total.

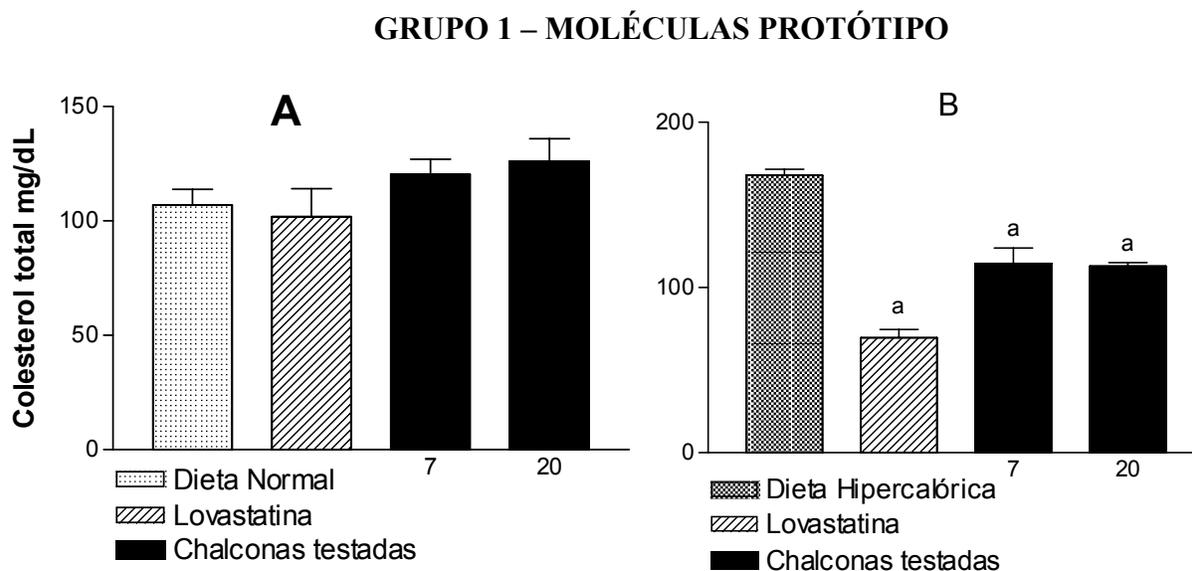


Figura 15. Concentrações séricas de colesterol total (mg/dL) em ratos tratados durante 30 dias com dieta normal (A) ou hipercalórica (B) e as chalconas 7 e 20 ou lovastatina (v. o.) e grupos controles. Todos os resultados são expressos em termos de média \pm EPM, $n=6$. (^a) diferença estatisticamente significativa em relação a dieta hipercalórica ($p < 0,001$).

Levando-se em consideração a dieta hipercalórica, os compostos do grupo 2 (Figura 16), apresentaram reduções significativas, com exceção do composto C9. Os melhores resultados ficaram para os compostos C1, B1, C10 e C3 que levaram a reduções de 55,53%, 56,67%, 52,54% e 47,63%, respectivamente, em relação a dieta hipercalórica.

Os compostos B1 e C1 foram os que mais se aproximaram da percentagem de redução obtida para o tratamento com a lovastatina (58,52%), em relação a dieta hipercalórica.

Ao analisar o comportamento dos compostos do grupo 2, em relação a dieta normal, verifica-se uma tendência de redução das concentrações séricas de colesterol total, apesar de não apresentarem diferenças estatisticamente significativas; com exceção do composto C1, que mostrou-se capaz de reduzir significativamente ($p < 0,001$) os valores séricos de colesterol total, em relação a dieta normal. Também, a lovastatina não apresentou redução significativa nas concentrações de colesterol total, quando comparada a dieta normal (Figura 16).

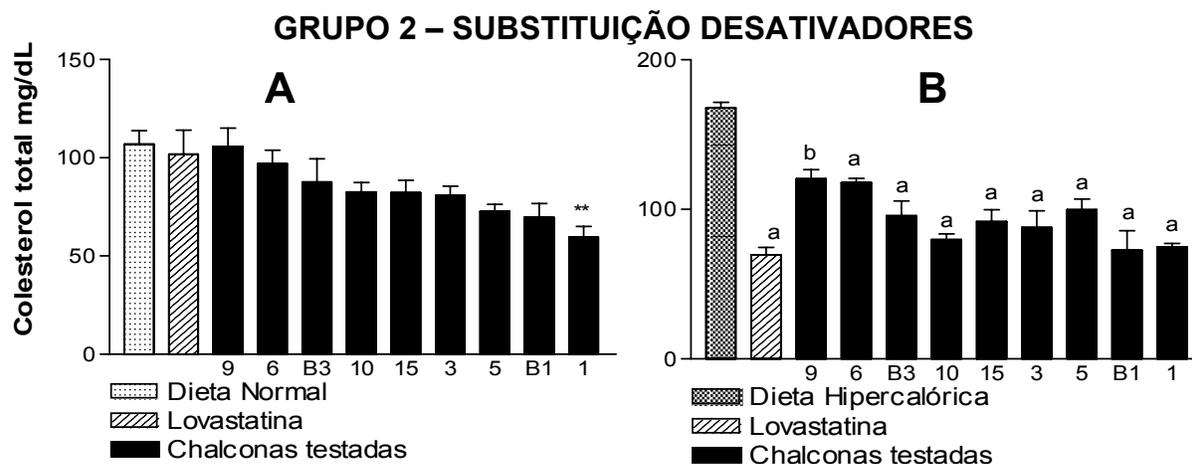


Figura 16. Concentrações séricas de colesterol total (mg/dL) em ratos tratados durante 30 dias com dieta normal (A) ou hipercalórica (B) e as chalconas C9, C6, B3, C10, C15, C3, C5, B1, e C1 ou lovastatina (v. o.) e grupos controles. Todos os resultados são expressos em termos de média \pm EPM, $n=6$. (**) diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo normal ($p < 0,01$); (^a), (^b) e (^c) diferença estatisticamente significativa em relação a dieta hipercalórica ($p < 0,001$), ($p < 0,01$) e ($p < 0,05$), respectivamente.

Como pode ser observado na Figura 17, as chalconas do grupo 3, quando comparadas a dieta hipercalórica, foram capazes de reduzir significativamente as concentrações séricas de colesterol total ($p < 0,001$), atingindo um valor máximo de 47,58% (C19). Já o composto C12 apresentou a menor redução significativa com 4,96% ($p < 0,05$).

No entanto, estes compostos do grupo 3, não alcançaram os valores de redução da concentração sérica de colesterol total, obtidos pela lovastatina de 58,52%.

Em relação a dieta normal, destacam-se as reduções causadas pelos compostos C19 (47,58%) e C17 (37,71%).

Em relação a lovastatina, foi notável que os compostos C19 e C17 do grupo 3, apresentaram reduções dos valores séricos de colesterol total, mais significativas, quando comparadas a dieta normal.

Novamente observou-se a predominância dos compostos do grupo 2, como o melhor grupo redutor de colesterol total, dentre os grupos testados nos dois modelos de indução à hiperlipemia.

GRUPO 3 – SUBSTITUINTES ATIVADORES

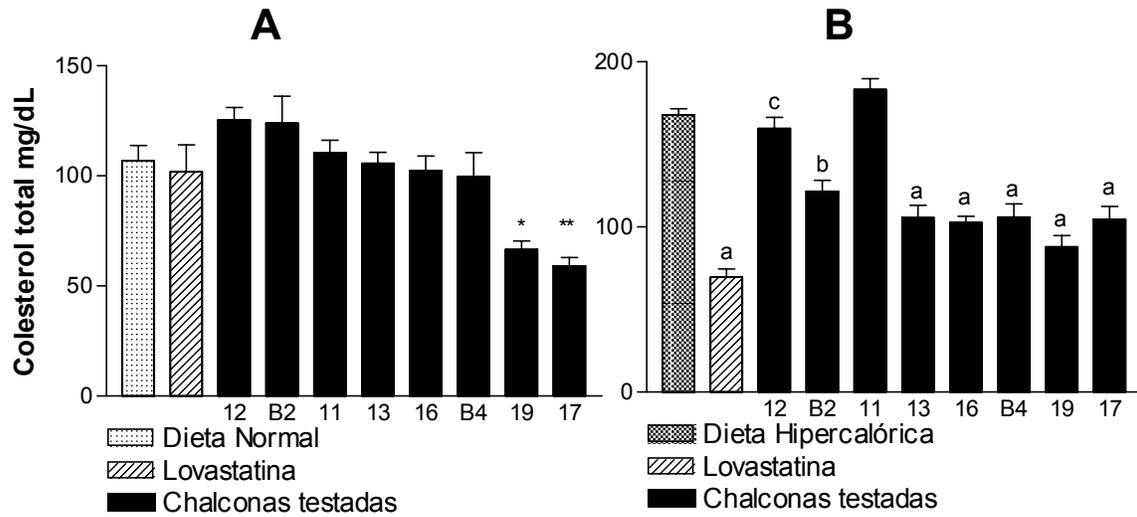


Figura 17. Concentração sérica de colesterol total (mg/dL) em ratos tratados durante 30 dias com dieta normal (A) ou hipercalórica (B) e as chalconas C12, B2, C11, C16, B4, C19 e C17 ou lovastatina (v. o.) e grupos controles. Todos os resultados são expressos em termos de média \pm EPM, n=6. (**) e (*) diferença estatisticamente significativa em relação a dieta normal ($p < 0,01$) e ($p < 0,05$), respectivamente; (a) e (b) diferença estatisticamente significativa em relação a dieta hipercalórica ($p < 0,001$) e ($p < 0,01$), respectivamente.

4.3.2.2 Concentração sérica de triglicérides

Uma evidente redução nas concentrações de triglicérides foi observada ($p < 0,001$), após tratamento com todos os grupos de chalconas testadas (1, 2 e 3), quando comparados a dieta hipercalórica.

Os compostos C7 e C20 do grupo 1 apresentaram reduções significativas nos valores séricos de triglicérides, em relação a dieta hipercalórica, alcançando valores de 86,47% e 38,04%, respectivamente.

A redução alcançada pela lovastatina (71,27%), em relação a dieta hipercalórica, foi menor que aquela obtida com a administração da chalcona C7.

As chalconas do grupo 1 (Figura 18), reproduziram também, uma tendência de redução sobre os valores séricos de triglicérides, abaixo dos valores obtidos para a dieta normal, apresentando uma redução de 85,33% (C20) e 45,61%, (C7), com significância de $p < 0,001$ e $p < 0,05$, respectivamente. Esta redução não foi observada para o fármaco de referência, lovastatina.

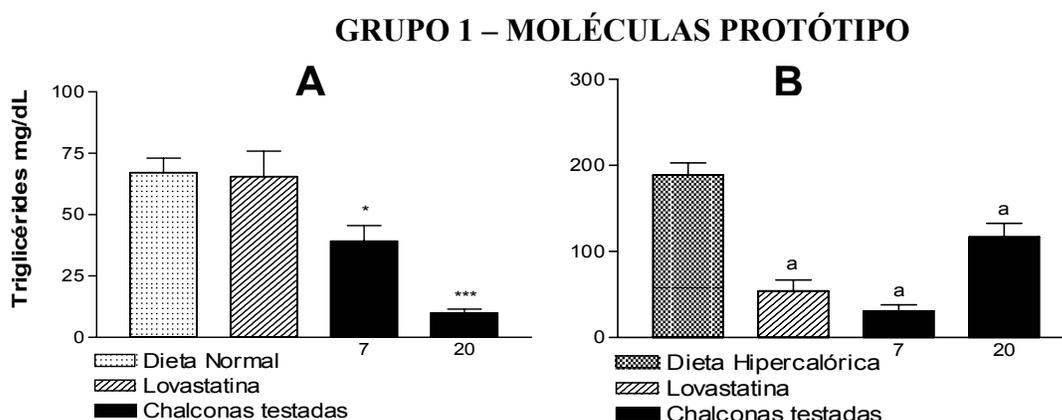


Figura 18. Concentrações séricas de triglicérides (mg/dL) em ratos tratados durante 30 dias com dieta normal (A) ou hipercalórica (B) e as chalconas 7 e 20 ou lovastatina (v. o.) e grupos controles. Todos os resultados são expressos em termos de média \pm EPM, $n=6$. (***) e (*) diferença estatisticamente significativa em relação a dieta normal ($p < 0,001$) e ($p < 0,05$), respectivamente, (^a) diferença estatisticamente significativa em relação a dieta hipercalórica ($p < 0,001$).

Todos os compostos analisados do grupo 2 (Figura 19), reduziram significativamente as concentrações séricas de triglicérides, no modelo da dieta hipercalórica, fato este que não ocorreu no modelo Triton WR 1339 estudado, onde ao contrário houve aumento significativo dos mesmos, com a exceção dos compostos C1, C8 e C9, os quais no modelo Triton WR 1339 também reduziram os valores de triglicérides. Destacaram-se os compostos C10 e C3 com 75,98% e 67,79%, respectivamente, quando comparados a dieta hipercalórica.

Os valores de triglicérides obtidos após tratamento com a lovastatina (71,27%), foram superados pelo tratamento com a chalcona C10, a qual em relação a dieta hipercalórica, atingiu uma redução de 75,98%. Os demais compostos apresentaram valores de redução próximos, variando de 40,40% (C5) a 67,79% (C3).

Levando em consideração a dieta normal, observou-se, com exceção do composto C5, uma tendência à redução dos valores séricos de triglicérides, com destaque para os compostos C9, C15 e C6. Redução esta que não foi observada para a lovastatina.

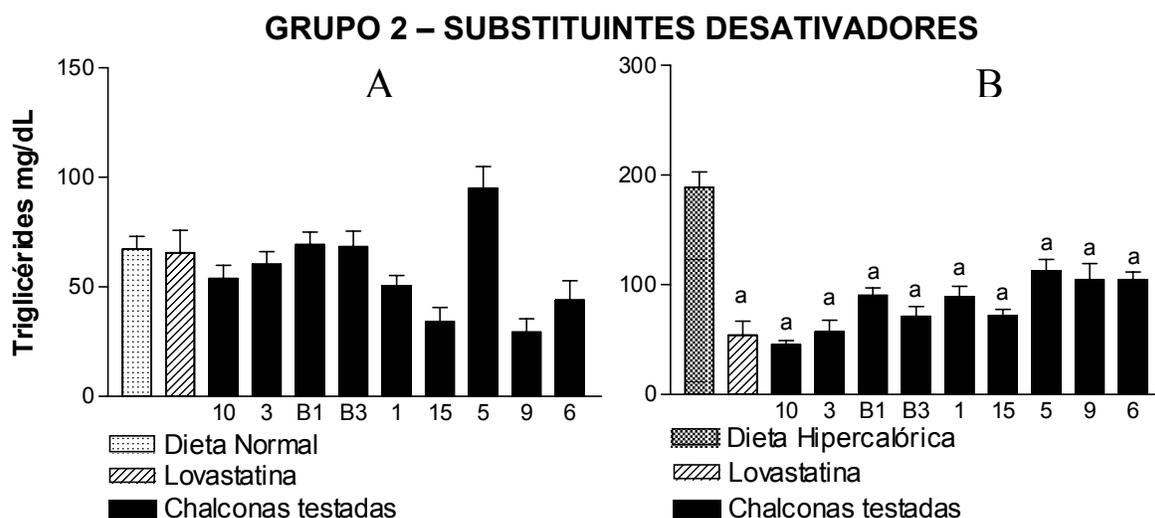


Figura 19. Concentrações séricas de triglicérides (mg/dL) em ratos tratados durante 30 dias com dieta normal (A) ou hipercalórica (B) e as chalconas C10, C3, B1, B3, C1, C15, C5, C9 e C6 ou lovastatina (v. o.) e grupos controles. Todos os resultados são expressos em termos de média \pm EPM, n=6. (***) diferença estatisticamente significativa em relação

a dieta normal ($p < 0,001$), (^a) diferença estatisticamente significativa em relação a dieta hipercalórica ($p < 0,001$).

Ao considerar-se os valores de triglicérides da dieta hipercalórica, todos os compostos do grupo 3 (Figura 20), apresentaram redução significativa, com destaque para os compostos C16 e C12 com 80,55% e 87,14% de redução. As chalconas C16 e C12 foram as únicas que alcançaram os valores séricos de triglicérides menores do que o valor obtido após tratamento com a lovastatina.

Em relação a dieta normal, há uma tendência a redução da concentração sérica de triglicérides para os compostos C11, C12, C13, B4, C16 e C17, um perfil que não foi observado com a lovastatina.

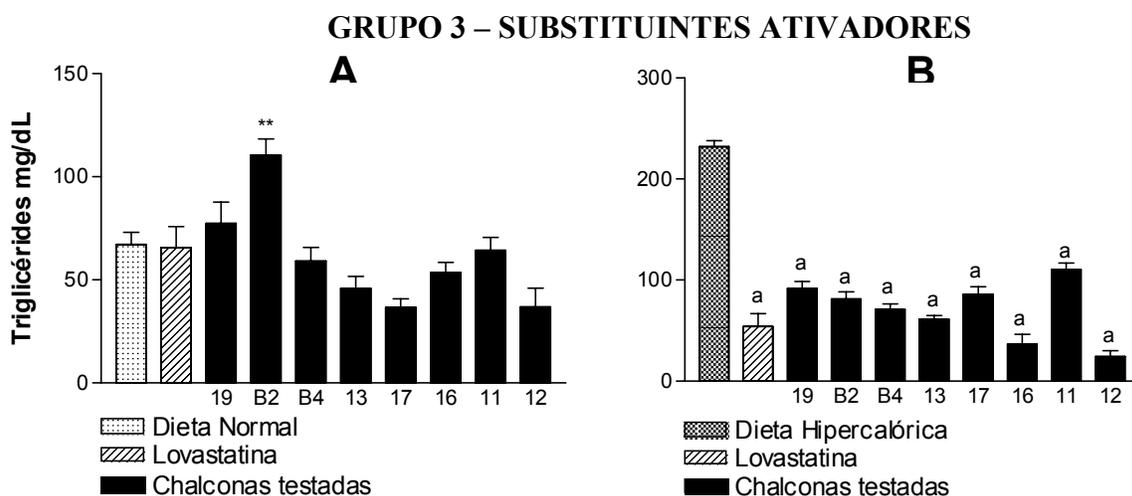


Figura 20. Concentrações séricas de triglicérides (mg/dL) em ratos tratados durante 30 dias com dieta normal (A) ou hipercalórica (B) e as chalconas C19, B2, B4, C13, C17, C16, C11 e C12 ou lovastatina (v. o.) e grupos controles. Todos os resultados são expressos em termos de média \pm EPM, $n=6$. (**) diferença estatisticamente significativa em relação a dieta normal ($p < 0,01$), (^a) diferença estatisticamente significativa em relação a dieta hipercalórica ($p < 0,001$).

4.3.2.3 Concentrações séricas de colesterol da HDL

Os compostos C20 e C7, do grupo 1 (Figura 21), apresentaram uma redução significativa ($p < 0,01$) de 46,54% e 42,96%, respectivamente, nas concentrações séricas de colesterol da HDL, quando comparados a dieta hipercalórica.

O aumento nas concentrações de colesterol da HDL também não foi significativo para a lovastatina, apesar, desta ter apresentado menor redução que os compostos C7 e C20, quando comparado a dieta hipercalórica.

Surpreendentemente, o composto C20 aumentou 88,73% os valores séricos de colesterol da HDL, em relação a dieta normal. Este perfil não se repetiu para o composto C7, que não apresentou aumento significativo das concentrações de colesterol da HDL em relação a dieta normal (Figura 21).

O fármaco de referência, lovastatina, também, causou uma elevação nos valores séricos de colesterol da HDL, no entanto, não mostrou-se tão eficiente quanto o composto C20, em relação ao controle normal.

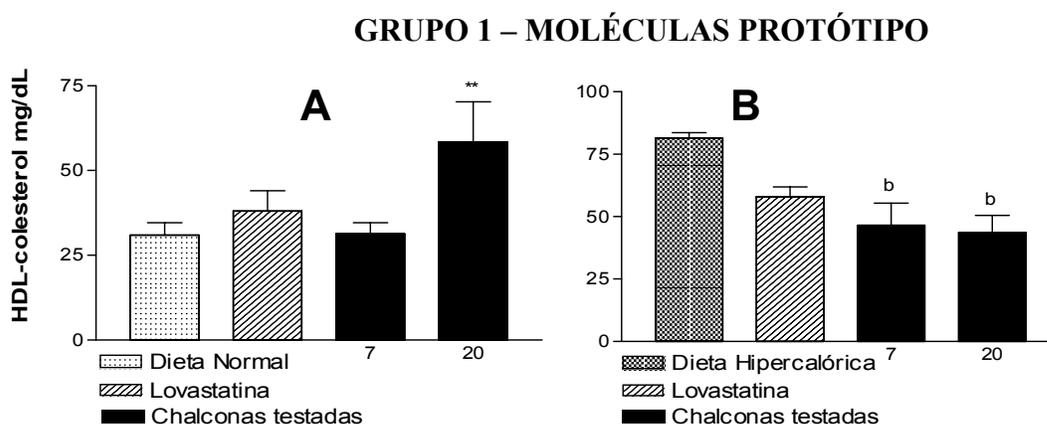


Figura 21. Concentrações séricas de colesterol da HDL (mg/dL) em ratos tratados durante 30 dias com dieta normal (A) ou hipercalórica (B) e as chalconas 7 e 20 ou lovastatina (v. o.) e grupos controles. Todos os resultados são expressos em termos de média \pm EPM, $n=6$. (**) diferença estatisticamente significativa em relação a dieta normal ($p < 0,01$), (b) diferença estatisticamente significativa em relação a dieta hipercalórica ($p < 0,001$).

Ao analisar o grupo 2 (Figura 22), observa-se que os compostos não foram capazes de aumentar as concentrações de colesterol da HDL, quando relacionados aos valores obtidos na dieta hipercalórica. No entanto, o composto C3, apresentou concentração sérica de colesterol da HDL maior do que aquela obtida com a lovastatina.

Os dados da Figura 22, em relação a dieta normal, apresentam aumento nos valores séricos de colesterol da HDL, apesar de não significativos, para os compostos do grupo 2. Ganham destaque, os compostos C1, C6 e C9, os quais além de ultrapassarem os valores obtidos para a dieta normal, aproximam-se das concentrações obtidas para o tratamento com a lovastatina.

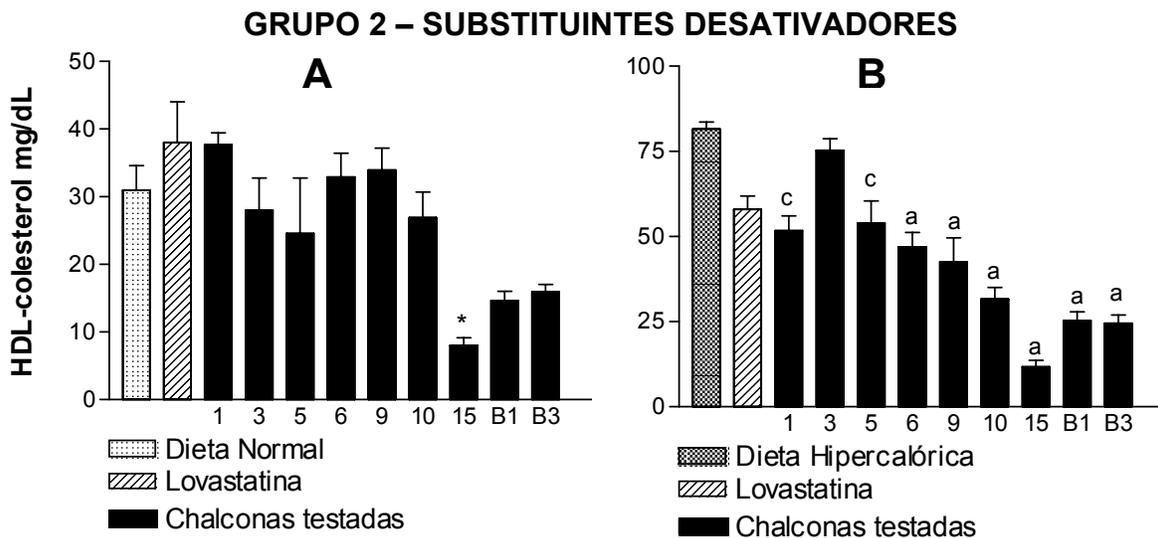


Figura 22. Concentrações séricas de colesterol da HDL (mg/dL) em ratos tratados durante trinta dias com dieta normal (A) ou hipercalórica (B) e as chalconas C1, C3, C5, C6, C9, C10, C15, B1 e B3 ou lovastatina (v. o.) e grupos controles. Todos os resultados são expressos em termos de média \pm EPM, n=6. (*) diferença estatisticamente significativa em relação a dieta normal; (a) e (c) diferença estatisticamente significativa em relação a dieta hipercalórica ($p < 0,001$) e ($p < 0,05$), respectivamente.

Levando em consideração a dieta hipercalórica, somente o composto C12 do grupo 3 (Figura 23), apresentou um perfil de interesse elevando em 18,06%, apesar de não significativo estatisticamente, os valores séricos de colesterol da HDL.

No entanto, o composto C11 apresentou valores séricos de colesterol da HDL, muito próximos ao valor obtido pelo fármaco de referência, lovastatina.

Os compostos do grupo 3, C16 e C19, demonstraram um aparente aumento de 48,42% e 23,43%, nas concentrações séricas de colesterol da HDL, quando comparados a dieta normal; além de apresentarem valores séricos acima daqueles obtidos para a lovastatina (Figura 23).

GRUPO 3 – SUBSTITUINTES ATIVADORES

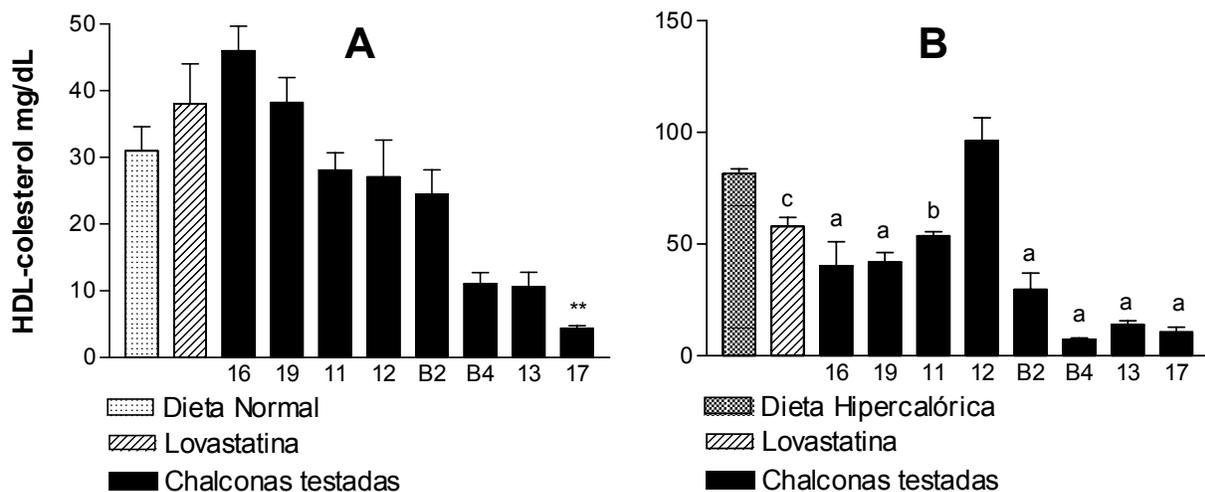


Figura 23. Concentrações séricas de colesterol da HDL (mg/dL) em ratos tratados durante trinta dias com dieta normal (A) ou hipercalórica (B) e as chalconas C16, C19, C11, C12, B2, B4, C13 e C17 ou lovastatina (v. o.) e grupos controles. Todos os resultados são expressos em termos de média \pm EPM, n=6. (**) diferença estatisticamente significativa em relação a dieta normal ($p < 0,01$), (a), (b) e (c) diferença estatisticamente significativa em relação a dieta hipercalórica ($p < 0,001$), ($p < 0,01$) e ($p < 0,05$), respectivamente.

4.3.2.4 Concentrações séricas de colesterol da LDL

Como pode ser observado na figura 20, os valores séricos de colesterol da LDL não foram reduzidos pelos compostos C7 e C20, em comparação as dietas hipercalórica e normal.

Este perfil difere daquele obtido para a lovastatina, no qual tem-se uma redução de 98,27% nas concentrações séricas de colesterol da LDL, em relação a dieta hipercalórica e, uma redução de 18,95% em relação a dieta normal.

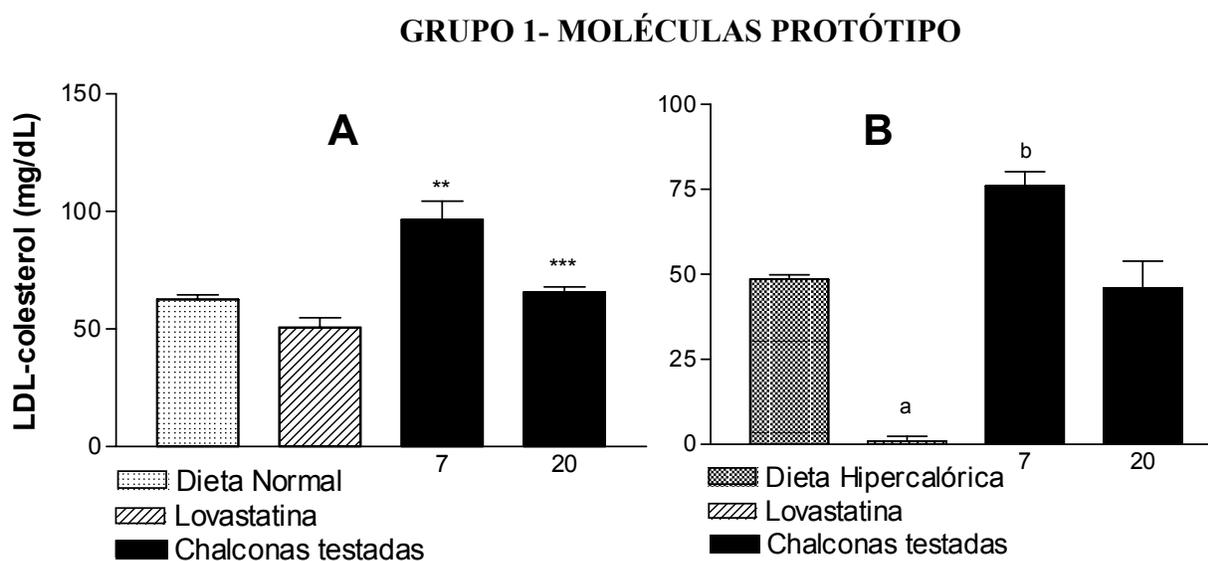


Figura 24. Concentrações séricas de colesterol da LDL (mg/dL) em ratos tratados durante 30 dias com dieta normal (A) ou hipercalórica (B) e as chalconas C7 e C20 ou lovastatina (v. o.) e grupos controles. Todos os resultados são expressos em termos de média \pm EPM, n=6. (***) e (**) diferença estatisticamente significativa em relação a dieta normal ($p < 0,001$) e ($p < 0,01$), respectivamente; (a) e (b) diferença estatisticamente significativa em relação a dieta hipercalórica ($p < 0,001$) e ($p < 0,01$), respectivamente.

No grupo 2, entretanto, os compostos C3 e C1 apresentaram redução de 97,38% e 88,78%, respectivamente com significância de $p < 0,001$; também o composto C5 apresentou redução de 52%, com significância de $p < 0,05$, em relação a dieta hipercalórica (Figura 25).

A redução de 98,27% da lovastatina, nas concentrações de colesterol da LDL, não foi superada pelos compostos C1 e C3, no entanto, o composto C3 alcançou valores de redução muito próximos ao do fármaco de referência.

Quando comparados com os valores séricos de colesterol da LDL obtidos com a dieta normal, os valores obtidos pelos compostos C1, C3 e C5 permanecem reduzindo 85,89%, 34,60% e 53,41% respectivamente, redução esta que não foi observada com a lovastatina. O composto C6 comportou-se de maneira semelhante a lovastatina, em relação a dieta normal.

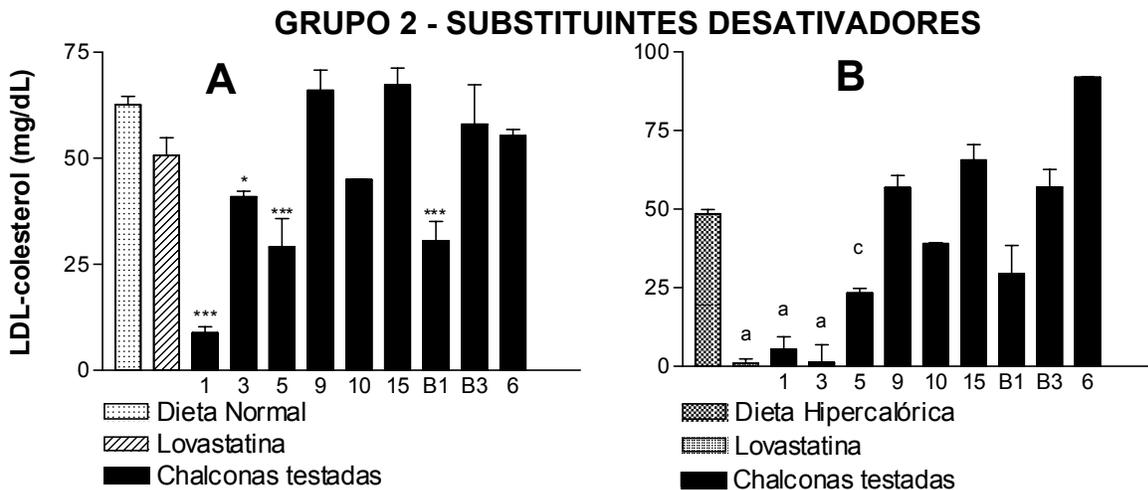


Figura 25. Concentrações séricas de colesterol da LDL (mg/dL) em ratos tratados durante 30 dias com dieta normal (A) ou hipercalórica (B) e as chalconas C1, C3, C5, C9, C10, C15, B1 e B3 ou lovastatina (v. o.) e grupos controles. Todos os resultados são expressos em termos de média \pm EPM, $n=6$. (***) e (*) diferença estatisticamente significativa em relação a dieta normal ($p < 0,001$) e ($p < 0,05$), respectivamente; (a) e (c) diferença estatisticamente significativa em relação a dieta hipercalórica ($p < 0,001$) e ($p < 0,05$), respectivamente.

Uma redução estatisticamente significativa nas concentrações séricas de colesterol da LDL foi observada, somente para o composto C19 do grupo 3, quando comparado aos valores obtidos na dieta hipercalórica, com significância de $p < 0,001$. Os demais compostos deste grupo apresentaram aumento significativo das concentrações de colesterol da LDL em relação a dieta hipercalórica (Figura 26).

Em relação a dieta normal, o mesmo perfil se repete com destaque para o composto C19, o qual reduziu 79,49% os valores séricos de colesterol da LDL, com significância de $p < 0,001$. Apesar dos compostos C16 e C17 apresentarem valores séricos de colesterol da LDL semelhantes ao valor obtido com a lovastatina.

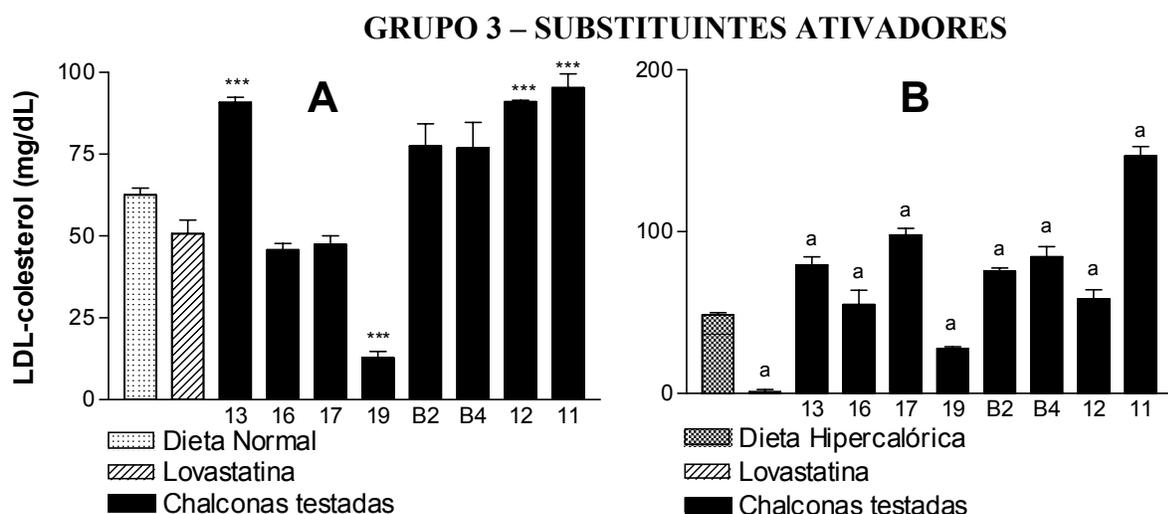


Figura 26. Concentrações séricas de colesterol da LDL (mg/dL) em ratos tratados durante 30 dias com dieta normal (A) ou hipercalórica (B) e as chalconas C13, C16, C17, C19, B2, B4, C12 e C11 ou lovastatina (v. o.) e grupos controles. Todos os resultados são expressos em termos de média \pm EPM, $n=6$. (***) diferença estatisticamente significativa em relação a dieta normal ($p < 0,001$), (a) diferença estatisticamente significativa em relação a dieta hipercalórica ($p < 0,001$).

4.3.2.5 Concentrações séricas de colesterol da VLDL

As concentrações séricas de colesterol da VLDL calculadas apresentaram valores reduzidos para os compostos C20 e C7 com 38,04% e 86,46%, respectivamente em relação a dieta hipercalórica, com significância de $p < 0,001$ (Figura 27).

O composto C7 mostrou-se capaz de reduzir as concentrações séricas de colesterol da VLDL, atingindo valores menores que aquele obtido para o tratamento com a lovastatina.

Em relação a dieta normal as reduções foram de 86,46% para o composto C7 ($p < 0,001$) e 38,04% para o composto C20 ($p < 0,05$), sendo mais significativas que aquelas obtidas para a lovastatina, a qual não apresentou alteração nas concentrações normais de colesterol da VLDL (Figura 27).

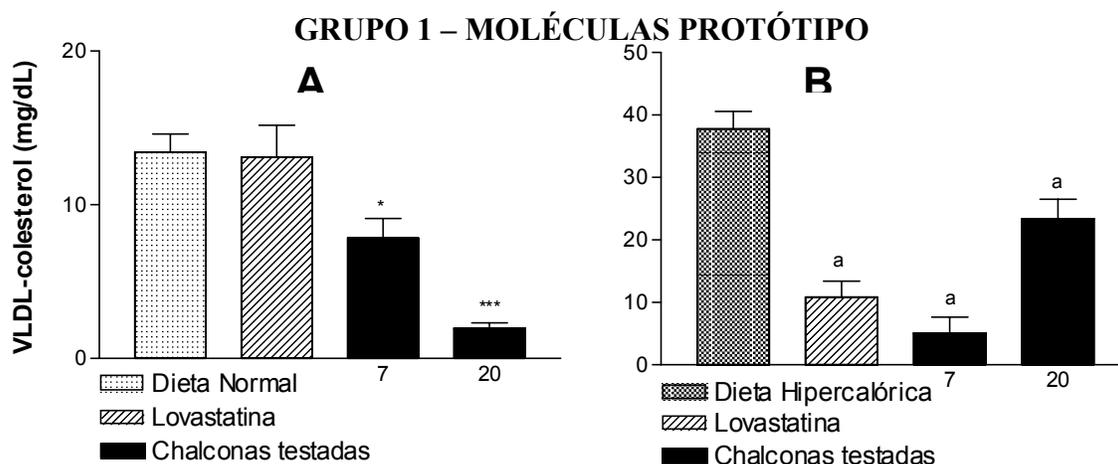


Figura 27. Concentrações séricas de colesterol da VLDL (mg/dL) em ratos tratados durante 30 dias com dieta normal (A) ou hipercalórica (B) e as chalconas C7 e C20 ou lovastatina (v. o.) e grupos controles. Todos os resultados são expressos em termos de média \pm EPM, $n=6$. (***) e (*) diferença estatisticamente significativa em relação a dieta normal ($p < 0,001$) e ($p < 0,05$); (a) diferença estatisticamente significativa em relação a dieta hipercalórica ($p < 0,001$).

A análise da Figura 28, permite verificar uma redução significativa da concentração de colesterol da VLDL, obtida para todos os compostos testados do grupo 2, com relevância para os compostos C3 (69,80%) e C10 (75,97%). Os demais compostos do grupo 2, forneceram reduções variando entre 40,40% (C5) e 52,13% (B1).

Os compostos C3 e C10 foram os que mais se aproximaram dos valores séricos de redução de colesterol da VLDL obtidos com a lovastatina (71,26%) em relação a dieta hipercalórica.

Em relação aos valores séricos de colesterol da VLDL obtidos na dieta normal, todos os compostos do grupo 2, com a exceção do composto C5, comportaram-se de maneira semelhante (C1, B1 e B3) ou superior (C3, C6, C9, C10, C15, B3), mantendo ou diminuindo as concentrações séricas normais de colesterol da VLDL. Com destaque para o composto C9 que reduziu em 59,29%, com significância de $p < 0,05$. O mesmo perfil se repetiu em relação a lovastatina.

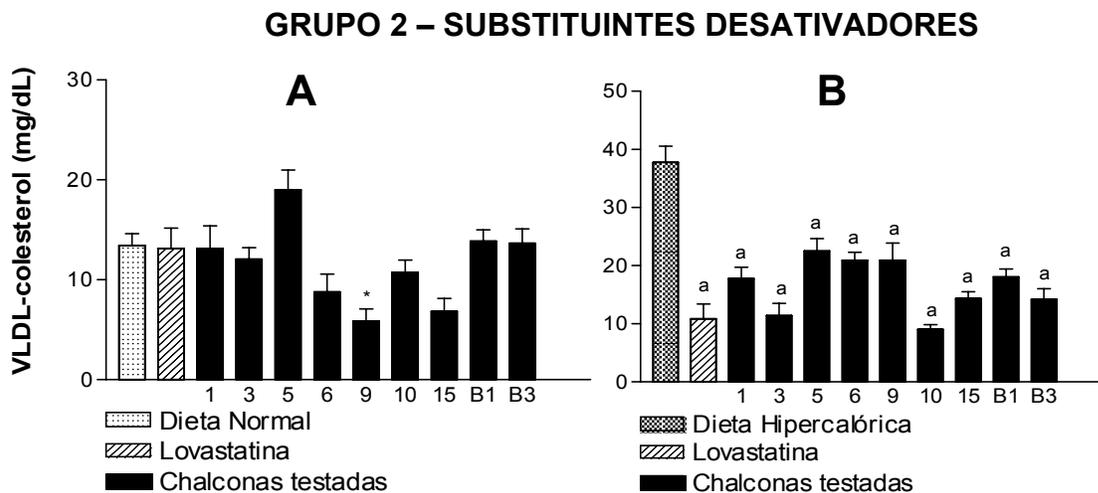


Figura 28. Concentrações séricas de colesterol da VLDL (mg/dL) em ratos tratados durante 30 dias com dieta normal (A) ou hipercalórica (B) e as chalconas C1, C3, C5, C6, C9, C10, C15, B1 e B3 ou lovastatina (v. o.) e grupos controles. Todos os resultados são expressos em termos de média \pm EPM, $n=6$. (*) diferença estatisticamente significativa em relação a dieta normal ($p < 0,05$), (^a) diferença estatisticamente significativa em relação a dieta hipercalórica ($p < 0,001$).

No grupo 3 todos os compostos apresentaram reduções das concentrações de colesterol da VLDL, variando entre 51,50% (C16) e 87,12% (C12), com significância de $p < 0,001$, quando levados em consideração os valores da dieta hipercalórica (Figura 29).

Em relação à lovastatina os compostos C12 e C16 apresentaram valores de redução menores que aqueles obtidos no tratamento com este fármaco.

Os compostos C12, C13, C16 e C17 demonstraram uma tendência à redução dos níveis normais de colesterol da VLDL, como pode ser observado na figura 29. O mesmo não ocorreu para os compostos C19 e B2 que aumentaram os valores de colesterol da VLDL em relação a dieta normal.

Com exceção dos compostos C19 e B2, todas as chalconas testadas do grupo 3, apresentaram reduções, embora não significativas estatisticamente, em relação aos valores obtidos no tratamento com a lovastatina.

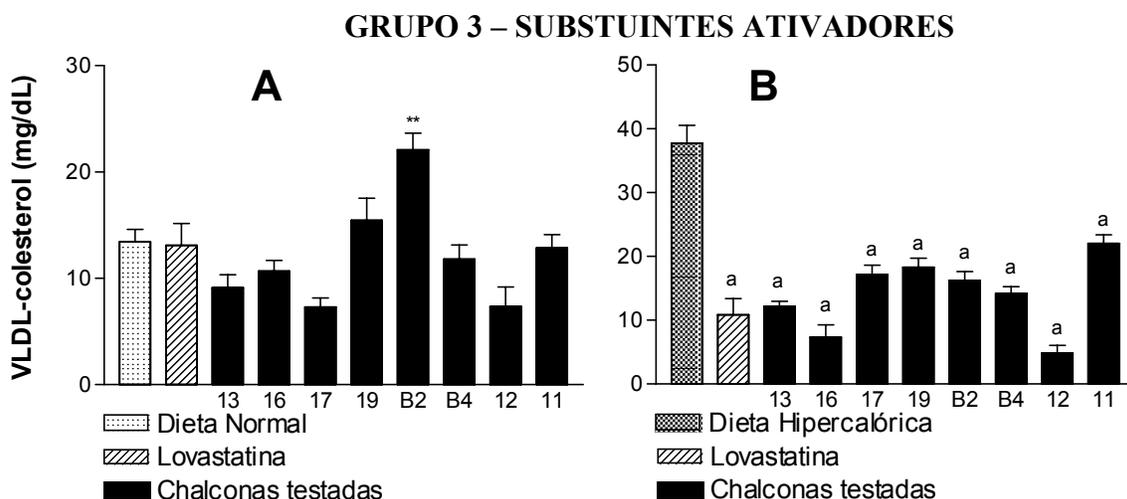


Figura 29. Concentrações séricas de colesterol da VLDL (mg/dL) em ratos tratados durante 30 dias com dieta normal (A) ou hipercalórica (B) e as chalconas C13, C16, C17, C19, B2, B4, C12 e C11 ou lovastatina (v. o.) e grupos controles. Todos os resultados são expressos em termos de média \pm EPM, $n=6$. (**) diferença estatisticamente significativa em relação a dieta normal ($p < 0,01$), (^a) diferença estatisticamente significativa em relação a dieta hipercalórica ($p < 0,001$).

4.3.2.6 Índice anti-aterogênico (IAA) das chalconas testadas

Os maiores valores obtidos no cálculo IAA foram aqueles observados para os compostos do grupo 2, com especial destaque para o composto C3, com 593,92%, superando o valor obtido para a lovastatina de 495,64%, com significância de $p < 0,001$. Nos demais grupos (1 e 3), não houveram aumentos significativos do IAA em relação a lovastatina (Tabela 13).

Já os compostos C15 do grupo 2 e C13, C17 e B4 do grupo 3, apresentaram baixos valores de IAA, quando levados em consideração ao valor obtido para a lovastatina.

Tabela 13. Índice anti-aterogênico, referente a indução de hiperlipidemia após 30 dias, em ratos tratados com as chalconas ou lovastatina (v. o.) e dieta normal ou hipercalórica.

TRATAMENTO	ÍNDICE ANTI-ATEROGÊNICO - IAA [%]	
	Dieta Normal	Dieta Hipercalórica
Lovastatina	59,59±6,21	495,64±1,00
Grupo 1		
C7	31,61±3,21	68,40±0,49 ^a
C20	86,47±1,89 [*]	64,71±4,72 ^a
Grupo 2		
C1	171,20±3,67 ^{***}	222,26±2,03 ^a
C3	52,88±0,15	593,92±7,74 ^a
C5	51,01±4,67	117,83±0,64 ^a
C6	51,31±3,26	66,20±1,38 ^a
C9	47,20±5,98	54,68±0,89 ^a
C10	48,27±1,05	65,74±0,45 ^a
C12	27,51±0,13 ^{**}	152,24±3,35 ^a
C15	10,83±5,27 ^{***}	14,64±6,11 ^a
B1	26,63±5,70 ^{**}	53,30±10,41 ^a
B3	22,20±10,70 ^{***}	34,51±7,40 ^a
Grupo 3		
C11	110,55±5,60 ^{***}	183,20±6,49 ^a
C13	11,21±2,85 ^{***}	15,27±5,88 ^a
C16	81,42±2,90 ^{***}	64,82±6,92 ^a
C17	8,02±3,49 ^{***}	11,27±5,64 ^a

C19	135,17±0,21 ***	90,91±2,47 ^a
B2	24,54±8,47 **	32,35±0,65 ^a
B4	12,49±9,18 ***	7,38±7,44 ^a

Todos os resultados são expressos em termos de média ± EPM, n=6.
 (***) , (**) e (*) diferença estatisticamente significativa em relação a lovastatina com dieta normal ($p<0,001$), ($p<0,01$) e ($p<0,05$), respectivamente,
 (^a) diferença estatisticamente significativa em relação a lovastatina com dieta hipercalórica ($p<0,001$).

4.3.2.7 Concentrações hepáticas de colesterol total e triglicérides

Os resultados apresentados na Figura 30 mostraram que a dieta hipercalórica provocou um aumento significativo na concentração dos lipídeos hepáticos nos animais, em relação a dieta normal (48,49%, $p<0,001$), condizente com o perfil lipídico de animais hiperlipêmicos.

A administração da chalcona C3, com substituição somente no anel aromático A, provocou uma redução significativa no conteúdo tecidual de colesterol total, na ordem de 73,97% ($p<0,001$), em relação a dieta hipercalórica. Os compostos C1 e C10, com substituintes nos anéis aromáticos A e B, apresentaram uma redução significativa um pouco menor nas concentrações hepáticas de colesterol total, na ordem de 59,18% e 61,95%, respectivamente, em relação a dieta hipercalórica (Figura 30-B).

As concentrações teciduais de colesterol total obtidas após administração da dieta hipercalórica e tratamento com as chalconas C1, C3 e C10 apresentaram valores menores que os obtidos com a dieta normal, com reduções de 20,75%, 49,46% e 26,12%, respectivamente (Figura 30-B).

Curiosamente, todos os compostos apresentaram maiores percentagens de redução nas concentrações hepáticas de colesterol total do que a lovastatina, em relação tanto a dieta normal quanto a hipercalórica.

SUBSTITUINTES DESATIVADORES

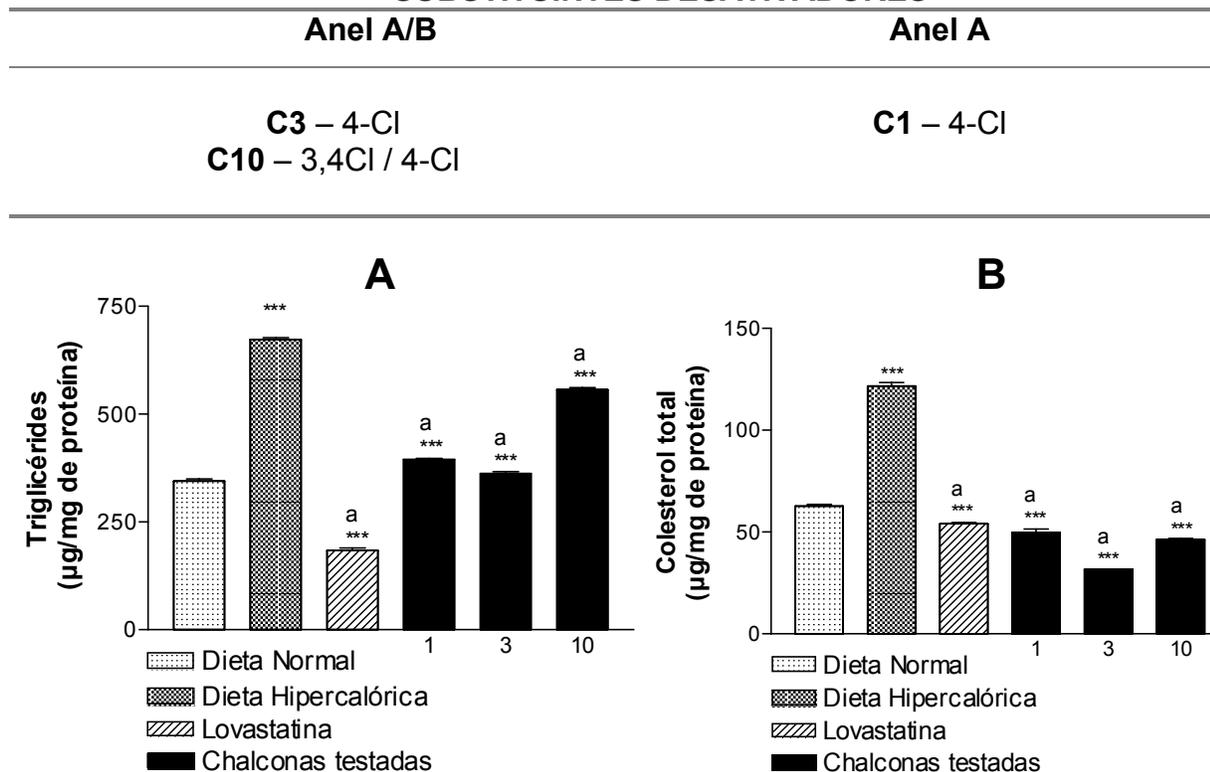


Figura 30. Concentrações hepáticas de triglicérides teciduais (gráfico A) e de colesterol total (gráfico B) (mg/dL) em ratos tratados durante 30 dias com dieta hipercalórica ou normal e as chalconas C1, C3 e C10 ou lovastatina (v. o.) e grupos controles. Todos os resultados são expressos em termos de média \pm EPM, n=6. (***) diferença estatisticamente significativa em relação a dieta normal ($p < 0,001$), (a) diferença estatisticamente significativa em relação a dieta hipercalórica ($p < 0,001$).

Além do conteúdo de colesterol total, as concentrações de triglicérides hepáticos também foram avaliados, novamente a chalcona C3 destacou-se apresentando uma redução de 46,18% ($p < 0,001$), no conteúdo tecidual de triglicérides, em relação a dieta hipercalórica. Os compostos C1 e C10, provocaram uma redução significativa, de 41,43% e 17,29%, respectivamente, em relação a dieta hipercalórica (Figura 30-A).

Em relação a dieta normal, nenhum dos compostos demonstraram capacidade de normalizar as concentrações hepáticas de triglicérides, fato que pode ser observado nos resultados referentes a lovastatina, a qual apresentou uma redução de 46,70% ($p < 0,001$), em relação ao controle normal (Figura 30-A).

5. DISCUSSÃO

PARTE I – ESTUDOS QUÍMICOS

Compostos que apresentam rotação restrita podem exibir isomerismo *cis-trans*. Estes compostos não apresentam rotação em um plano de luz polarizada (a menos que também sejam quirais) e suas propriedades isoméricas não são idênticas. A rotação em torno das ligações simples carbono-carbono é um processo bem conhecido e largamente estudado em diversas classes de substâncias orgânicas (CAREY, JOHNSON, 1992). Podemos, destacar, em particular, a rotação livre em torno da ligação simples em sistemas conjugados do tipo $X=CR_1-CR_2=Y$, onde também é amplamente aceita a hipótese de que, quando possível, esses sistemas adotam conformações planas permitindo que a estrutura seja estabilizada pelo processo de ressonância. São possíveis para estes sistemas duas estruturas planas (*s-cis* e *s-trans*) e, em muitos casos, pode ser estabelecido um equilíbrio entre estas duas conformações, sendo a proporção de isômeros *s-cis* e *s-trans* dependente (Figura 31), exclusivamente, de como os grupos substituintes X, Y, R1 e R2 interagem entre si e com o ambiente químico (CESARIN, FERREIRA, BRAZ, 2001).

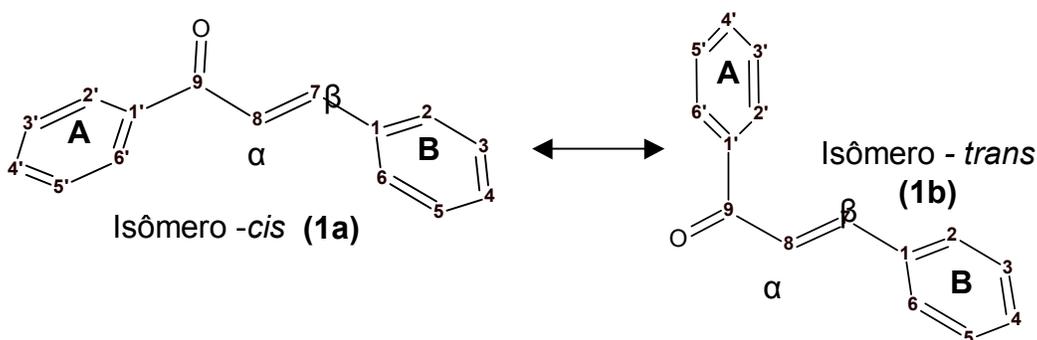


Figura 31. Estrutura geral das chalconas e seus isômeros *cis* e *trans*

A estrutura chalcônica apresenta isomerismo resultante das duplas ligações e dos anéis aromáticos. Os dois átomos de carbono da dupla ligação C=C e os quatro átomos diretamente ligados a eles encontram-se todos no mesmo plano, de uma forma que, sua rotação ao redor da dupla ligação torna-se previsível. Isto significa que, no caso do sistema WXC=CYZ, estereoisômeros existem quando $W \neq X$ e $Y \neq Z$. Desta forma, há dois e somente dois isômeros (E e F), na superposição de sua imagem no espelho, a menos que, um de cada grupo apresente um centro quiral. Existem duas formas de nomear cada um dos isômeros, em um método mais antigo, um isômero é chamado cis e o outro trans. Quando $W=Y$, E é o cis e F é o isômero trans. No entanto, não se torna fácil aplicar esta nomenclatura quando os quatro grupos são diferentes. Neste caso, pode ser aplicado o método conhecido como sistema Cahn-Ingold-Prelog (MARCH, JERRY, 1929), onde os isômeros são chamados de Z e E, de acordo com a disposição dos grupos na molécula (Figura 32).

Com base nos resultados fornecidos por espectros de H^1 -RMN foi possível correlacionar os deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio (δ_H) das chalconas e seus derivados bromados. Para uma interpretação correta dos valores de δ_H para as chalconas considerou-se as mudanças na posição do equilíbrio conformacional cis (Figura 31, 1a) / *trans* (Figura 31, 1b), bem como da origem sintética de isômeros com configurações Z (Figura 32, 1a) ou E (Figura 32, 1b), pois como o deslocamento químico é uma média ponderada dos efeitos sofridos pelo núcleo em relação ao ambiente em que se encontra, então, um aumento da concentração do isômero Z e, conseqüentemente, uma diminuição na concentração de E, acarreta alterações significativas nas posições de absorção de 1H (CESARIN, FERREIRA, BRAZ, 2001).

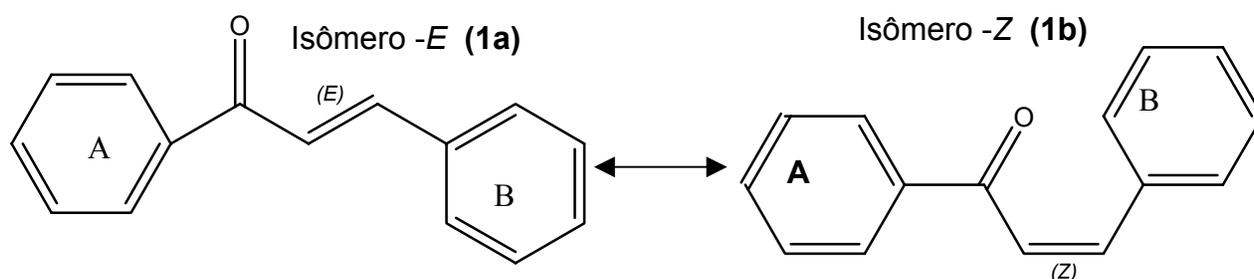


Figura 32. Estrutura geral das chalconas e seus isômeros E e Z

Em geral, a conformação estrutural *Z*, apresenta deslocamentos em campo mais alto, quando comparados aos valores de deslocamento obtidos para o isômero *E*, segundo CASTELLS e CAMPS (1970), a diferença ($\Delta\delta$) pode chegar a 0,44 ppm para os prótons $H\beta$ e 0,26 ppm para os prótons $H\alpha$. No entanto, em diversos estudos as análises de RMN H de inúmeras chalconas sintéticas demonstram que existe uma predominância na formação do isômero *E*, acredita-se que este fato esteja intimamente relacionado ao calor de formação e estabilidade conformacional destes compostos (LÓPEZ, CASTELLI, ZACCHINO *et al.*, 2001).

Nossas análises em relação aos deslocamentos referentes aos prótons olefínicos permitem sugerir que todos os compostos C11-C20 possuem a configuração *E*, isto pode ser observado através das constantes de acoplamento $H\alpha$, $H\beta$, as quais apresentaram variações de 12-16 Hz, valores estes condizentes com a literatura (RAM, SAXENA, SRIVASTAVA *et al.*, 2000; CORRÊA, PEREIRA, BUFFON *et al.*, 2001; LÓPEZ, CASTELLI, ZACCHINO *et al.*, 2001). Para os compostos C13^a, C15^b, C16^b, C19^a (já relatados na literatura), a comparação dos pontos de fusão obtidos permitem afirmar a configuração *E* dos compostos (WHITE, MARR, BOWDENN, 1998^a; LOPEZ, CASTELLI, ZACCHINO *et al.*, 2001^b). Já os compostos C14 e C18 necessitam de ampliações da região dos prótons aromáticos, para que se possa obter as constantes de acoplamento que permitam afirmar a isomeria *E*, apesar da tendência já observada para esta conformação.

De acordo com a natureza dos substituintes, podemos classificar as interações quanto aos efeitos estéricos causados por substituintes volumosos (chalconas B1-B4), aos efeitos eletrônicos decorrentes da diferença de eletronegatividade (chalconas C11-C20), ou a presença de sítios ácido/base de Lewis possibilitando a formação de ligações de hidrogênio e/ou complexos intra e intermoleculares (CESARIN, FERREIRA, BRAZ, 2001).

Os núcleos mais importantes que foram avaliados no esqueleto chalcônico foram o H-7 (β em relação ao grupo carbonila), H-8 (α em relação ao grupo carbonila), sendo dois os principais efeitos observados que influenciam o deslocamento químico de 1H para este

tipo de composto cetônico, os quais também encontram-se descritos na literatura: (i) o efeito anisotrópico exercido principalmente pelos anéis aromáticos e, em menor intensidade, pela carbonila sobre os hidrôgenios H-7 e H-8; (ii) os efeitos indutivo e mesomérico transmitidos através da conjugação para os hidrogênios (SHIBATA, 1994; CESARIN, FERREIRA, BRAZ, 2001).

O estudo por RMN ^1H realizados para as chalconas e seus derivados bromados mostraram que os deslocamentos químicos dos hidrogênios olefínicos H-7 e H-8 dependem principalmente do ambiente químico gerado pelos anéis aromáticos e seus substituintes. Os efeitos gerados pela presença de substituintes polares no anel aromático (anel B), como o substituinte NO_2 (composto C15), sugere-se serem transmitidos por efeitos de ressonância para H-8 e por mecanismo indutivo para H-7. Por outro lado, substituintes sustentados pelo anel aromático (anel A) ligado ao carbono carbonílico sugere-se exercerem efeito indutivo maior em H-8 do que em H-7, o que pode ser observado nos deslocamentos citados pela literatura (BOIS, BENEY, BOUMENDJEL *et al.*, 1998; CORREA, PEREIRA, BUFFON, *et al.*, 2001).

Acredita-se que o sinais de menor deslocamento químico, uma média de $\delta \sim 7,56$ para as chalconas e $\delta \sim 7,44$ para as chalconas com duplas conjugadas, representam o hidrogênio que está ligado ao carbono olefínico conjugado a carbonila, definido-se assim o sinal correspondente ao H-7 ou $\text{H}\alpha$. Já o sinal de maior deslocamento químico, uma média de $\delta \sim 7,63$ para as chalconas, $\delta \sim 7,51$ para as chalconas sintetizadas a partir do cinamaldeído, também observado na região de absorção dos hidrogênios aromáticos, sugere-se representarem o hidrogênio H-8 ou $\text{H}\beta$. Estes resultados estão em acordo com os valores descritos na literatura (BOIS, BENEY, BOUMENDJEL *et al.*, 1998; CESARIN, FERREIRA, BRAZ, 2001; CORREA, PEREIRA, BUFFON, *et al.*, 2001).

Em relação aos valores encontrados para os deslocamentos químicos de $\text{H}\alpha$ e H-2', pode-se interpretá-los como descrito a seguir. O H-2' encontra-se ligado diretamente a um anel aromático A (6 elétrons π em um sistema cíclico) enquanto que o $\text{H}\alpha$ está associado a uma ligação dupla (2 elétrons π), justificando a maior desproteção anisotrópica sentida

pelo H-2' (maior deslocamento químico). Curiosamente, para os derivados que possuem duplas conjugadas, este deslocamento apresenta-se em campo mais alto, ou seja, com menor deslocamento químico devido a menor influência da ressonância dos anéis e dos efeitos indutivos exercidos pelos substituintes.

Obviamente, os deslocamentos químicos para estes hidrogênios H-2' e H-7 dependem também da contribuição anisotrópica exercida pelo grupo carbonila e, conseqüentemente, das suas posições ocupadas em relação ao cone de anisotropia correspondente (PAVIA, LAMPMAN, KRIZ, 1979).

No deslocamento dos prótons ligados a carbonos halogenados espera-se valores de aproximadamente 4,3 ppm, no entanto, para as chalconas bromadas avaliadas os deslocamentos destes prótons H-7 e H-8 encontram-se na região de $\delta \approx 6,73$ para H8 e de $\delta \approx 5,84$ para H7, isto ocorre principalmente devido aos efeitos de ressonância dos anéis aromáticos, e a presença da carbonila.

Efetuando-se a comparação entre os dados espectrais das 10 chalconas e dos 4 derivados bromados foi possível obter informações relativas à influência dos átomos de bromo, no deslocamento químico dos principais átomos de hidrogênio classificados como os mais informativos sob o ponto de vista estrutural, isto é, H-2', H-7, H-8. A eletronegatividade e tamanho dos átomos de Br aumentam o efeito estérico exercido sobre as ligações carbono-carbono e, acabam influenciando o deslocamento dos prótons H-7 e H-8, os valores obtidos para os deslocamentos químicos com base nos derivados bromados, permitem avaliar a influência destes efeitos eletrônicos.

Diante destas informações, foi possível então, interpretar com maior segurança os dados espectrais de RMN ^1H para as chalconas e seus derivados bromados, considerando-se que os valores dos deslocamentos químicos encontrados para os hidrogênios H-2'/H-6', H7 e H-8, permitem identificar as principais alterações químico-estruturais que influenciam os deslocamentos esperados para estes compostos.

PARTE II – ESTUDOS BIOLÓGICOS

5.1 Atividade hipocolesterolêmica

No primeiro modelo experimental utilizado no presente estudo, visamos detectar e selecionar compostos com potencial hipolipemiante. De acordo com a literatura no modelo de hiperlipemia induzida pela administração intraperitoneal de Triton WR 1339, podemos trabalhar com a administração oral dos compostos em questão e 8 horas após o tratamento obtém-se elevações significativas do perfil lipídico suficiente para as avaliações bioquímicas do potencial hipolipemiante das chalconas em estudo (SCHURR, SCHULTZ, PARKINSON, 1972; GOLDBERG, MELLON, WITIAK *et al.*, 1977; KHANNA, RIZUI, CHANDER, 2002).

O Triton WR 1337 é um agente surfactante não-iônico, que tem sido utilizado como agente hiperlipemiante desde 1951 (MCPHERSON, MCPHERSON, 1986). Seu uso permite que seja verificado se, a suposta ação dos compostos avaliados dá-se principalmente pela inibição da síntese do colesterol (MCPHERSON, SCHUSTER, DIRKSEN, 1975) uma vez que a administração intra-peritoneal deste agente a ratos adultos, promove um aumento de todos os parâmetros mensurados no metabolismo lipídico, em um prazo mínimo de 8 horas, atingindo um pico máximo em 20 horas (GARATTINI, PAOLETTI, BIZZI *et al.*, 1961).

No modelo Triton WR 1339, supõe-se que a alteração da estrutura micelar das lipoproteínas impede o reconhecimento celular por intermédio de receptores específicos, dos quais o receptor de membrana apo B/apo E da LDL é o mais importante. A expressão destes receptores é a principal responsável pelo nível de colesterol no sangue, sinalizando ordens de ativação ou inibição para os processos de biossíntese lipídica. Como ocorre um bloqueio da comunicação celular, por ausência da interação lipoproteína/receptor específico, o processo de biossíntese permanece ativo e em poucas horas instala-se um processo de hiperlipemia. A interação dos receptores de depuração plasmática apo B100 e apo C com as VLDL, IDL e LDL também é modificada ocorrendo, desta forma, uma

alteração na distribuição de colesterol e triglicérides nestas lipoproteínas. Neste caso, espera-se que os compostos com potenciais hipolipemiantes atuem inibindo a via biossintética do colesterol (MURRAY, GRANNER, MAYES *et al.*, 2000).

Nossos resultados demonstram que todos os compostos testados apresentaram significativas reduções nos níveis de colesterol total, no modelo Triton WR 1339, sendo que alguns compostos (C10, B1, C3 e B4) apresentaram percentuais de redução melhores que aquele obtido para a lovastatina, um potente inibidor da síntese do colesterol. Esses valores de redução quando comparados aos obtidos com a lovastatina nos permitiram classificar arbitrariamente os compostos avaliados em três categorias conforme tabela abaixo:

Tabela 14. Classificação das chalconas avaliadas de acordo com o percentual de redução das concentrações séricas de colesterol total em relação ao grupo controle Triton WR 1339.

Classificação	Compostos	% de redução
Forte efeito redutor	C10, B1, C3, C6, C17, C5, C15, B3, B4	68 – 53
Moderado efeito redutor	C11, C12, C19, B2, C7, C16 e C11	48 – 32
Fraco efeito redutor	C8, C1, C20 e C9	28 – 14

Neste modelo as correlações estrutura-atividade dos compostos aferidos permitiram identificar que: (a) a presença de substituintes halogenados, como cloro e bromo, com propriedades desativadoras, em ambos os anéis da estrutura chalcônica aumentaram a atividade hipocolesterolêmica; (b) a substituição da dupla ligação dos carbonos olefínicos por átomos de bromo diferentemente do esperado, não apresentou alterações na atividade hipocolesterolêmica; (c) a presença do átomo de bromo como substituinte no anel A, assim como o grupo -NO₂ no anel B, também, apresentou fortes efeitos redutores; (d) a ponte de três carbonos formada entre os dois anéis aromáticos apresentou influência

negativa na atividade hipocolesterolêmica, uma vez que o aumento da cadeia carbônica entre eles, foi responsável por uma redução da atividade; (e) a substituição do átomo de cloro somente no anel A ou B diminuiu os valores de redução quando comparados a substituições aromáticas com os grupos também eletrosacadores como $-\text{NO}_2$ e $-\text{Br}$.

Estes resultados sugerem uma ação inibitória sobre a biossíntese do colesterol, possivelmente, através do bloqueio de algum passo reacional importante, que parece estar envolvido com a presença de importantes grupos farmacofóricos. O fato da enzima HMG-CoA redutase ser responsável pela catálise de um dos primeiros passos na via biossintética do colesterol, atuando por diferentes mecanismos regulatórios tais como: inibição retroativa, ação hormonal, ou ainda transcrição genética; permite que esta enzima torne-se o principal alvo a ser atingido por fármacos hipocolesterolêmicos e, portanto, um dos possíveis alvos das chalconas avaliadas (BROWN, YE, RAWSON *et al.*, 2000). No entanto, posteriores ensaios de inibição específica desta enzima devem ser feitos para que se possa localizar e identificar quais os passos biossintéticos que estariam efetivamente sendo bloqueados.

A inibição da HMG-CoA redutase leva a uma diminuição do colesterol endógeno, caracterizando um aumento do número e da atividade funcional dos receptores de LDL de membrana (apo B/apo E) e um aumento proporcional, via receptores, da depuração plasmática das lipoproteínas com apo B 100 ou apo E; sendo elas: VLDL, IDL e LDL. Este processo ocorre em todas as células nucleadas, porém, é de suma importância no fígado, já que é órgão central da homeostasia do colesterol endógeno, responsável pela síntese de ácidos biliares, pela produção e secreção de algumas lipoproteínas (OLIVEIRA, 2001).

Como inibidor específico da HMG-CoA redutase, a lovastatina é, amplamente, utilizada na terapêutica reduzindo a hiperlipemia e os índices da doença aterosclerótica. A semelhança estrutural deste fármaco com o substrato HMG do HMG-CoA, permite supor ter esta característica estrutural um papel chave na ação inibitória dos mesmos sobre a HMG-CoA redutase, caracterizando, então, um mecanismo geral de ação farmacológica (Figura 33). Este fundamento sugere que os compostos envolvidos na inibição desta

enzima devem interagir, de certa forma, com os sítios ativos envolvidos pela estrutura helicoidal, criando uma ligação restrita às porções específicas de recepção do substrato HMG na enzima, podendo apresentar diferentes características relacionadas ao comportamento farmacocinético, potencial de interações medicamentosas e propriedades de solubilidade (SCHIEFFER, DREXLER, 2003).

As 16 chalconas e seus 4 derivados bromados testados apresentam estruturas químicas cíclico-planares comuns entre si, propriedade esta não encontrada nas estruturas dos inibidores clássicos da biossíntese do colesterol, como as estatinas (CESARIN, FERREIRA, BRAZ, 2001). No entanto, algumas das características estruturais das estatinas, identificadas em estudos utilizando a cristalografia de raios X (ISTVAN, 2003), podem ser relacionadas às estruturas chalcônicas que melhores resultados apresentaram nos estudos de hipocolesterolemia, como por exemplo a presença de carbonos α , β -insaturados, entre dois grupo hidrofóbicos, típica do esqueleto chalcônico e das estatinas do tipo II (Figura 33-1b) e a substituição halogenada nos anéis aromáticos que se assemelham a porção fluor-fenil das estatinas do tipo II (Figura 33-1b).

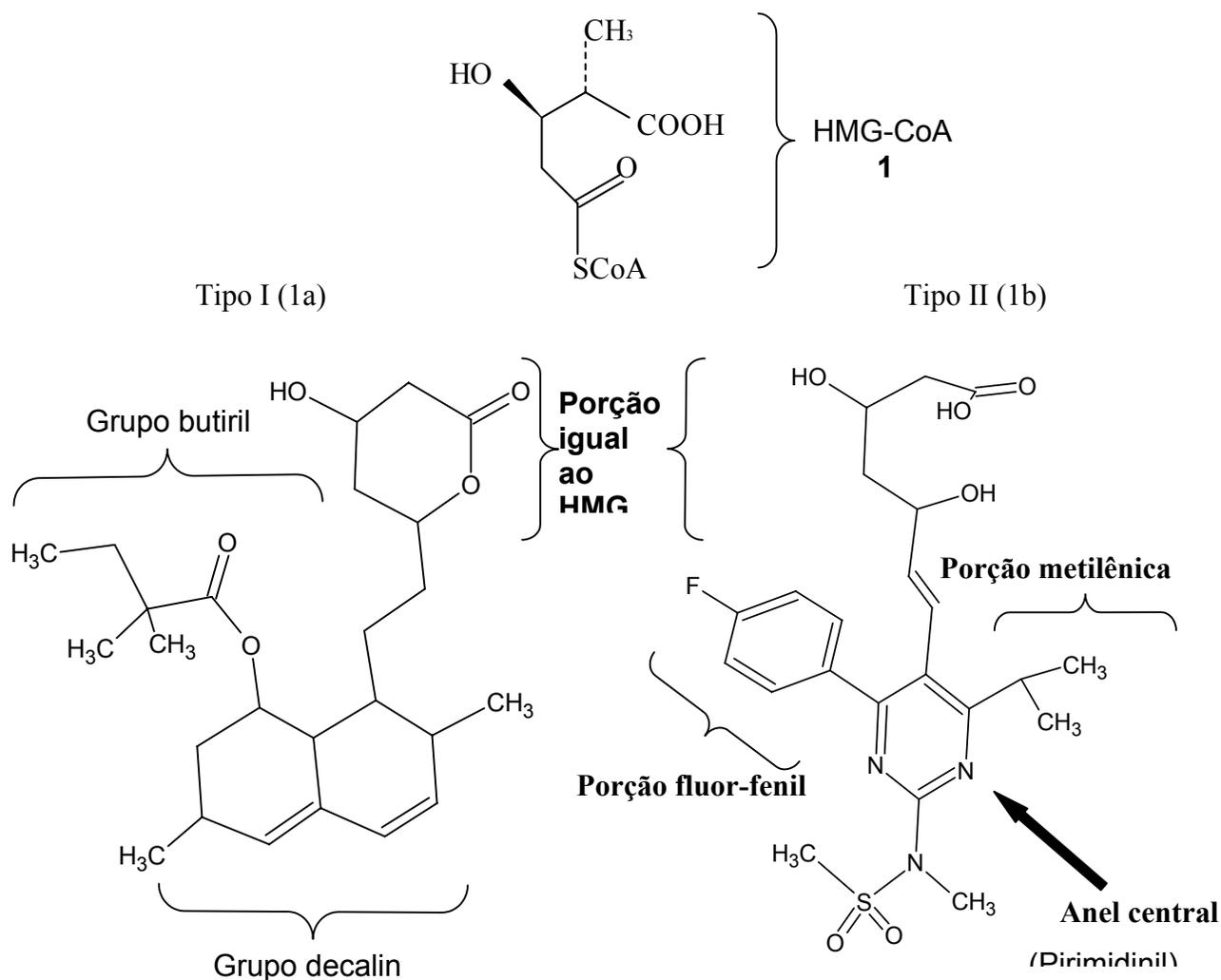


Figura 33. Estruturas da HMG-CoA (1), estatinas do tipo I (1a) e estatina do tipo II (1b). Segundo ISTVAN, 2003.

Dentre os complexos de interação entre as estatinas e a porção catalítica da enzima HMG-CoA verificou-se a importância dos grupos hidrofóbicos ocupando, através de diferentes tipos e números de interações dependentes das diferenças estruturais das moléculas, os sítios expostos através do movimento flexível da estrutura helicoidal sobre o sítio catalítico da enzima. As estatinas do tipo I (sinvastatina) apresentam interação através do anel decalínico (Figura 33, 1a), as estatinas do tipo II (rosuvastatina, atorvastatina, fluvastatina) exibem ligação adicional via grupos fluor-fenil (Figura 33, 1b), sendo que a rosuvastatina e atorvastatina exibem capacidade de formar ligações

hidrogênio, e a rosuvastatina, ainda, exibe uma ligação única através da eletronegatividade do grupo sulfonado (ISTVAN, 2003). Curiosamente as chalconas halogenadas, assim como aquelas substituídas por grupamentos com características eletronegativas como NO₂ apresentaram melhores resultados na redução dos níveis de colesterol total.

Além de um possível efeito inibitório sobre a HMG CoA, em nosso estudo não se descarta a hipótese já descrita em trabalhos recentes, que apontam para o desenvolvimento de novos fármacos que possuem atividade inibitória sobre as enzimas esqualeno sintetase, esqualeno epoxidase e oxido-esqualeno ciclase, enzimas envolvidas na síntese e ciclização do esqualeno, importantes passos na via biossintética do colesterol (WENTZINGER, BACH, HARTMANN, 2002; CHUGH, RAY, GUPTA, 2003; HIYOSHI, YANAGIMACHI, ITO *et al.*, 2003). Tendo em vista os resultados obtidos com as chalconas em modelo de “screening” farmacológico onde a inibição da síntese do colesterol é inespecífica é possível especular que eventualmente os compostos em estudo possam atuar sobre algumas enzimas de síntese do esqualeno, com conseqüente repercussão sobre o produto final, o colesterol.

Entretanto, não podemos perder de vista que aqueles compostos classificados como fortes agentes redutores de colesterol apresentaram um comportamento lipêmico semelhante a lovastatina, inibidor específico da HMG-Coa redutase. Esta enzima por ser alostérica e marca-passo representa o principal ponto de regulação da biossíntese do colesterol, e conseqüentemente sua inibição levaria a forte redução nos níveis circulantes de colesterol, o que foi claramente observado no tratamento com a lovastatina no modelo com o Triton WR1339 e, algumas chalconas reproduziram este perfil. Já aquelas que apresentaram moderado ou fraco efeito redutor de colesterol poderiam ter sua ação eventualmente associada a biossíntese do esqualeno, que por não estar associado a enzimas regulatórias/alostéricas não teriam forte impacto na somatória final da via sintética deste esterol.

Outra possibilidade seria as diferentes afinidades de alguns dos compostos pelo sítio catalítico das enzimas de biossíntese, particularmente a HMG CoA redutase, o que poderia justificar a grande diferença observada em relação a resposta hipocolesterolêmica manifestada pelas chalconas e derivados bromados avaliados.

Em relação às concentrações séricas de colesterol da HDL avaliadas no modelo Triton WR 1339, não houve aumentos significativos, nem mesmo para a lovastatina, apesar de alguns compostos manterem as concentrações acima dos valores normais. No entanto, deve levar-se em consideração que este modelo não possibilita a avaliação adequada deste parâmetro. Neste caso, interessa somente as concentrações de colesterol total e triglicérides, uma vez que a ação detergente do Triton WR 1339 sobre a estrutura das lipoproteínas, em especial da VLDL, inviabiliza a correlação entre as concentrações séricas de lipídeos presentes nas lipoproteínas (OLIVEIRA, 2001).

Os resultados obtidos no primeiro modelo experimental do Triton WR 1339, instigaram a confirmação desta ação hipocolesterolêmica das chalconas e seus derivados di-bromados em longo prazo, com administrações diárias e sob condições próximas à normalidade. As concentrações adotadas para a administração diária dos compostos foram mantidas em relação às administradas no teste Triton WR 1339. No entanto, como o modelo animal utilizado apresenta fortes mecanismos supressores da síntese do colesterol, houve necessidade de forçar uma condição hipercalórica para estimular a síntese do colesterol (ENDO, TSUJITA, KURODA *et al.*, 1977).

Neste modelo o grande aporte de nutrientes fornecidos pelo elevado teor de carboidrato fornecido pela dieta hipercalórica, causa um aumento de substratos e hormônios como a insulina, que elevam a atividade e síntese de enzimas das vias biossintéticas, resultando no preenchimento das reservas energéticas e em diversas outras sínteses. O aumento dos níveis de insulina estimula enzimas-chave da via glicolítica que causam um aumento na produção de acetil-CoA e de oxaloacetato acelerando o Ciclo de Krebs e, portanto, a produção de NADH e FADH₂ que estimulam por sua vez a produção de ATP (MURRAY, GRANNER, MAYES *et al.*, 2000). Este aumento

de potencial redutor bem como de compostos de alta energia leva a um desvio do acetil-CoA para a produção de malonil-CoA que por ser substrato específico ativa a síntese de ácidos graxos e triacilglicerídeos, simultaneamente inibindo sua degradação dos ácidos graxos recém formados, especialmente no fígado. Como produtos de síntese dos hepatócitos, os ácidos graxos, triacilglicerídeos, fosfolipídeos, colesterol e apolipoproteínas formam as lipoproteínas que são lançadas na circulação (MARZZOCCO, TORRES, 1999). Enquanto o excesso de nutrientes for contínuo, como no caso da dieta hipercalórica, se estabelece uma condição hiperlipêmica com conseqüências secundárias de estímulo da síntese de lípideos, como colesterol e triglicérides. Por este motivo, este segundo modelo experimental nos permite avaliar em longo prazo a ação dos compostos sobre a biossíntese do colesterol e triglicérides a partir de uma condição fisiológica ao invés de uma imposição drástica de hiperlipidemia por alterações físico-químicas na superfície das lipoproteínas como é o caso do modelo do Triton WR1339.

Com a exceção do composto C11, todos os compostos testados apresentaram reduções estatisticamente significativas nas concentrações séricas de colesterol total, em relação à dieta hipercalórica, sendo que os compostos B1, C1 e C10 apresentaram percentuais de redução muito próxima ao valor obtido pela lovastatina de 59%. De acordo com os níveis de redução as chalconas foram divididos arbitrariamente em três grupos conforme apresentada na tabela abaixo.

Tabela 15. Classificação dos compostos chalcônicos de acordo com o percentual de redução das concentrações séricas de colesterol total em relação ao grupo controle tratado com dieta hipercalórica.

Classificação	Compostos	% de redução
Forte efeito redutor	B1, C1, C10, C3, C19, C15, B3 e C5	59 – 41
Moderado efeito redutor	C16, C17, C13, B4, C20 e C7	39 – 32
Fraco efeito redutor	C6, C9, B2 e C12	30 – 5

Novamente observa-se que pequenas alterações estruturais nas moléculas dos compostos avaliados são capazes de produzir ou inibir diferentes respostas hipocolesterolêmicas, confirmando a hipótese da existência de grupos farmacofóricos importantes. A presença de substituintes halogenados como o cloro em ambos os anéis apresentam as melhores atividades tanto para as chalconas quanto para seus derivados bromados, sugerindo que a ausência da dupla ligação sendo substituída por átomos de bromo, não afeta a atividade aferida. O grupo nitro como substituinte no anel B também apresentou fortes efeitos redutores.

Surpreendentemente, o composto C1, substituído somente no anel A, com um átomo de cloro mostrou forte efeito redutor, diferentemente dos resultados obtidos para os compostos com substituintes halogenados em apenas um dos anéis (C6 e C9) e do perfil avaliado no primeiro modelo experimental, onde apresentou fraco efeito redutor. Quando temos a presença de duplas conjugadas entre os anéis, a atividade tende a ser reduzida, assim como a substituição aromática com grupos metil e metóxi, com a exceção do composto C19 que apresentou forte efeito redutor, apesar da substituição 3-OCH₃ no anel B.

Finalmente é importante notar que 60% dos compostos que foram classificados como forte agentes redutores de colesterol no primeiro modelo experimental (Triton WR1339), também apresentaram forte efeito redutor no segundo modelo experimental (dieta hipercalórica), confirmando desta forma, seu potencial hipocolesterolêmico.

Apesar de algumas chalconas testadas apresentarem percentuais de redução do colesterol muito próximos aos valores obtidos para a lovastatina, não podemos correlacionar sua ação inibitória exclusivamente sobre a enzima HMG-CoA, uma vez que outros mecanismos poderiam eventualmente como: a disponibilização periférica do colesterol, o que modifica sua distribuição nas diferentes lipoproteínas; a redução da absorção intestinal de lipídeos ou um aumento da excreção do colesterol na forma de sais biliares pelo estímulo da atividade da colesterol 7 α -hidroxilase (MURRAY, GRANNER, MAYES *et al.*, 2000).

Por outro lado, também poderia se especular a respeito da depuração das apolipoproteínas apo B e apo E, as quais eventualmente estariam elevadas na exposição crônica aos compostos chalcônicos, o que poderia ter como consequência uma redução geral, tanto nos níveis das lipoproteínas, quanto nas concentrações de seus constituintes. Este fato não seria surpreendente, tendo em vista que alguns inibidores da HMG-CoA redutase, particularmente as estatinas, têm comprovada ação depuradora das apoproteínas B e E (HUFF, BURNETT, 1997, OLIVEIRA 2001).

Além do colesterol total, as concentrações séricas de colesterol da HDL são muito importantes uma vez que diversos estudos sugerem existir uma correlação inversa entre os valores da lipoproteína HDL e o risco de aterosclerose. Isto se deve ao fato desta lipoproteína estar envolvida no chamado transporte reverso do colesterol para que este possa ser excretado no fígado. A HDL contém cerca de 50% de proteínas captando colesterol das células periféricas e, através da ação da enzima lecitina-colesterol-acil-transferase (LCAT), incorpora ácido graxo, tornando-os esterificados (TULENKO, SUMNER, 2002).

O tratamento em longo prazo com a dieta hipercalórica, tanto para as chalconas quanto para seus derivados bromados, não apresentou aumentos estatisticamente significativos nas concentrações de colesterol da HDL, o que seria um requisito muito importante, já que as altas concentrações de colesterol na lipoproteína HDL tendem a facilitar o efluxo de colesterol através da parede arterial, proporcionando o transporte de colesterol para as artérias do fígado, a fim de ser excretado pela bile, como esteróides fecais ou sais biliares (NEWTON, KRAUSE, 2002). Tendo em vista que a literatura sugere uma dose de no mínimo 50 mg/Kg de lovastatina para reduzir as concentrações séricas de colesterol total e elevar o colesterol da HDL em ratos (ENDO, 1988), nos parece possível argumentar que os resultados obtidos se mostraram inferiores aos esperados, possivelmente por estarmos utilizando uma concentração dos compostos testados, abaixo da preconizada para possíveis inibidores da HMG-CoA redutase. Somado a este fato, podemos levar em consideração que em ensaios clínicos após tratamento com a lovastatina, as concentrações séricas de colesterol da HDL alcançam elevações de no

máximo 10% (XYDAKIS, JONES, 2003). Além do fator concentração do fármaco que deve ser levado em consideração, cabe lembrar que o objetivo do tratamento consiste em reduzir as concentrações de colesterol (da LDL especialmente), com manutenção dos valores de colesterol em lipoproteínas como HDL. Portanto, o efeito pouco promissor das chalconas sobre a elevação os valores de colesterol da HDL pode ser justificado, não comprometendo a eficácia do tratamento, no entanto, modificações estruturais podem ser sugeridas na estrutura dos compostos que apresentaram maior atividade hipocolesterolêmica no sentido de fornecerem uma elevação dos níveis deste colesterol lipoprotéico.

Também podemos argumentar que as HDLs não são partículas únicas e uniformes, exibindo características estruturais e de composição diversas, de acordo com a fase de sua atividade (TULENKO, SUMNER, 2002). A HDL₃ é precursora da HDL₂, a qual exerce importante função na redução dos níveis de colesterol excedente, removendo estes para que possam ser depositados no fígado. Como o evento da lipólise está inibido na dieta hipercalórica, pelas altas concentrações de insulina induzidas pelo excesso de nutrientes provenientes da dieta, a incorporação da apolipoproteína C, fosfolipídeos e colesterol à HDL torna-se deficiente impedindo a formação da fração HDL₂ (MURRAY, GRANNES, MAYS, 2000).

Utilizando os dois parâmetros bioquímicos, colesterol total e colesterol da HDL, é possível calcular o IAA que é uma medida teórica do potencial terapêutico de agentes hipolipemiantes utilizados na terapêutica de doenças cardiovasculares (VÁSQUEZ-FREIRE, LAMELA, CALLEJA, 1996). Além disto, este índice parece ser o melhor elemento preditivo de eficiência farmacoterapêutica do que a simples análise sobre as reduções das concentrações lipídicas, colesterol total e colesterol da HDL isoladamente (CUI, BLUMENTHAL, FLAWS *et al.*, 2001; REAL, CHAVES, MARTINEZ-USO *et al.*, 2001). Nossos resultados apontam para o composto C3 como o responsável pela maior elevação do IAA, o qual tem apresentado os melhores resultados de redução dos valores séricos de colesterol total nos dois modelos utilizados, e uma elevação do índice anti-aterogênico estatisticamente significativa também em relação a lovastatina. Estes dados nos permitem

sugerir que talvez o C3 seja o principal candidato a molécula protótipo para as modificações estruturais propostas anteriormente para a elevação das concentrações séricas de colesterol da HDL.

O cálculo do IAA, não permite sinalizar como estes compostos estariam atuando no processo aterosclerótico. No entanto, alguns estudos sugerem que para os fármacos inibidores da HMG-CoA redutase, duas atividades parecem estar intimamente relacionadas a redução do processo aterogênico: a atividade anti-inflamatória e a antioxidante dos compostos (SPARROW, BURTON, HERNANDEZ *et al.*, 2001). A primeira atuando através da inibição de quimocinas macrocíticas (IL-8, MIP-1alfa e MIP-1beta) e de seus receptores (CCR-1, CCR-2, CCR-4 e CCR-5) importantes mediadores da aterogênese (WAEHRE, DAMAS, GULLESTAD *et al.*, 2003). A segunda reduzindo o conteúdo lipídico da artéria aorta, através da inibição da expressão de células como CD40/CD40L, cujo crescimento é induzido pela presença da LDL-oxidada, retardando desta forma o processo de formação da placa fibrótica que limita o processo de aterotrombose (SCHOENBECK, GERDES, VARO *et al.*, 2002). Neste particular é importante notar que algumas chalconas apresentam comprovada atividade antioxidante e em muitas delas esta atividade esta associadas a redução da concentração de oxido nítrico produzido nos processos inflamatórios (ROJAS, PAYÁ, DOMINGUEZ *et al.*, 2002).

Em relação aos estudos sobre as atividades antioxidantes das chalconas e seus derivados, observa-se uma ação secundária, também chamada de preventiva, a qual atua retardando a taxa de iniciação da formação de espécies reativas, através de outros mecanismos que não os seguidos pelos antioxidantes primários, os quais tendem a reagir com as espécies reativas antes da interação com uma biomolécula, convertendo-as em produtos estáveis (VENDEMIALE, GRATAGLIANO, ALTOMARE, 1999).

Algumas chalconas também apresentam grande habilidade em reduzir as altas concentrações de óxido nítrico produzidas nos processos inflamatórios, atuando, desta forma, como seqüestradores de espécies reativas, ou inibindo a enzima óxido nítrico sintase (NOS), reduzindo a produção de óxido nítrico. Isto porque, apesar de altas

concentrações de óxido nítrico serem necessárias em estados patológicos, a concomitante produção de ânions superóxido gera espécies altamente reativas como peroxinitrito e ânion hidroxil extremamente tóxicos ao organismo (LIMASSET, LE DOUCEN, DONE *et al.*, 1993; HERENCIA, LOPÉZ-GARCIA, UBEDA *et al.*, 2002).

Outra alteração fisiológica provocada pela dieta hipercalórica está relacionada aos aumentos da concentração de colesterol da LDL tanto no plasma quanto na íntima arterial, assim como altera a capacidade de remoção das lipoproteínas HDL (WIERZBICKI, MIKHAILIDIS, 2002). Na íntima arterial as lipoproteínas LDL são aprisionadas numa trama de fibras e fibrilas secretadas pelas células parietais. Estas células secretam produtos oxidativos, como ânion superóxido no processo de formação de endoperóxidos cíclicos e prostaglandinas característico das células endoteliais e musculares lisas ou ainda hidroperóxidos cíclicos secretados por macrófagos. Enfim, a presença destes produtos oxidados difundidos no espaço subentotelial juntamente com as LDL aprisionadas iniciam a oxidação lipídica (BATLOUNI, 1997). Por este motivo acredita-se que para qualquer valor de concentração plasmática de LDL, sua retenção na parede arterial é mais importante que a taxa de transporte por esta parede, sendo desta forma, considerada como a lipoproteína mais aterogênica (CHAPMAN, 2003).

O acúmulo maciço de colesterol na íntima arterial é uma consequência da formação da LDL oxidada, a qual deixa de ser reconhecida por receptores clássicos de LDL, porém, permanece sendo reconhecida pelos receptores de LDL acetilados (removedores) e/ou receptores oxidados, que não são regulados pelo conteúdo celular de colesterol, o que desencadeia a formação de células espumosas, que são a marca característica do processo inicial da aterosclerose (BATLOUNI, 1997). Neste contexto, torna-se claro que a modificação lipídica ocorre primariamente na íntima arterial, já que no plasma, a oxidação da LDL é provavelmente mínima, devido à presença de muitos antioxidantes e à capacidade removedora das células sinusoidais hepáticas, que contém receptores em abundância (TULENKO, SUMNER, 2002).

A hipótese de que a peroxidação lipídica desempenha importante papel na patogênese da aterosclerose desperta crescente entusiasmo sobre o uso de antioxidantes como agentes antiaterogênicos e, são as propriedades antioxidantes das chalconas responsáveis pela redução da taxa de auto-oxidação lipídica, que permitem que estes compostos sejam considerados como agentes terapêuticos potenciais em doenças do sistema cardiovascular, isto porque aliado a esta propriedade estão associados as atividades de estabilização da parede vascular, vasodilatação e efeitos anti-agregantes extremamente importantes, uma vez que a modificação oxidativa da LDL além de induzir a captação por macrófagos, produz muitas moléculas modificadas, com diversos efeitos biológicos, inclusive na injúria e na ativação de células endoteliais (NAPOLI, 1997; OPLETALOVA, JAHODAR, JUN *et al.*, 2003).

Teoricamente, as chalconas poderiam exercer efeitos favoráveis nas lesões ateroscleróticas iniciais e avançadas, *in vitro*, uma vez que a auto-oxidação da LDL somente se inicia após o estresse oxidativo haver depletado todo o conteúdo de antioxidante celular e *in vivo*, já que a auto-oxidação da LDL depende do balanço entre a intensidade da agressão oxidativa e a capacidade das defesas antioxidantes naturais, complementadas através de dietas antioxidantes e fármacos potencialmente ativos (BATLOUNI, 1997; HARRIS, DEVARAI, JIALAL, 2002).

O conteúdo de colesterol presente na lipoproteína LDL, também avaliado neste trabalho, torna-se importante, uma vez que a captação deste conteúdo, pelo fígado em particular, exerce três efeitos sobre o metabolismo lipídico: atuando na inibição da síntese endógena de colesterol, na ativação da enzima acil-colesterol-acil tranferase (ACAT) para a esterificação e armazenamento do colesterol e na modulação do número de receptores para a apo B100 na membrana dos hepatócitos (PEASE, LEIPER, 1996). Torna-se, então, de extremo interesse que fármacos com potencial hipolipemiante apresentem índices estatisticamente significativos de redução sobre as concentrações séricas de colesteol da LDL, uma vez que a elevação destes valores aumenta a velocidade de aderência destas partículas na parede arterial, onde podem sofrer o processo de oxidação transformando-se em LDL oxidada (ox-LDL), as quais são capazes de provocar citotoxicidade no endotélio

vascular e desencadear eventos que resultam na formação de uma placa aterosclerótica (AVIRAM, 2000; KÁDAR, GLASZ, 2001).

Reduções nas concentrações séricas de colesterol da LDL foram alcançadas por 6 chalconas, as quais novamente foram divididas de acordo com faixas de redução, em comparação ao resultado obtido após o tratamento com a lovastatina (98%), de acordo com a Tabela 16.

Tabela 16. Classificação dos compostos chalcônicos de acordo com o percentual de redução das concentrações séricas de colesterol da LDL em relação ao grupo controle tratado com dieta hipercalórica.

Classificação	Compostos	% de redução
Forte efeito redutor	C3 e C1	97 – 89
Moderado efeito redutor	C5, C19 e B1	52 – 40
Fraco efeito redutor	C10 e C20	20 – 5

As alterações estruturais que mais favoreceram a atividade hipocolesterolêmica sobre a lipoproteína LDL foram aquelas já detectadas para as reduções observadas (colesterol total), como a presença dos átomos de bromo e cloro na substituição dos anéis A e B, com destaque para o composto C3; a substituição cloro no anel A, com destaque para o composto C1; e a substituição da dupla olefínica no derivado bromado B1, a qual novamente não alterou a atividade aferida. Curiosamente, o composto C20, com a presença da dupla conjugada entre os anéis, e o composto C19, substituído com o grupo metóxi na posição 3 do anel B, também apresentaram atividades redutoras sobre os valores de colesterol da LDL.

Finalmente, o tratamento dos animais com a dieta hipercalórica, aumentou significativamente as concentrações teciduais de colesterol hepático, provavelmente devido a uma maior absorção de nutrientes que propicia a ativação da biossíntese de

lipídeos via forte elevação das concentrações hepáticas de acetil-CoA e conseqüente elevação de malonil-CoA, que favorece a lipogênese.

As concentrações teciduais de colesterol hepático foram avaliadas após o tratamento com os compostos C1, C3 e C10, com substituinte cloro em diferentes posições nos anéis A e B. Estes compostos foram escolhidos devido a seus potenciais efeitos redutores as concentrações séricas de colesterol total no modelo da dieta hipercalórica e, apresentaram fortes efeitos inibidores, comparados aos valores obtidos no tratamento com a lovastatina. Comprovando parcialmente as suspeitas de que algumas chalconas testadas efetivamente teriam um efeito inibidor da síntese de colesterol, os compostos C1, C3 e C10 que apresentaram forte atividade hipocolesterolêmica, foram capazes também de reduzir as concentrações hepáticas deste esterol, apontando mais uma vez para um efeito inibidor sobre enzimas da biossíntese do colesterol.

Entretanto, a redução das concentrações hepáticas de colesterol poderia não só estar relacionada a inibição de enzimas hepáticas responsáveis pela síntese mas também com a esterificação do colesterol via acil colesterol aciltransferase (ACAT), ou através da ativação da enzima colesterol-7 α -hidroxilase, responsável pelo início da síntese de ácidos biliares a partir do colesterol (MURRAY, GRANNER, MAYES *et al.*, 2000). Portanto, estudos posteriores necessitam ser realizados para que se possa confirmar o mecanismo de ação das chalconas avaliadas.

É importante ressaltar que alguns trabalhos têm apontado o catabolismo do colesterol, e particularmente a estimulação da enzima colesterol 7 α -hidroxilase, como um potente alvo molecular na pesquisa de novos fármacos redutores de colesterol. Uma vez que algumas das chalconas testadas apresentaram forte atividade redutora da concentração de colesterol em ambos modelos experimentais utilizados e como é conhecido, os níveis circulantes deste esteróide são a resultante de várias regulações em nível de absorção, síntese e catabolismo não poderíamos descartar a possibilidade destes compostos atuarem sobre o catabolismo do colesterol.

5.2. Atividade hipotrigliceridêmica

Evidências experimentais sugerem que o Triton WR 1339 altere fisicamente a estrutura das VLDLs (SCHURR, SCHULTZ, PARKINSON, 1972), além de inibir a lipase lipoprotéica (BORENSZTAJN, RONE, KOTLAR, 1976; ARAGANE, KUSUNOKE, KITAMINET, 1998). Estes eventos, resultam na remoção das VLDLs circulantes e, como estímulo secundário, a biossíntese do colesterol é promovida, assim como o catabolismo de triglicérides é inibido, condições que instalam um processo hiperlipêmico (OLIVEIRA, 2001).

Dentre os compostos testados com respeito ao efeito redutor da concentração de triglicérides apenas 9 compostos das 20 chalconas avaliadas, foram capazes de reduzir estatisticamente as concentrações séricas de triglicérides obtidos após administração intraperitoneal de Triton WR 1339. Este efeito não foi observado para a lovastatina, a qual segundo estudos farmacoterapêuticos em humanos somente começa a exercer seus efeitos significativos sobre triglicérides após duas semanas de uso contínuo (XYDAKIS, JONES, 2003). Os compostos avaliados foram classificados em dois grupos, de acordo, com o perfil de redução, conforme Tabela 17.

Tabela 17. Classificação das chalconas avaliadas de acordo com o percentual de redução das concentrações de triglicérides em relação ao grupo controle tratado com modelo Triton WR 1339.

Classificação	Compostos	% de redução
Forte efeito redutor	C3, C5, C6, C10, C15, B1 e B3	90 – 82
Fraco efeito redutor	B2 e C7	12 – 2

Curiosamente, os compostos pertencentes ao grupo que apresentou forte efeito redutor sobre as concentrações séricas de colesterol total neste mesmo modelo, foram

novamente, os compostos capazes de reduzir com significância estatística os valores séricos de triglicérides. Embora ainda seja controverso, uma relação estatisticamente significativa entre a hipertrigliceridemia isolada e doenças cardiovasculares, têm sido extensamente relatada (DURRINGTON, 1998), além de haverem evidências suficientes que demonstram que a associação hipertrigliceridemia/hipercolesterolemia tende a amplificação do risco de cardiopatia isquêmica (SLATER, PARAFIORITI, TORTORA *et al*, 2002; FRUCHART, DURIEZ, 2002).

Portanto, os resultados obtidos com respeito ao efeito hipotrigliceridêmico das chalconas testadas são muito importantes principalmente se levarmos em consideração que as estatinas, principal grupo farmacológico utilizado atualmente no tratamento das dislipidemias, e utilizado como fármaco referência em nossos modelos experimentais, teve baixa atividade hipolitrigliceridêmica.

As principais características estruturais associadas a atividade hipotrigliceridêmica foram aquelas observadas nos compostos C3, C5, C10 e B1 onde a substituição halogenada (cloro e bromo) em ambos os anéis aromáticos, para o composto C6 a presença do bromo como substituinte somente no anel B e para os compostos C15 e B3 a substituição nitro na posição 4 do anel B foram importantes. A substituição da dupla ligação nos compostos bromados, não apresentou significativas diferenças na atividade aferida.

Do mesmo modo, observou-se alteração estrutural que apresentam pouca influência na atividade hipotrigliceridêmica, reduzindo ou inibindo-a como: (a) ausência de substituintes nos anéis A e B; (b) presença da dupla conjugada aumentando a distância entre os anéis aromáticos; (c) presença de substituintes com propriedades eletrodoadoras como os grupos $-\text{CH}_3$, $-\text{OCH}_3$, $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ (metila, metóxi e dietilamino, respectivamente).

No intuito de entender o possível papel dos compostos avaliados na redução das concentrações séricas de triglicérides, torna-se necessário levar em consideração que elevados valores de triglicérides podem afetar quantitativamente e qualitativamente as

lipoproteínas circulantes, modificando a distribuição do colesterol, tamanho e densidade destas partículas, fatores estes extremamente relacionados a sua capacidade aterogênica (TALMUD, HAWE, MILLER *et al.*, 2002).

Um efeito adicional do agente surfactante Triton WR 1339, está relacionado à ativação de ações refratárias às atividades exercidas pelas enzimas lipolíticas, como a lipoproteína lipase, ou seja, a conversão dos triglicérides circulantes em ácido graxos livres não é promovida, ocorrendo um acúmulo de triglicérides no plasma, agravando o quadro hiperlipêmico. Este constitui um alvo terapêutico alternativo, sobre o qual alguns agentes terapêuticos podem atuar, estimulando a atividade da enzima lipoproteína lipase no plasma, promovendo a metabolização dos triglicérides.

Portanto, é possível especular a ação das chalconas avaliadas sobre a ativação da enzima lipoproteína lipase, já que sua atividade lipolítica marca o evento inicial da mobilização de triglicérides circulantes presentes na lipoproteína VLDL, liberando ácidos graxos como energia e diminuindo por consequência o colesterol da HDL no plasma (HEEREN, BODMAN, NIEMEIER *et al.*, 2002) e alguns dos compostos testados causaram forte redução nas concentrações séricas de triglicérides circulantes e redução nos valores de colesterol da HDL.

No modelo da indução de hiperlipemia através da dieta hipercalórica, como já foi descrito na discussão referente as concentrações de colesterol, temos um aumento da oferta de substratos e hormônios, como a insulina, que induzem a ativação das vias biossintéticas, processo que a longo prazo gera um modelo crônico de hiperlipemia. O aumento dos níveis de insulina causa a inibição da mobilização de ácidos graxos do tecido adiposo, aumentando a lipogênese e a síntese de acil-glicerol, através da inibição do hormônio estimulante da ativação da lipase (MURRAY, GRANNES, MAYS, 2000).

As altas concentrações de triglicérides circulantes podem, além de inibirem a lipólise tecidual, contribuir para a formação de partículas densas e pequenas das lipoproteínas LDL, devido ao aumento da transferência de colesterol esterificado da VLDL

para esta lipoproteína, o que a torna mais susceptível aos processos oxidativos que antecipam a doença aterosclerótica, já que dificulta o processo de reconhecimento celular. Do mesmo modo, o aumento da transferência de colesterol esterificado para as lipoproteínas HDL pode contribuir para a redução das concentrações séricas de colesterol da HDL freqüentemente associada a hipertrigliceridemia (DURRINGTON, 1998).

A respeito da inibição da hipertrigliceridemia induzida pela dieta hipercalórica, as chalconas e seus derivados bromados apresentaram significativas percentagens de redução para todos os compostos testados em relação aos grupos controle. Levando-se em consideração, os valores de redução alcançados com estes compostos e o resultado obtido para a lovastatina (71%), propôs-se uma divisão por faixas de redução, onde os compostos foram classificados de acordo com a Tabela 18.

Tabela 18. Classificação das chalconas avaliadas de acordo com o percentual de redução das concentrações séricas de triglicérides em relação ao grupo controle com da dieta hipercalórica.

Classificação	Compostos	% de redução
Forte efeito redutor	C12, C7, C16, C10, C3, C13, B3, B4, eC15	87 – 61
Moderado efeito redutor	B2, C17, C19, B1e C1	57 – 47
Fraco efeito redutor	C9, C6, C11, C5 e C20	45 – 38

Novamente as diferentes substituições nos anéis aromáticos A e B, influenciaram na atividade redutora dos valores séricos de triglicérides. Podemos citar algumas modificações importantes como a substituição halogênica nos anéis A e B, as quais continuaram se apresentando como constituintes importantes na estrutura dos compostos com forte efeito redutor; da mesma forma, que o grupo nitro como substituinte no anel B; os derivados bromados também mantiveram seu potencial frente as chalconas não-bromadas.

Para esta atividade, no entanto, alguns compostos surpreenderam por apresentarem perfis diferentes daqueles observados no modelo Triton WR 1339, algumas alterações estruturais também se apresentaram diferentes em comparação as principais chalconas capazes de reduzir as concentrações de colesterol avaliadas anteriormente. O compostos C7, curiosamente, reduziu as concentrações séricas de triglicérides de forma mais efetiva que os compostos com substituintes aromáticos eletrosacadores; os compostos C13 e C16 com substituintes metil ou metoxi no anel aromático B apresentaram fortes efeitos redutores; e finalmente a chalcona C12 apresentou a melhor redução, apesar, da dupla conjugada estar aumentando a distância entre os anéis, característica esta que vinha demonstrando redução dos efeitos hipocolesterolemiantes. No caso deste último composto, a presença da hidroxila na posição 2' do anel A parece ser importante para a atividade, já que os compostos C11 e C20 demonstraram fracos efeitos redutores.

Estudos angiográficos têm demonstrado que níveis elevados de lipoproteínas ricas em triglicérides são fortes preditores independentes de progressão de aterosclerose e da ocorrência de eventos isquêmicos. Tomados em conjunto, esses estudos mostram que as lipoproteínas ricas em triglicérides, particularmente as partículas pequenas de VLDL e IDL, estão mais intimamente relacionadas à progressão de doenças cardiovasculares do que a LDL, tradicionalmente considerada a lipoproteína mais aterogênica (FRUCHART, DURIEZ, 2002). Portanto, o potencial redutor sobre as concentrações séricas de triglicérides e de colesterol das VLDLs apresentado pelas chalconas testadas desperta especial interesse, uma vez que as partículas de lipoproteínas ricas em triglicérides, em especial a VLDL, não somente atravessam a parede íntima das artérias, como também podem ser retidas na parede arterial por um longo período causando efeitos similares a LDL oxidada (DURRINGTON, 1998).

Um aumento na síntese de ácidos graxos e conseqüentemente de triacilglicerol proporciona uma elevação da secreção da lipoproteína VLDL, sendo que os ácido graxos utilizados na síntese dos triacilgliceróis podem ser derivados de dois processos, através do aumento da disponibilização de acetil-CoA ou de grandes concentrações de ácidos graxos livres na circulação. No entanto, a primeira situação é predominante quando temos

um maior estímulo da síntese de ácidos graxos e pequenos níveis circulantes, processo este que ocorre na dieta hipercalórica, provocado pelo aumento dos níveis hormonais de insulina que estimulam a síntese e esterificação dos ácidos graxos, inibindo a sua oxidação e a atividade de enzimas lipolíticas (DURRINGTON, 1998). Além deste fato, altas concentrações de triglicérides nas VLDLs contribuem como já foi mencionado, na formação de lipoproteínas LDL pequenas e densas, e uma similar diminuição das concentrações de colesterol na lipoproteína HDL, ambos relacionados ao aumento da transferência de colesterol esterificado para estas lipoproteínas (SLATER, PARAFIORITI, TORTORA *et al*, 2002).

Dentre os compostos avaliados, três faixas de redução das concentrações de colesterol das VLDLs foram observadas, quando os resultados foram comparados a percentagem de redução obtido para a lovastatina (71%), estas faixas estão dispostas na Tabela 19.

Tabela 19. Classificação das chalconas avaliadas de acordo com o percentual de redução da concentração sérica de colesterol das VLDLs em relação ao grupo controle com dieta hipercalórica.

Classificação	Compostos	% de redução
Forte efeito redutor	C7, C12, C3, C10, C16 e C13	87 – 68
Moderado efeito redutor	C11, B4, B3, C15, C6, C1, B2, C17 e B1	62 – 52
Fraco efeito redutor	C19, C9, C5 e C20	51 – 38

As alterações estruturais mais importantes novamente nos chamaram atenção: (a) a chalcona C7, sem substituintes nos anéis A e B apresentou forte efeito redutor; (b) a chalcona C12 apresentou o melhor efeito redutor, apesar de não ter sido capaz de reduzir as concentrações séricas de triglicérides no modelo Triton WR 1339; (c) os compostos C13 e C16 com substituintes metil e metoxi no anel B também apresentaram fortes efeitos

redutores; (d) os compostos C3 e C10 também permaneceram no grupo dos compostos que apresentaram fortes efeitos redutores.

Uma desejável característica de eventual fármaco hipolipemiante seria atuação no metabolismo hepático alterando o influxo de ácidos graxos provenientes da via de esterificação para a via oxidativa, diminuindo desta forma a secreção de triacilglicerol e colesterol através da VLDL pelo fígado, mecanismo este observado parcialmente com fármacos como o clofibrato e o gemfibrosil que são também hipolipemiantes (MURRAY, GRANNER, MAYES *et al.*, 2000). E perfil semelhante foi observado com algumas chalconas testadas.

O tratamento dos animais com a dieta hipercalórica aumentou significativamente as concentrações hepáticas de triglicérides, isto se deve em grande parte ao maior aporte de ácidos graxos para o fígado.

As concentrações hepáticas de triglicérides foram avaliadas após o tratamento com os compostos C1, C3 e C10, com substituinte cloro em diferentes posições nos anéis A e B. Dois destes compostos apresentaram redução das concentrações de triglicérides com percentuais de 41% (C10) e 46% (C3) e perfil semelhante a lovastatina que reduziu 47% as concentrações hepáticas deste lipídeo. Um fraco efeito redutor foi observado para o composto C10 com 17% de redução. A presença do átomo de cloro nas posições 4 e 4' dos anéis aromáticos parece novamente favorecer a atividade hipolipemiante hepática.

A partir dos nossos resultados sobre a inibição sérica e tecidual das concentrações de triglicérides e colesterol total apresentados por algumas chalconas testadas, em especial o composto C3, podemos sugerir que os compostos testados podem estar exercendo ações sobre três diferentes mecanismos: (i) estimulando a atividade da lipoproteína lipase, responsável pela metabolização dos triglicérides provenientes das VLDLs e dos quilomícras; (ii) inibindo os processos de síntese lipídica através da inibição de enzimas-chave como a enzima HMG-CoA redutase e; (iii) interferindo nos processos de

absorção de nutrientes no intestino delgado, reduzindo a absorção intestinal de lipídeos, o que seria um mecanismo adicional de redução das concentrações séricas de lipídeos.

Em resumo, as características estruturais mais relevantes para os compostos avaliados, além da presença de dois núcleos aromáticos, e o grupamento cetônico ligado diretamente ao anel A presentes em todos os compostos, foram: (a) presença de substituintes halogenados em ambos os anéis; (b) presença de substituintes nitro na posição 4 do anel B. Na atividade hipocolesterolêmica a presença de uma dupla conjugada entre os anéis aromáticos tende a interferir nas propriedades redutoras, assim como a presença de substituintes metil, metoxi, dimetilamino e hidroxila diminuem os efeitos redutores. Na atividade hipotrigliceridêmica a presença de substituintes metoxi e metil na posição 4 do anel B parece aumentar a ação redutora, assim como a substituição hidroxil no anel A, já a presença da dupla conjugada ou a substituição da dupla por átomos de bromo não interfere na atividade aferida.

E finalmente, a partir dos nossos resultados sobre a inibição sérica e tecidual das concentrações de triglicérides e colesterol total apresentados por algumas chalconas testadas, em especial os compostos C3 e C10 que demonstraram interessantes resultados em ambos os modelos, podemos concluir que os compostos testados podem estar exercendo ações sobre três diferentes mecanismos: (i) estimulando a atividade da lipoproteína lipase; (ii) inibindo os processos de síntese lipídica e; (iii) interferindo nos processos de absorção de nutrientes no intestino delgado.

6. CONCLUSÕES

- Os espectros de RMN ^1H analisados neste trabalho permitiram confirmar a estrutura chalcônica proposta pela síntese e identificar os deslocamentos referentes aos principais prótons do esqueleto chalcônico e seus derivados, bem como caracterizá-los de acordo com sua isomeria, como compostos de conformação *E*, com constantes de acoplamento variando entre 14-16 Hz. Caso as chalconas fossem *Z*, as constantes de acoplamento encontradas apresentariam valores em torno de 12 Hz.
- Com relação à correlação estrutura-atividade das chalconas avaliadas sobre a hipolipemia, além da presença de dois núcleos aromáticos e o grupo cetônico ligado diretamente ao anel A, importantes características estruturais foram observadas como: a presença de substituintes halogenados em ambos os anéis e a presença do grupo nitro na posição 4 do anel B. Na atividade hipotrigliceridêmica observou-se características adicionais como a presença da dupla conjugada entre os anéis aromáticos, em especial com a substituição hidroxil na posição 2' do anel A e a presença de substituintes metoxi e metil na posição 4 do anel B que tendem a aumentar a atividade redutora.
- De acordo com os resultados apresentados em ambos os modelos de hiperlipemia, podemos concluir que os compostos testados podem estar exercendo ações sobre três diferentes mecanismos: (i) estimulando a atividade da lipoproteína lipase; (ii) inibindo os processos de síntese lipídica através da inibição de enzimas chave como a HMG-CoA redutase e; (iii) reduzindo a absorção intestinal de lipídeos, o que seria um mecanismo adicional de redução dos níveis séricos de lipídeos.
- Dentre os compostos que mais se destacaram, podemos citar as chalconas C3 e C10 como possíveis moléculas protótipo para posteriores modificações estruturais na procura de compostos com maior ação sobre a hiperlipemia, uma vez que estas

chalconas apresentaram significativas reduções nos níveis lipídicos (colesterol e triglicérides) em ambos os modelos aplicados.

7. PERSPECTIVAS

Os questionamentos surgidos no decorrer do desenvolvimento deste trabalho e que não puderam ser respondidos após a sua conclusão, são apresentados como perspectivas futuras:

- Repetição das análises dos espectros de ^1H RMN, obtendo ampliações da região referente aos prótons aromáticos para que se possa identificar a multiplicidade dos prótons aromáticos e os sinais referentes aos prótons H_α e H_β .
- Obter os valores das constantes de acoplamento (J), através de ampliações da região referente aos prótons aromáticos nos espectros de RMN- ^1H , a fim de confirmar a isomeria *E* ou *Z* das chalconas avaliadas.
- Avaliar o efeito das chalconas e seus derivados sobre as apolipoproteínas.
- Avaliar o efeito das chalconas e seus derivados sobre as enzimas HMG-CoA redutase, colesterol 7α -hidrolase e lipoproteína lipase, no modelo *in vitro*.
- Avaliar o potencial antioxidante das chalconas testadas, uma vez que esta atividade biológica tem íntima correlação com o processo aterosclerótico.
- Aplicar métodos quantitativos, para a análise da relação estrutura-atividade, visando a síntese reacional de novas moléculas ativas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, A. W.; CHEN, J. KURON, G. *et al.* Mevinolin, a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase and cholesterol-lowering agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 77, n. 1, p. 3957-3961, 1980.

ALCARÁZ, L. E.; BLANCO, S. E.; PUIG, O. N. *et al.* Antibacterial activity of flavonoids against methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *J. Theor. Biol.*, v. 205, n. 2, p. 231-240, 2000.

ALLAIN, C. C.; POOM, L. S.; CHAN, C. G. S. *et al.* Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin. Chem.*, v. 20, p. 470-475, 1974.

AMERICAN ASSOCIATION OF CLINICAL ENDOCRINOLOGIST. Ninth annual meeting and clinical congress 2002. <http://www.linex.com.br>, acessado em 17/06/2003.

ANILA, L.; VIJAYALAKSHMI, N. R. Flavonoids from *Emblica officinalis* and *Mangifera indica* – effectiveness for dyslipidemia. *J. Ethnopharmacol.*, v. 79, p. 81-87, 2002.

ARAGANE, K.; KUSUNOKI, J.; KITAMINET. Effect of F-1394, an acyl-CoA cholesterol acyltransferase (ACAT) inhibitor on ACAT activity in Hep G2 cells and on hepatic secretion of lipids in Triton WR 1339 – induced hyperlipidaemic rats: possible role of hepatic ACAT in very low density lipoprotein secretion. *J. Jpn. Pharmacol.*, v. 76, n. 3, p. 309-312, 1998.

ARQUIVOS BRASILEIROS DE CARDIOLOGIA: III Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemias. São Paulo: vol. 77, suplemento III, novembro 2001. ISSN-0066-782X.

AST, M.; FRISHMAN, W. H. Bile acid sequestrants. *J. Clin. Pharmacol.*, v. 30, n. 2, p. 99-106, 1990.

AVEZUM, A.; DUNCAN, B. Lípidos e aterosclerose: aspectos epidemiológicos, clínicos e preventivos. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia: III Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemias*, v. 77, p. 10-11, 2001.

AVIRAM, M. Review of human studies on oxidative damage and antioxidant protection related to cardiovascular diseases. *Free Radic. Res.*, v. 33, p. S85-S97, 2000.

BARBARE, J. C.; IMBERT, A.; BENKIRANE, A. Hepatotoxicity of medications. *Presse Med.*, v. 30, n. 14, p. 673-676, 2001.

BARTH, J. D.; MANCINI, G. B. J. An update on lipid-lowering therapy. *Curr. Opin. Lipidol.*, v. 6, p. 32-37, 1995.

BATLOUNI, M. Hipótese oxidativa da aterosclerose e emprego dos antioxidantes na doença arterial coronária. *Arq. Bras. Cardiol.*, v. 68, n. 1, p. 55-63, 1997.

BEAUCHAMP, M. C.; LETENDRE, E.; RENIER, G. Macrophage lipoprotein lipase expression is increased in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia. *J. Lipid. Res.*, v. 43, n. 2, p. 215-222, 2002.

BERTOLAMI, M. C. Tratamento medicamentoso das dislipidemias. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia: III Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemias*, v. 77, p. 35-40, 2001.

BIEBER, L. M. Química orgânica experimental: integração da teoria, experimento e análise. *Quim. Nova*, v. 22, n. 4, p. 605-610, 1999.

BOIS, F.; BENEY, C.; BOUMENDJEL, A. *et al.* Halogenated chalcones with high-affinity binding to P-glycoprotein: potential modulators of multidrug resistance. *J. Med. Chem.*, v. 41, n. 21, p. 4161-4164, 1998.

BORENSZTAJN, J., RONE, M. S.; KOTLAR, T. The inhibition *in vivo* of lipoprotein lipase (clearing-factor lipase) activity by Triton WR 1339. *Biochem. J.*, v. 156, p. 539-543, 1976.

BROWA, A. I. D. A. A concise review of the cost-effectiveness of coronary heart disease prevention. *Med. Clin. North. Am.*, v. 84, n. 1, p. 279, 2000.

BROWN, M. S.; YE, J.; RAWSON, J. L. *et al.* Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell*, v. 100, p. 391-398, 2000.

CALLISTE, C. A.; LE BAIL, J. C.; TROUILLAS, P. *et al.* Chalcones: structural requirements for antioxidant, estrogenic and antiproliferative activities. *Anticancer Res.*, v. 21, n. 6, p. 3949-3956, 2001.

CAREY, F. A.; JOHNSON, S. R. *Advanced Organic Chemistry – part A*, 3ed. Plenum Press: New York, 1992, p. 99-100.

CASSCELLS, W.; NAGHAVI, M.; WILLERSON, J. T. Vulnerable atherosclerosis plaque: multifocal disease. *Circulation.*, v. 107, n. 16, p. 2072-2075, 2003.

CASTELLS, J.; CAMPS, F. Elucidación estructural de compuestos orgánicos por métodos espectroscópicos: TOMO I – problemas. Alhambra: Madrid, 1970, 153 p.

_____. Elucidación estructural de compuestos orgánicos por métodos espectroscópicos: TOMO II – resolución de problemas. Alhambra: Madrid, 1970, 153 p.

CATERINA, R. Endothelial dysfuntions: common denominators in vascular disease. *Curr. Opin. Lipidol.*, v. 11, n. 1, p. 9-23, 2000.

CESARIN, D. S.; FERREIRA, J. N.; BRAZ, R. F. Efeito da substituição por átomos de flúor no equilíbrio conformacional de chalcona. *Quim. Nova*, v. 24, n. 5, p. 604-611, 2001.

CHAJEK-SHAUL, T.; FRIEDMAN, G.; HALPERIN, G. *et al.* Role of lipoprotein lipase in the uptake of cholesteryl ester by rat lactating mammary gland *in vivo*. *Biochim. Biophys. Acta.*, v. 666, n. 2, p. 216-222, 1981.

CHAPMAN, M. J. Fibrates in 2003: therapeutic action in atherogenic dyslipidaemia and future perspectives. *Atheroscl.*, v. 30, p. 1-13, 1998.

CHEN, C.; MAGRO, J. Niacin therapy. RIVERSIDE CARDIOLOGY ASSOCIATES 1999. <http://www.riversidecardiology.com/archive/07151999.htm>

CHEN, M.; ZHAI, L.; CHRISTENSEN, S. B. Inhibition of fumarate reductase in *Leishmania major* and *L. donovani* by chalcones. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 45, n. 7, p. 2023-2029, 2001.

CHIBA, T.; MIURA, S.; SAWAMURA, F. *et al.* Antiatherogenic effects of a novel lipoprotein lipase-enhancing agent in cholesterol-fed New Zealand white rabbits. *Atheroscl. Thromb. Vasc. Biol.*, v. 17, n. 11, p. 2601-2608, 1997.

CHRISTIANS, U.; JACOBSON, W.; FLOREN, L. C. Metabolism and drug interactions of HMG-CoA reductase inhibitors in transplant patients. *Pharmacol. Ther.*, v. 80, p. 1-34, 1998.

CHUGH, A.; RAY, A.; GUPTA, J. B. Squalene epoxidase as hypocholesterolemic drug target revisited. *Prog. Lipid Res.*, v. 42, n. 1, p. 37-50, 2003.

CHUN, S.; MIN, M. K.; PARK, H. *et al.* The risk groups for coronary heart disease in Koreans: assessment by distribution of serum lipid concentrations. *Clin. Chem. Lab. Med.*, v. 37, n. 10, p. 969-974, 1999.

CRENS, P.; RODRIGUEZ, J.; JASPARS, M. *Organic structure analysis*. 1ed. Oxford: New York, 1998, 552p.

CORREA, R.; CECHINEL-FILHO, V.; SANTOS, A. R. S. Antinociceptive properties of chalcones. Structure-activity relationships. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.*, v. 334, p. 332-334, 2001.

CORREA, R.; PEREIRA, M. A. S.; BUFFON, D. *et al.* Antinociceptive properties of chalcones: structure-activity relationships. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.*, v. 334, p. 332-334, 2001.

CORTI, R.; BADIMON, J. J. Biologic aspects of vulnerable plaque. *Curr. Opin. Cardiol.*, v. 17, n. 6, p. 616-625, 2002.

CUI, Y.; BLUMENTHAL, R. S.; FLAWS, J. A. *et al.* Non-high-density lipoprotein cholesterol level as predictor of cardiovascular mortality. *Arch. Intern. Med.*, v. 161, p. 1413-1419, 2001.

DE LAS HERAS, B.; RODRÍGUEZ, B., BOSCA, L. *et al.* Terpenoids: sources, structure elucidation and therapeutic potencial in inflammation. *Curr. Top. Med. Chem.*, v. 3, n. 2, p. 171-185, 2003.

DEEB, S.S.; PENG, R. L. Structure of the human lipoprotein lipase gene. *Biochemistry*, v. 28, n. 10, p. 4131-4135, 1989.

DENNIS, E. V.; BOSCH, H. V. Cholesterol in the year 2000. *Biochim. Et Biophys. Acta (BBA) – Mol. Cell. Biol. Lipid.*, v. 1529, p. 1-8, 2000.

DIAMENT, J.; FORTI, N.; GIANNINI, S. D. Fibratos: semelhanças e diferenças. *Rev. Soc. Cardiol. Estado de São Paulo*, v. 1, p. 83-91, 1999.

DIAS, R. L. A., CORRÊA, A. G. Aplicações da química combinatória no desenvolvimento de fármacos. *Quim. Nova*, v. 24, n. 2, p. 236-242, 2001.

DIMMOCK, J. R.; ELIAS, D. W.; BEAZELY, M. A. *et al.* Bioactivities of chalcones. *Curr. Med. Chem.*, v. 6, p. 1125-1149, 1999.

DOI, O.; ENDO, A. Specific inhibition of demosterol synthesis by ML-236B in mouse LM cells grown in suspension in a lipid-free medium. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.*, v. 31, p. 225-233, 1978.

DROUET, L. Atherothrombosis as a systemic disease. *Cerebrovasc. Dis.*, v. 13, n. 1, p. 1-6, 2002.

DUGI, K. A.; BRANDAUER, K.; SCHMIDT, N. *et al.* Low hepatic activity is a novel risk factor for coronary artery disease. *Atheroscl. Suplem.*, v. 3, n. 2, p. 102, 2003.

DURRINGTON, P. N. Triglycerides are more important in atherosclerosis than epidemiology has suggested. *Atheroscl.*, v. 1, p. S57-S62, 1998.

EDENHARDER, R.; RAUSCHER, R.; PLATT, K. L. The inhibition by flavonoids of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline metabolic activation to a mutagen: a structure-activity relationship study. *Mutat. Res.*, v. 379, n. 1, p. 21-32, 1997.

EDWARDS, P.; TABOR, D.; KAST, H. R. *et al.* Regulation of gene expression by SREBP and SCAP. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1529, p. 103-113, 2000.

EINARSSON, K.; ERICSSON, S.; EWERTH, S. *et al.* Bile-acid sequestrants – mechanism of action on bile-acid and cholesterol-metabolism. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, v. 40, n. 1, p. S53-S58, 1991.

ELLEGARD, L.; BOSAEUS, I.; ANDERSSON, H. W. Recommended changes in fat and fibre intake affect cholesterol absorption and sterol excretion? An ileostomy study. *Eur. J. Clin. Nutr.*, v. 54, n. 1, p. 306-313, 2000.

ELSOHLY, H. N.; JOSHI, A. S.; NIMROD, A. C. *et al.* Antifungal chalcones from *Maclura tinctoria*. *Planta Med.*, v. 67, n. 1, p. 87-89, 2001.

ENDO, A. Chemistry, biochemistry, and pharmacology of HMG-CoA reductase inhibitors. *Klin Wochenshr*, v. 66, n. 1, p. 421-427, 1988.

ENDO, A.; TSUJITA, Y.; KURODA, M. Mechanism for the action and cholesterol-lowering activity of ML-236B, an inhibitor of cholesterol synthesis. *Proc. Jpn. Conf. Biochem. Lipids*, v. 19, p. 345-346, 1977.

FAN, J.; UNOKI, H.; KOJIMA, N. *et al.* Overexpression of lipoprotein lipase in transgenic rabbits inhibits diet-induced hypercholesterolemia and atherosclerosis. *J. Biol. Chem.*, v. 276, n. 43, p. 40071-40079, 2001.

FIELDING, C. J.; FIELDING, P. E. Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J. Lipid. Res.*, v. 36, p. 211-228, 1995.

FINER, N. Pharmacotherapy of obesity. *Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, v. 16, n. 4, p. 717-742, 2002.

FRANÇOOSO, L. A.; COATES, V. Evidências anatomopatológicas do início da aterosclerose na infância e adolescência. *Arq. Bras. Cardiol.*, v. 78, n. 1, p. 131-136, 2002.

FRIEDEWALD, W. T.; LEVY, R. I.; FREDRICKSON, D. S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol plasma, without use of preparative ultracentrifuge. *Clin. Chem.*, v. 18, n. 1, p. 499-502, 1972.

FRUCHART, J. C.; DURIEZ, P. HDL and triglyceride as therapeutic targets. *Curr. Opin. Lipidol.*, v. 13, n. 6, p. 605-616, 2002.

FUJITA, T.; SAKUMA, S.; SUMIYA, T *et al.* The effects of xanthoangelol E on arachidonic acid metabolism in the gastric antral mucosa and platelet of the rabbit. *Res. Commun Chem. Pathol. Pharmacol.*, v. 77, n. 2, p. 227-240, 1992.

GAFNER, S.; WOLFENDER, J. L.; MAVI, S. *et al.* Antifungal and antibacterial chalcones from *Myrica serrata*. *Planta Med.*, v. 62, n. 1, p. 67-69, 1996.

GARATTINI, S.; PAOLETTI, R.; BIZZI, L. *et al.* In: Drugs affecting lipid metabolism. *Elsevier*, v. 1, n. 1, p. 144, 1961.

GHANNEM, H.; DARIOLI, R.; LIMAN, K. *et al.* Epidemiology of cardiovascular risk factors among schoolchildren in Sousse, Tunisia. *J Cardiol. Risk.*, v. 8, n. 2, p. 87-91, 2001.

GIL, V. M. S.; GERALDES, C. F. G. C. *Ressonância Magnética Nuclear: fundamentos, métodos e aplicações*. 1ed. Coimbra: Fundação Calouste Gulbenkian, 1987, 1072 p.

GOLDBERG, A. P.; MELLON, W. S.; WITIAK, D. T. *et al.* Comparison of the hypocholesterolemic activity for cyclic analogs of clofibrate in normolipemic rats. *Atheroscl.*, v. 27, n. 1, p. 15-25, 1977.

GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature*, v. 343, p. 425-430, 1990.

GOTTO, A. M. Overview of a current issues in manegement of dyslipidemia. *Am. J. Cardiol.*, v. 71, p. 3B-8B, 1993.

GRAHAM, A. Cellular thiol production and oxidative of low-density lipoprotein. *Free Radic. Res.*, v. 28, n. 6, p. 611-621, 1998.

GREAVES, D. R., CHANNON, K. M. Inflammation and immune responses in atherosclerosis. *Trends Immunol.*, v. 23, n. 11, p. 535-541, 2002.

GREEVENBROEK, M. J. V.; BRUIN, T. W. A. Chylomicron synthesis by intestinal cells *in vitro* and *in vivo*. *Atherosclerosis.*, v. 141, n. 1, p. 9-16, 1998.

HALLIWEL, B., GUTTERIDGE, J. M. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann. NY Acad. Sci.*, v. 899, p. 136-147, 2000.

HARRIS, A.; DEVARAI, S.; JIALAL, I. Oxidative stress, alpha-tocopherol therapy, and atherosclerosis. *Curr. Atheroscl. Rep.*, v. 4, n. 5, p. 373-380, 2002.

HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry Method that gives a linear photometric response. *Analyt. Biochem.*, v. 48, p. 422-427, 1972.

HATANO, T.; YASUHARA, T.; MIYAMOTO, K. *et al.* Anti-human immunodeficiency virus phenolics from licorice. *Chem. Pharm. Bull.*, v. 36, n. 6, p. 2286-2288, 1988.

HEGAZI, A. G.; EL HADY, F. K. Egyptian propolis: 1-antimicrobial activity and chemical composition of Upper Egypt propolis. *Z. Naturforsch.*, v. 56, n. 1-2, p. 82-88, 2001.

HEEREN, J.; BODMAN, C.; NIEMEIER, A *et al.* Endothelial-derived lipoprotein lipase is bound to human postprandial chylomicrons and mediates their hepatic clearance *in vivo*. *Atheroscl. Supplem.*, v. 3, n. 2, p. 122, 2002.

HEITZER, T.; SCHILINZIG, T.; KROHN, K. *et al.* Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation.*, v. 104, n. 22, p. 2673-2678, 2001.

HERENCIA, F.; LOPEZ-GARCIA, M. P.; UBEDA, A *et al.* Nitric Oxide-scavenging properties of some chalcones derivatives. *Nitric Oxide Biol. Chem.*, v. 6, n. 2, p. 242-246, 2002.

HIYOSHI, H.; YANAGIMACHI, M., ITO, M. *et al.* Squalene synthase inhibitors suppress triglyceride biosynthesis through the farnesol pathway in rat hepatocytes. *J. Lipid. Res.*, v. 44, n. 1, p. 128-135, 2003.

HOPKINS, J. C. Statins: effective antiatherosclerotic therapy. *Am. Heart. J.*, v. 139, p. 577-583, 2000.

HSIEH, H. K.; TSAO, L. T.; WANG, J. P. *et al.* Synthesis and anti-inflammatory effect of chalcones. *J. Pharm. Pharmacol.*, v. 52, n. 2, p. 163-171, 2000.

HSU, H. C.; LEE, Y. T.; CHEN, M. F. Effect of n-3 acids on the composition and binding properties of lipoproteins in hypertriglyceridemic patients. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 71, n. 1, p. 28-35, 2000.

HUFF, M. W.; BURNETT, J. R. 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors and hepatic apolipoprotein B secretion. *Curr. Opin. Lipidol.*, v. 8, p. 138-145, 1997.

INAMORI, Y.; BABA, K.; TSUJIBO, H. *et al.* Antibacterial activity of two chalcones, xantroangelol and 4 - hidroxydericin, isolated from the root of *Angelica keiskei* KOIDZUMI. *Chem. Pharm. Bull.*, v. 39, n. 6, p. 1604-1605, 1991.

ISHITSUKA, H.; NINOMIYA, Y. T.; OHSAWA, C. *et al.* Direct and specific inactivation of rhinovirus by chalcone Ro 09-0410. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 22, n. 4, p. 617-621, 1982.

ISHITSUKA, H.; OHSAWA, C.; OHIWA, T. *et al.* Antipicornavirus flavone Ro 09-0179. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 22, n. 4, p. 611-616, 1982.

ISTVAN, E. Statin inhibition of HMG-CoA reductase: a 3-dimentsional view. *Atheroscl. Supplem.*, v. 4, n. 1, p. 3-8, 2003.

IWATA, S.; NISHINO, T.; NAGATA, N. *et al.* Antitumorigenic activities of chalcones. I. Inhibitory effects of chalcone derivatives on ³²Pi-incorporation into phospholipids of HeL a cells promoted by 12-O-tetradecanoyl-phorbol 13-acetate (TPA). *Biol Pharm Bull.*, v. 18, n. 12, p. 1710-1713, 1995.

IWATA, S.; NISHINO, T.; INOUE, H. *et al.* Antitumorigenic activities of chalcones (II). Photo-isomerization of chalcones and the correlation with their biological activities. *Biol Pharm Bull.*, v. 20, n. 12, p. 1266-1270, 1997.

JURCSAK, N. W.; ZAMINI, H. Employing NMR Spectroscopy to evaluate transmission of electronic effects in 4-substituted chalcones. *J. Chem. Ed.*, v. 76, n. 5, p. 653-654, 1999.

KÁDÁR, A.; GLASZ, T. Development of atherosclerosis and plaque biology. *Cardiovasc. Surg.*, v. 9, n. 2, p. 109-121, 2001.

KAJINAMI, K.; TAKEKOSHI, N. Cholesterol absorption inhibitors in development as potential therapeutics. *Expert. Opin. Investig. Drugs*, v. 11, n. 6, p. 831-835, 2002.

KAMANNA, V. S.; KASHYAP, M. L. Mechanism of action of niacin on lipoprotein metabolism. *Curr. Atheroscl. Rep.*, v. 2, n. 1, p. 36-46, 2000.

KANEKO, HWANG EI, OHNISHI *et al.* Heterologous production of flavanones in *Escherichia coli*: potential for combinatorial biosynthesis of flavonoids in bacteria. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, v. 30, n. 8, p. 456-461, 2003

KAYSER, O., KIDERLEN, A. F. *In vitro* leishmanicidal activity of naturally occurring chalcones. *Phytother. Res.*, v. 15, n. 2, p. 148-152, 2001.

KERCKHOFFS, D. A.; BROUNS, F.; HORNSTRA, G. *et al.* Effects on the human lipoprotein profile of beta-glucan, soy protein and isoflavones, plant sterols, garlic and tocotrienols. *J. Nutr.*, v. 139, n. 9, p. 2494-2505, 2002.

KHANNA, A. K.; RIZVI, F.; CHANDER, R. Lipid lowering activity of *Phyllanthus niruri* in hyperlipemic rats. *J. Ethnopharmacol.*, v. 82, n. 1, p. 19-22, 2002.

KO, H. H.; TSAO, L. T.; YU, K. L. *et al.* Structure-activity relationship studies on chalcones derivatives, the potent inhibition of chemical mediators release. *Bioorg. Med. Chem.*, v. 11, n. 1, p. 105-111, 2003.

KU, K.; OKU, H.; KANEDA, T *et al.* Beneficial effects of omega-3 fatty acid treatment on the recovery of cardiac function after cold storage of hyperlipidemic rats. *Metabolism.*, v. 48, n. 10, p. 1202-1209, 1999.

LAMBERT, J. B.; SHURVELL, H. F.; LIGHTNER, D. *et al.* *Introduction to organic spectroscopy*. 1ed. Macmillan: New York, 1987, 454p.

LAWRENCE, N. J.; MCGOWN, A. T.; DUCKI, S. *et al.* The interaction of chalcones with tubulin. *Anticancer Drug Des.*, V. 15, N. 2, P. 135-141, 2000.

LAWRENCE, N. J.; RENNINSON, D.; MCGOWN, A. T. *et al.* Linked parallel synthesis and MTT bioassay screening of substituted chalcones. *J Comb Chem.*, v. 3, n. 5, p. 421-426, 2001.

LEESON, C. P.; WHINCUP, P. H.; COOK, D. G. *et al.* Cholesterol and arterial distensibility in the first decade of life: a population-based study. *Circ.*, v. 101, n. 1, p. 41533-41538, 2000.

LESSA, I.; MENDONÇA, G. A. S.; TEIXEIRA, M. T. B. Noncommunicable chronic disease in Brazil: from risk factors to social impact. *Bol. Oficina Sanit. Panam.*, v. 120, p. 389-413, 1996.

LI, R.; KENYON, G. L.; COHEN, F. E. *In vitro* antimalarial activity of chalcones and their derivatives. *J. Med. Chem.*, v. 38, n. 26, p. 5031-5037, 1995.

LIMASSET, B.; LE DOUCEN, C.; DONE, J. C *et al.* Effects of flavonoids on the release of reactive oxygen species by stimulated human neutrophils. Multivariate analysis of structure-activity relationships (SAR). *Biochem. Pharmacol.*, v. 46, n. 7, p. 1257-1271, 1993.

LOPÉZ, S. N.; CASTELLI, M. V.; ZACCHINO, S. A. *et al.* *In vitro* antifungal evaluation and structure-activity relationships of a new series of chalcone derivatives and synthetic analogues, with inhibitory properties against polymers of the fungal cell wall. *Bioorg. Med. Chem.*, v. 9, n. 8, p. 1999-2013, 2001.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L. *et al.* Protein measurement with the folin reagent. *J. Biol. Chem.*, v. 193, p. 265-269, 1951.

LUNARDI, F.; GUZELA, M. Efeito antiparasitário de chalconas substituídas, 1998. Monografiade conclusão de curso. (Curso de Farmácia) - Centro de Educação Superior de Ciências de Saúde, Universidade do Vale de Itajaí, 1998.

LUNARDI, F.; GUZELA, M.; CORRÊA, R. *et al.* Trypanocidal and leishmanicidal properties of substitution-containing chalcones. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 47, n. 4, p. 1449-1451, 2003.

LUZ, P. L. Aterogênese. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia: III Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemias.*, v. 77, p. 10-11, 2001.

MACIAS, F. A.; MARIN, D.; OLIVEROS-BASTIDAS, A *et al.* Allelopathy as a new strategy for sustainable ecosystems development. *Biol. Sci. Space*, v. 17, n. 1, p. 18-23, 2003.

MANSUR, A. P.; GOMES, E. P.; AVAKIAN S. D. *et al.* Clustering of traditional risk factors and precocity of coronary disease in women. *Int. J. Cardiol.*, v. 81, n. 2-3, p. 205-209, 2001.

MARANHÃO, R. C. Metabolismo lipídico. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia: III Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemias.*, v. 77, p. 9-10, 2001.

MARCK, J. Advanced Organic Chemistry: reactions, mechanism and structure. 3ed. Wiley-Interscience: New York, 1929.

MARZZOCCO, A.; TORRES, B. B. *Bioquímica Básica*. 2ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1999, p. 360.

MCGOWAN, M.W.; ARTISS, J.D.; STRANDBERGH D.R. A peroxidase coupled method for the colorimetric determination of serum triglycerides. *Clin. Chem.*, v. 29, p. 538-542, 1983.

MCNEELY, W.; BENFIELD, P. Orlistat. *Drugs*, v. 56, n. 2, p. 241-249, 1998.

MCPHERSON, J. C. 3rd; MCPHERSON, J. C. Jr. Voluntary food consumption and gastric emptying in rats given intravenous Triton WR 1339. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, v. 181, n. 3, p. 382-386, 1986.

MCPHERSON, J. C. Jr; SCHUSTER, G. S.; DIRKSEN, T. R. The *in vitro* effects of Triton WR 1339 on lipid synthesis by bone cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, v. 149, n. 1, p. 172-177, 1975.

MIDDLETON, E. J.; FUJIKI, H.; SAVLIWALA, M. *et al.* Tumor promoter-induced basophil histamine release: effect of selected flavonoids. *Biochem. Pharmacol.*, v. 15, n. 36, p. 2048-2052, 1987.

**MINISTÉRIO DA SAÚDE. Informações hospitalares do DataSus.
<http://www.datasus.gov.br>, acessado em 17/06/2003.**

MIRANDA, C. L.; STEVENS, J. F.; IVANOV, V. *et al.* Antioxidant and prooxidant actions of prenylated and nonprenylated chalcones and flavanones *in vitro*. *J. Agric. Food Chem.*, v. 48, n. 9, p. 3876-3884, 2000.

MORISSEAU, C.; DU, G.; NEWMAN, J. W. *et al.* Mechanism of mammalian soluble epoxide hydrolase inhibition by chalcone oxide derivatives. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 356, n. 2, p. 214-228, 1998.

MURRAY, R. K.; GRANNER, D. K.; MAYES, P. A. *et al.* *Harper's biochemistry*. 25ed. McGraw-Hill: New York, 2000, 927 p.

NAPOLI, C. Low density lipoprotein oxidation and atherogenesis: from experimental models to clinical studies. *Gazz. Ital. Cardiol.*, v. 27, n. 12, p. 1302-1314, 1997.

NAVA, A. Atherosclerosis e inflamación. *Arch. Cardiol. Mex.*, v. 72, p. S153-S155, 2002.

NEWTON, R. S.; KRAUSE, B. R. HDL therapy for the acute treatment of atherosclerosis. *Atheroscl. Supplem.*, v. 3, n. 4, p. 31-38, 2002.

OLIVEIRA, L. F. S. Avaliação *in vivo* do efeito hipocolesterolêmico do extrato metanólico de *Aleurides moluccana*, xantoxilina e seus derivados, 2001, 115p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Departamento de Bioquímica, UFSC, 2001.

OPLETALOVÁ, V. Chalcones and their heterocyclic analogs as potential therapeutic agents in bacterial diseases. *Ceska Slov. Farm.*, v. 49, n. 6, p. 276-284, 2000.

OPLETALOVÁ, V.; JAHODAR, L.; JUN, D. *et al.* Chalcones (1,3-diarylpropen-1-ones) and their analogs as potential therapeutic agents in cardiovascular system diseases. *Ceska Slov. Farm.*, v. 52, n. 1, p. 12-19, 2003.

OPLETALOVÁ, V.; SEDIVY, D. Chalcones and their heterocyclic analogs as potential antifungal chemotherapeutic agents. *Ceska Slov. Farm.*, v. 48, n. 6, p. 252-255, 1999.

PANDEYA, S. N.; SRIRAM, D.; NATH, G. *et al.* Synthesis and antimicrobial activity of Schiff and Mannich bases of isatin and its derivatives with pyrimidine. *Fármaco*, v. 54, n. 9, p. 624-628, 1999.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. *Introduction to spectroscopy. 2ed.* Orlando: Saunders College Publishing, 1979, 511 p.

PAYNE, K. A.; HUYBRECHTS, K. F.; CARO, J. J. *et al.* Long term cost-of-illness in stroke: an international review. *Pharmacoeconomics.*, v. 20, n. 12, p. 813-825, 2002.

PEASE, R. J., LEIPER, J. M. Regulation of hepatic apolipoprotein-B-containing lipoprotein secretion. *Curr. Opin. Lipidol.*, v. 7, p. 132-138, 1996.

PEETERS, A.; MAMUN, A. A.; WILLEKENS, F. *et al.* A cardiovascular life history: a life course analysis of the original Framingham heart study cohort. *Eur Heart J.*, n.23, p. 458-466, 2002.

PERDIGÃO, C. Utilização racional dos fármacos em cardiologia: algumas noções de farmacologia clínica. *Rev. da FML.*, v. 4, n. 1, p. 37-54, 1999.

PILLARISETTI, S.; SAXENA, U. Lipoprotein lipase as a therapeutic target for dyslipidemia. *Front. Biosci.*, v. 1, n. 8, p. D238-D241, 2003.

QUYYUMI, A. A. Prognostic value of endothelial function. *Amer. J. Cardiol.*, v.12, p. 19-24, 2003.

RAM, V. J.; SAXENA, A. S.; SRIVASTANA, S. *et al.* Oxygenated chalcones and bischalcones as potential antimalarial agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, v. 10, n. 19, p. 2159-2161, 2000.

REAL, J. T.; CHAVES, F. J.; MARTINEZ-USO, I. *et al.* Importance of HDL-cholesterol levels and total/HDL-cholesterol ratio as a risk factor for coronary heart disease in molecularly defined heterozygous familial hypercholesterolaemia. *Eur. Heart J.*, v. 22, n. 6, p. 465-471, 2001.

ROBINSON, A. W.; SLOAN, H. L.; ARNOLD, G. Use of niacin in the prevention and management of hyperlipidemia. *Prog. Cardiovasc. Nurs.*, v. 16, n. 1, p. 14-20, 2001.

RODRIGUES, A. T. Síntese, caracterização e atividade biológica de chalconas sintéticas, 1997, 115p. Monografia de conclusão de curso (Graduação em Farmácia) – Núcleo de Investigações Químico-Farmacêuticas, UNIVALI, 1997.

ROJAS, J.; PAYÁ, M.; DOMINGUEZ, J. N. *et al.* The synthesis and effect of fluorinated chalcone derivatives on nitric oxide production. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, v. 12, n. 15, p. 1951-1954, 2002.

ROS, E. Intestinal absorption of triglycerides and cholesterol: dietary and pharmacological inhibition to reduce cardiovascular risk. *Atherosclerosis*, v. 151, p. 357-379, 2000.

ROSS, R.; GLOMSET, J. A. The pathogenesis of atherosclerosis. *N. Eng. J. Med.*, v.420, p. 295-369, 1976.

ROSS, R. The pathogenesis of atherosclerosis: An update. *N. Eng. J. Med.*, v. 314, p. 488, 1986.

_____. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.*, v. 340, p. 115, 1999.

ROTHWELL, N. J.; SVILLE, M. E.; STOCK, M. J. Effects of feeding a “cafeteria” diet on energy balance and diet induced thermogenesis in four strains rats. *J. Nutr.*, v. 112, p. 1515-1524, 1982.

SAIRAFIANPOUR, M.; KAYSER, O.; CHRISTENSEN, J *et al.* Leishmanicidal and antiplasmodial activity of constituents of *Smirnowia iranica*. *J. Nat. Prod.*, v. 65, n. 12, p. 1754-1758, 2002.

SANTOS, J. E. Mudanças do estilo de vida. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia: III Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemias.*, v. 77, p. 28-35, 2001.

SANTOS, L. Síntese de chalconas de interesse biológico, 2000, 115p. Monografia de conclusão de curso (Graduação em Farmácia) – Centro de Educação Superior de Ciências da Saúde, Universidade do Vale de Itajaí, 2000.

SATO, M.; TSUCHIYA, H.; AKAGIRI, H. *et al.* Growth inhibition of oral bacteria related to denture stomatitis by anti-candidal chalcones. *Aust. Dent. J.*, v. 42, n. 5, p. 343-346, 1997.

SAYDAM, G.; AYDIN, H. H.; SAHIN, F. *et al.* Cytotoxic and inhibitory effects of 4, 4'-dihydroxy chalcones (RVC-588) on proliferation of human leukemic HL-60 cells. *Leuk. Res.*, v. 27, n. 1, p. 57-64, 2003.

SCHECTER, R. L.; ALAOUI-JAMALI, M. A.; BATIST, G *et al.* Glutathione S-transferase in chemotherapy resistance and in carcinogenesis. *Biochem. Cell. Biol.*, v. 70, n. 5, p. 349-343, 1992.

SCHIEFFER, B.; DREXLER, H. Role of 3-hidroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors, angiotensin-converting enzyme inhibitors, cyclooxygenase-2 inhibitors, and aspirin in anti-inflammatory and immunomodulatory treatment of cardiovascular diseases. *Am. J. Cardiol.*, v. 91, p.12H-18H, 2003.

SCHONBECK, U.; GERDES, N.; VARO, N *et al.* Oxidized low-density lipoprotein augments and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors limit CD40 and CD40L expression in human vascular cells. *Circulation*, v. 106, n. 23, p. 2888-2893, 2002.

SCHURR, P. E.; SCHULTZ, J. R.; PARKINSON, T. M. Triton-induced hyperlipidemia in rats as an animal model for screening hypolipidemic drugs. *Lipides*, v. 7, n. 1, p. 68-74, 1972.

SCOTT, J. The pathogenesis of atherosclerosis and new opportunities for treatment and prevention. *J. Neural Transm. Suppl.*, v. 63, p. 1-17, 2002.

SERVOSS, S. J.; JANUZZI, J. L., MULLER. J. E. Triggers of acute coronary syndromes. *Prog. Cardiovasc. Dis.*, v.44, n. 5, p. 369-380, 2002.

SHIBATA, S. Anti-tumorigenic chalcones. *Stem Cells*, v. 12, n. 1, p. 44-52, 1994.

SHIMADA, M.; ISHIBASHI, S.; INABA, T. *et al.* Suppression of diet-induced atherosclerosis in low density lipoprotein receptor knockout mice overexpressing lipoprotein lipase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 93, n. 14, p. 7242-7246, 1996.

SILVA, J. M. Aterosclerose: um dos mais aliciantes temas da investigação médica. *Bol. Socied. Portug. Ateroscl.*, v. 1, p. 2, 1993.

SILVA, J. M.; MALDONADO, J.; COSTA, A. Morte prematura por dislipidemia. *Cardiologia Actual.*, v. 3, n. 18, p. 646-651, 1993.

SILVA, J. M.; GASPAR, E.; GONÇALVES, F. Factores de risco e patologia cardio e cerebrovascular. *Rev. da FML.*, v. 4, n. 5, p. 19-32, 1999.

SINGH, B. K.; MEHTA, J. L. Management of dyslipidemia in the primary prevention of coronary heart disease. *Curr. Opin. Cardiol.*, v. 17, n. 5, p. 503-511, 2002.

SIRTORI, C. R. New targets for lipid lowering and atherosclerosis prevention. *Pharmacol. Ther.*, v. 67, n. 3, p. 433-447, 1995.

SLATER, H.; PARAFIORITI, E.; TORTORA, A. *et al.* Hypertriglyceridemia: a secondary target for primary prevention (ATP III). *Atheroscl. Supple.*, v. 3, n. 2, p. 208, 2002.

SOLOMONS, T. W. G. *Organic Chemistry*. 6ed. New York: John Wiley & Sons, 1996.

SOSKA, V. Present status of fibrates in the treatment of hyperlipoproteinemias. *Vnitr. Lek.*, v. 45, n. 7, p. 438-440, 1999.

SPARROW, C. P.; BURTON, C. A.; HERNANDEZ, M. *et al.* Simvastatin has anti-inflammatory and antiatherosclerotic activities independent of plasma cholesterol lowering. *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.*, v. 21, n. 1, p. 115-121, 2001.

SPIROS, G.; FRANGOS, M. D.; GAHTAN, V. *et al.* Localization of atherosclerosis role of hemodynamics. *Arch Surg.*, v. 134, p. 1142-1149, 1999.

SPRIBILLE, R.; FORKMANN, G. Chalcone synthesis and hydroxylation of flavonoids in 3 - position with enzyme preparations from flowers of *Dianthus caryophyllus* L. (carnation). *Planta*, v. 155, p. 177-182, 1982.

STARY, H. C.; CHANDLER, A. B.; GLAGOV, S. *et al.* A definition of initial, fatty streak and intermediate lesions of atherosclerosis: a report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Atherosclerosis. *Circulation.*, v. 89, p. 2462-2478, 1994.

STARY, H. C.; CHANDLER, A. B.; DINSMORE, R. E. *et al.* A definition of advanced types of atherosclerosis lesions and a histological classification of atherosclerosis: a report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Atherosclerosis. *Circulation.*, v. 92, p. 1355-1374, 1995.

STEIN, Y.; STEIN, O. Lipoprotein lipase and atherosclerosis: a review. *Atherosclerosis*, v. 100, p. 1-9, 2003.

STEINER, S.; GATLIN, C.; LENNON, J. J. *et al.* Cholesterol biosynthesis regulation and protein changes in rat liver following treatment with fluvastatin. *Toxicol. Lett.*, v. 120, n. 1-3, p. 369-377, 2001.

STOLL, R.; RENNER, C.; HANSEN, S. Chalcone derivatives antagonize between the human oncoprotein MDM2 and p53. *Biochem.*, v. 40, n. 2, p. 336-344, 2001.

STROBEL, G. A. Rainforest endophytes and bioactives products. *Crit. Rev. Biotechnol.*, v. 22, n. 4, p. 315-333, 2002.

TALL, A. R. Plasma cholesteryl ester transfer protein. *J. Lipid. Res.*, v. 34, p. 1255-1274, 1993.

TALMUD, P. J.; HAWE, E.; MILLER, G. J. *et al.* Nonfasting apolipoprotein B and triglyceride levels as a useful predictor of coronary heart disease risk in middle-aged UK men. *Atheroscl. Thromb. Vasc. Biol.*, v. 22, p. 1918, 2002.

THOMAS, J. S. Management of hyperlipidemia in children. *Progr. Ped. Cardiol.*, v. 12, n. 2, p. 205-213, 2001.

TIKKANEN, M. J. Fibric acid derivatives. *Curr. Opin. Lipidol.*, v. 3, p. 29-33, 1992.

TOLMAN, K. G. Defining patient risks from expanded preventive therapies. *Am. J. Cardiol.*, v. 85, n. 12, p. 15-19, 2000.

TULENKO, T. N.; SUMNER, A. E. The physiology of lipoprotein. *J. Nucl. Cardiol.*, v. 9, n. 6, p. 638-649, 2002.

VÁSQUEZ-FREIRE, M. J.; LAMELA, M.; CALLEJA, J. M. Hypolipidaemic activity of a polysaccharide extract from *Fucus vesiculosus* L. *Phytother. Res.*, v. 10, p. 647-650, 1996.

VENDEMIALE, G.; GRATTAGLIANO, I; ALTOMARE, E. An update on the role of free radicals and antioxidant defense in human disease. *Int. J. Clin. Lab. Res.*; v. 29, n. 2, p. 49-55, 1999.

VERRI, J.; FUSTER, V. Mecanismos das síndromes isquêmicas agudas e da progressão da aterosclerose coronária. *Arq. Bras. Cardiol.*, v. 68, n. 6, 1997.

XYDAKIS, A. M., JONES, P. H. Use of statins for secondary prevention. *Curr. Treat. Options. Cardiovasc. Med.*, v. 5, n. 1, p. 63-73, 2003.

WAEHRE, T.; DAMAS, J. K.; GULLESTAD, L. *et al.* Hydroxymethylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors down-regulate chemokines and chemokine receptors in patients with coronary artery disease. *J. Am. Coll. Cardiol.*, v. 41, n. 9, p. 1460-1467, 2003.

WEBER, P.; RAEDERSTORFF, D. Triglyceride-lowering effect of omega-3 LC-polyunsaturated fatty acids: a review. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, v. 10, n. 1, p. 28-37, 2000.

WENTZINGER, L.F.; BACH, T. J.; HARTMANN, M. A. Inhibition of squalene synthase and squalene epoxidase in tobacco cells triggers an up-regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase. *Plant. Physiol.*, v. 130, n. 1, p. 334-346, 2002.

WHITE, T. C.; MARR, K. A.; BOWDEN, R. A. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin. Microbiol. Ver.*, v. 11, n. 2, p. 382-402, 1998.

WIERZBICKI, A. S. Synthetic statins: more data on newer lipid-lowering agents. *Curr. Med. Res. Opin.*, v. 17, n. 1, p. 74-77, 2001.

WIERZBICKI, A. S.; MIKHAILIDIS, D. P. Beyond LDL-C - the importance of raising HDL-C. *Curr. Med. Res. Opin.*, v. 18, n. 1, p. 36-44, 2002.

WIERZBICKI, A. S.; REYNOLDS, T. M.; CROOK, M. A. Usefulness of Orlistat in the treatment of severe hypertriglyceridemia. *Am. J. Cardiol.*, v. 89, n. 2, p. 229-231, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The World Health Report 2001. Geneva: WHO; 2001.

YASIN, S. R.; AL-NAKIB, W.; TYRREL, D. A. Pathogenicity for humans of human rhinovirus type 2 mutants resistant to or dependent on chalcone Ro 09-0410. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 34, n. 6, p. 963-966, 1990.

YOSHIDA, W. B.; BOSCO, F. A.; MEDEIROS, A. T. M. *et al.* Lipídios séricos como fatores de risco para pacientes com doença arterial periférica. *J. Vasc Br.*, v. 2, n. 1, p. 5-12, 2003.

YUSUF S.; REDDY, S.; OUNPUU S. *et al.* Global burden of cardiovascular diseases: Part I: general considerations, the epidemiologic transition, risk factors, and impact of urbanization. *Circulation.*, v. 104, n. 27, p. 2746-2753, 2001 (a).

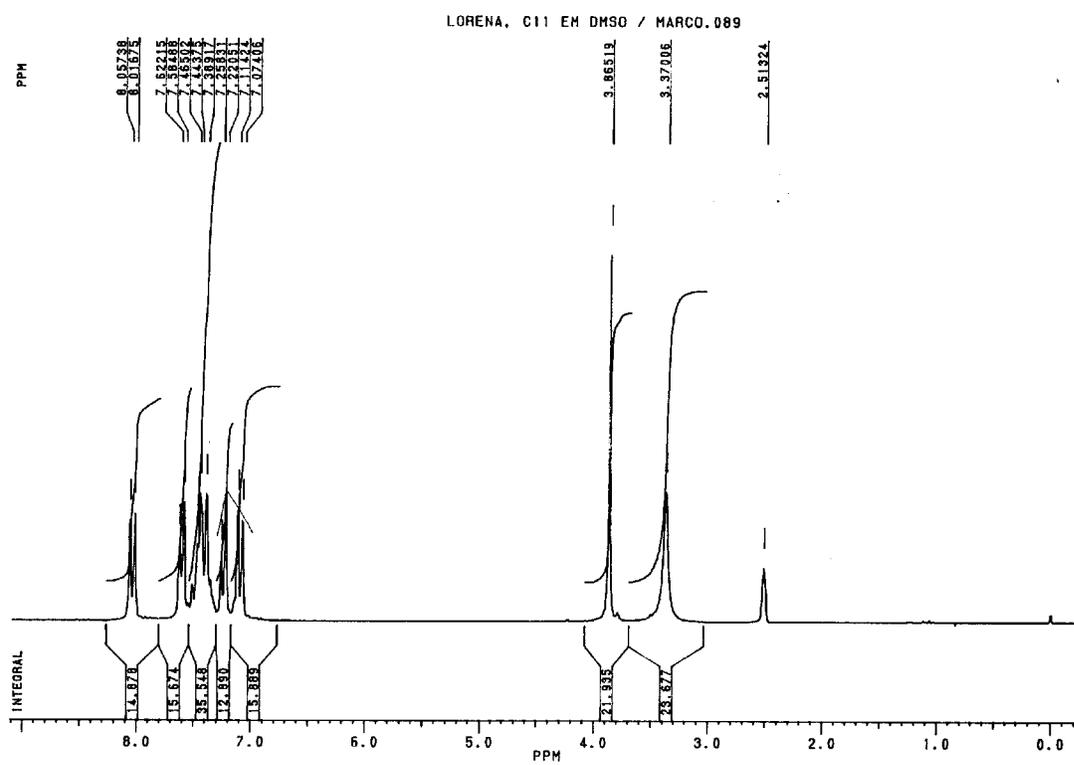
_____. Global burden of cardiovascular diseases: Part II: variations in cardiovascular disease by specific ethnic groups and geographic regions and prevention strategies. *Circulation.*, v. 104, n. 23, p. 2855-2864, 2001 (b).

ZAMBON, A.; DEEB, S. S.; PAULETTO, P. *et al.*, Hepatic lipase: a marker for cardiovascular disease risk and response to therapy. *Curr. Opin. Lipidol.*, v. 14, n. 2, p. 179-189, 2003.

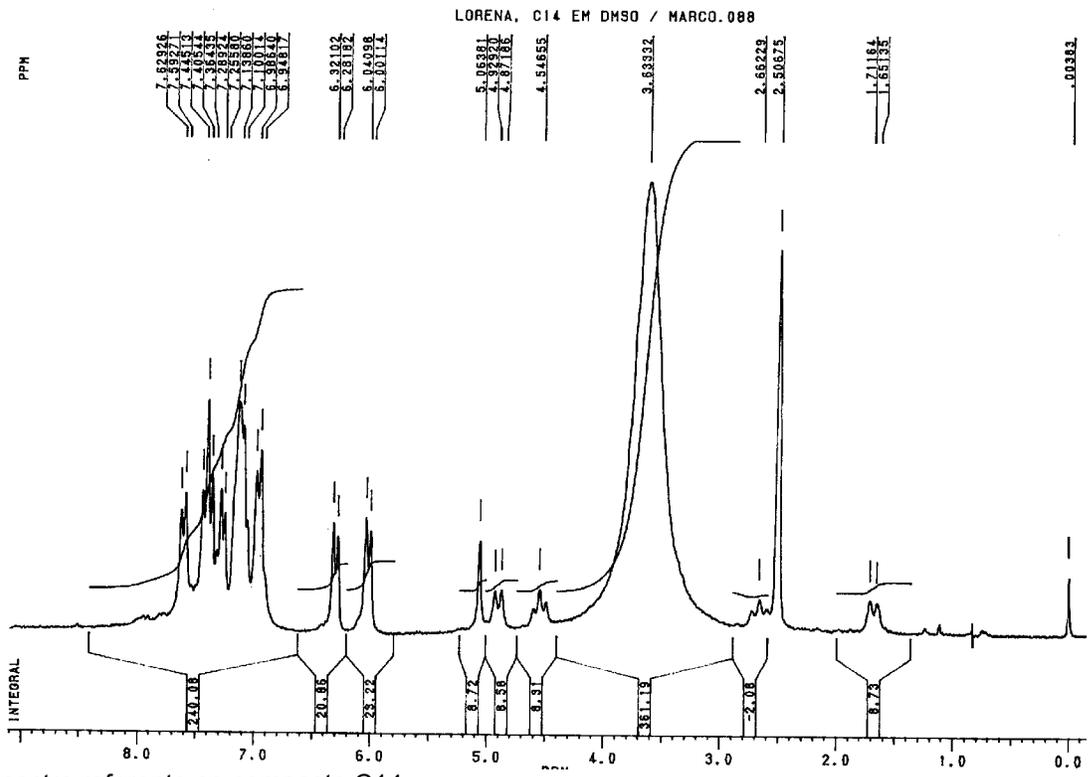
ZHAI, L.; CHEN, M., BLOM, J. The leishmanial activity of novel oxygenated chalcones and their mechanism of action. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 43, p. 793-803, 1999.

ANEXOS

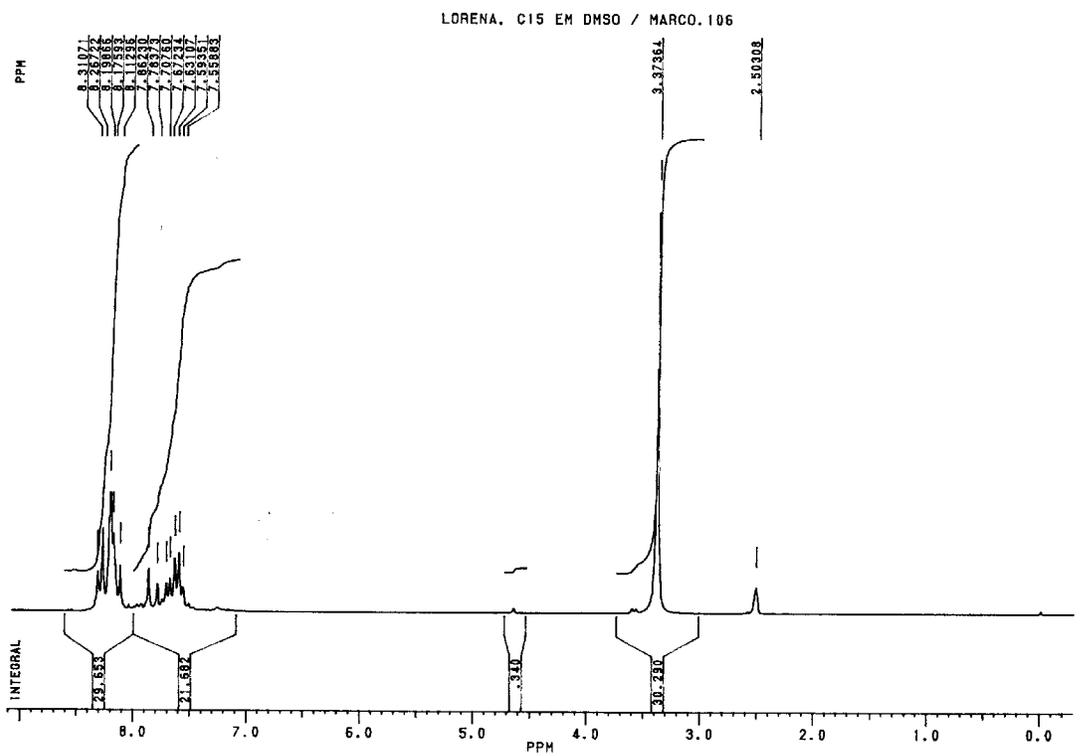
I – Espectros obtidos para a caracterização dos compostos C11-C20 e B1-B4



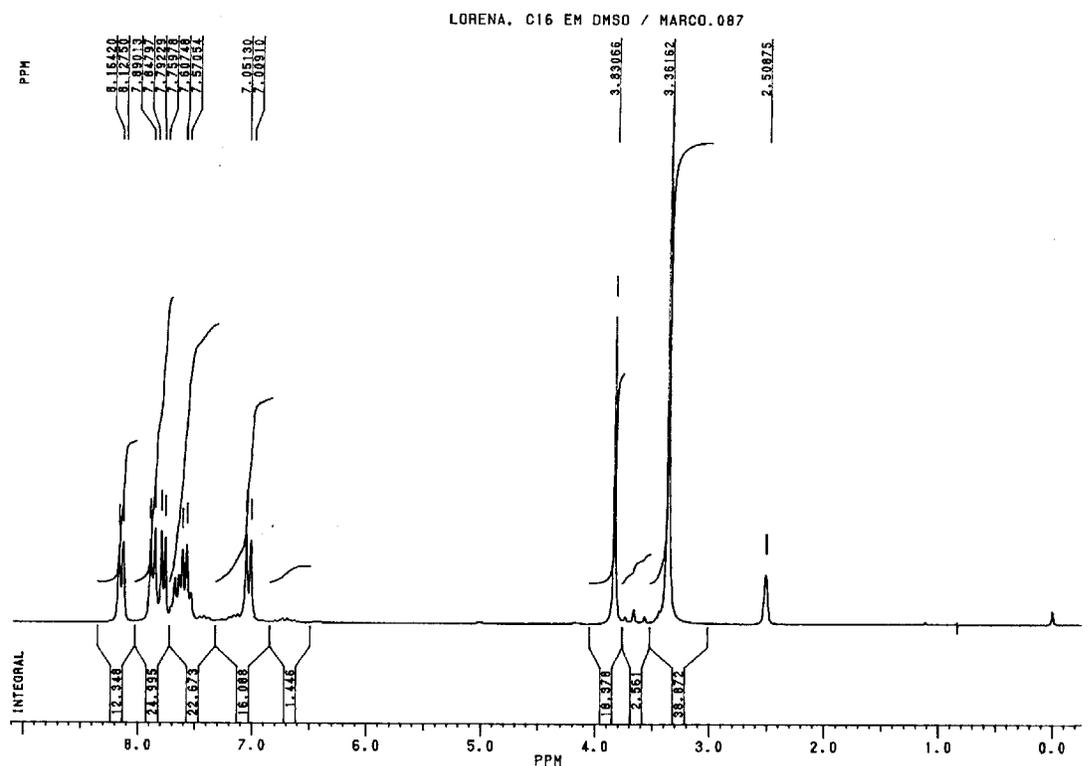
Espectro referente ao composto C11



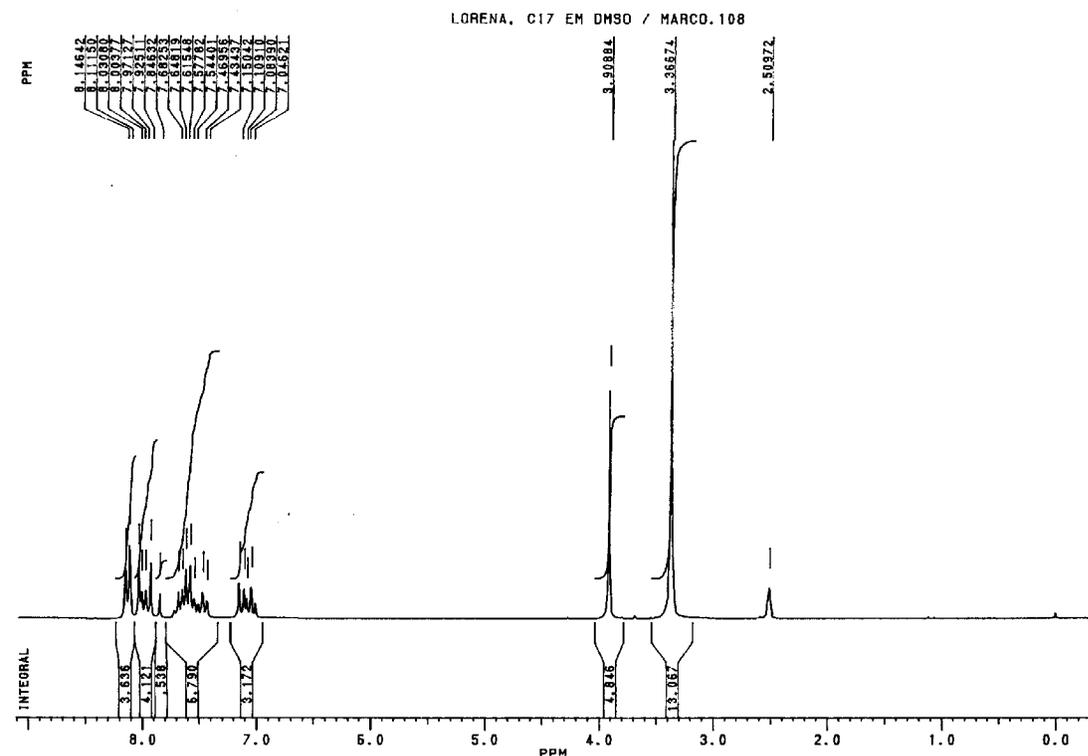
Espectro referente ao composto C14



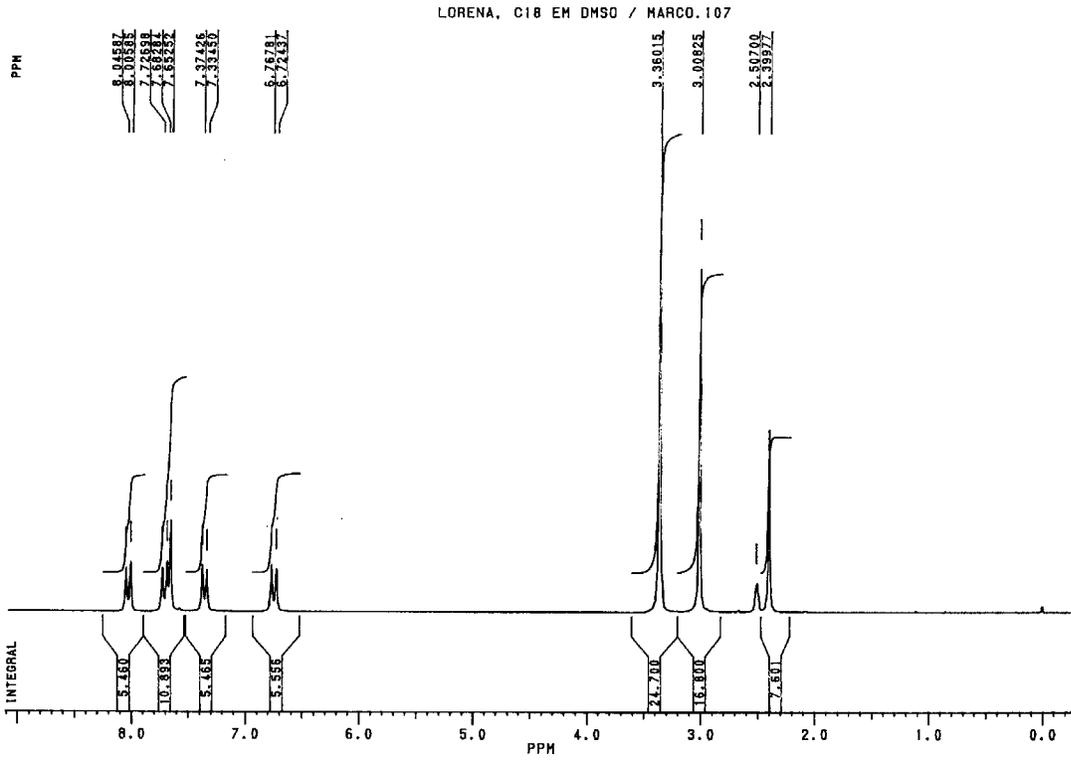
Espectro referente ao composto C15



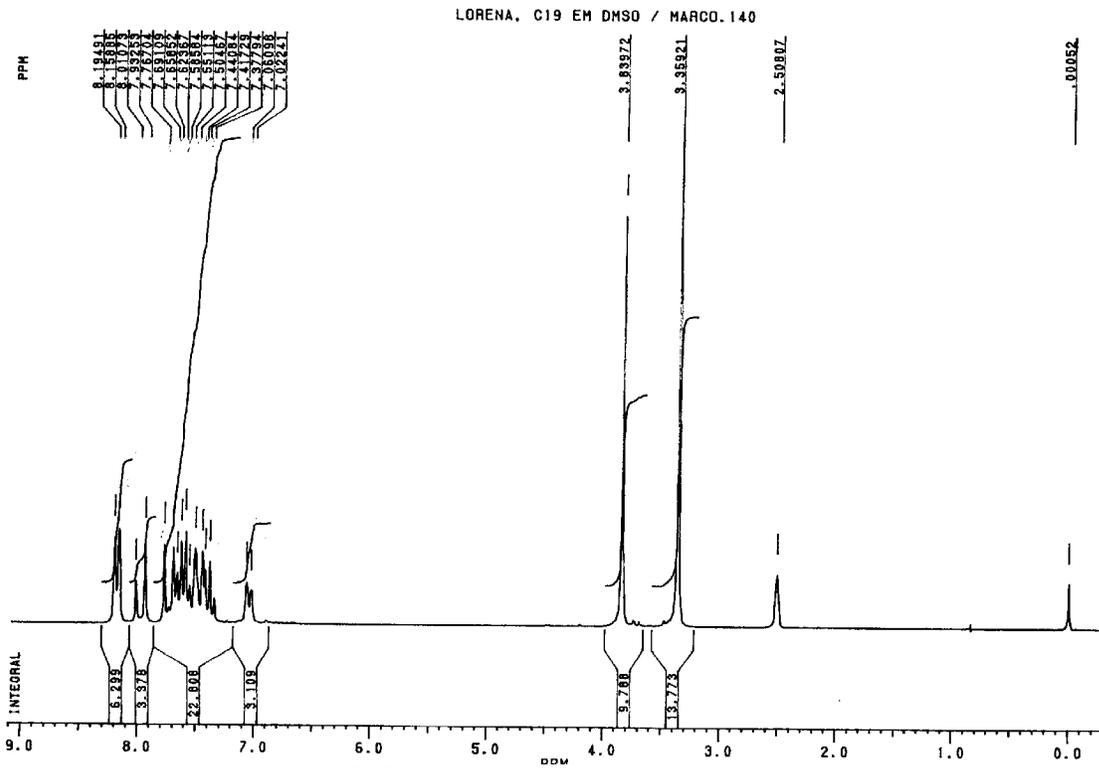
Espectro referente ao composto C16



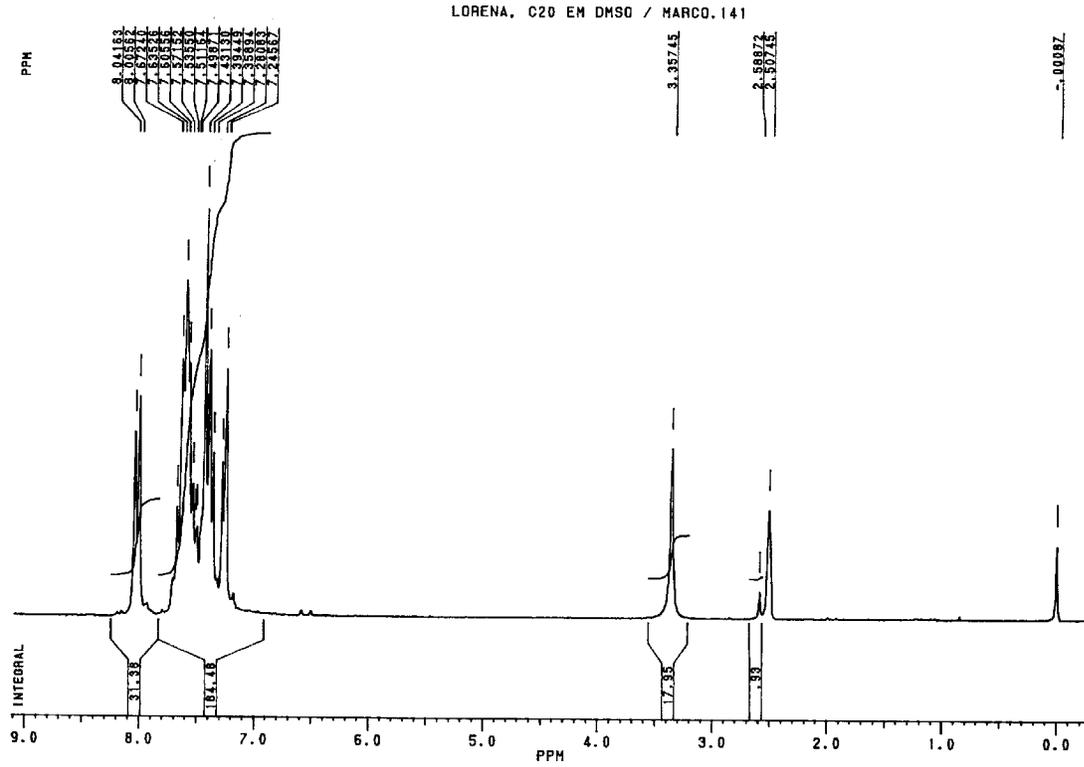
Espectro referente ao composto C17

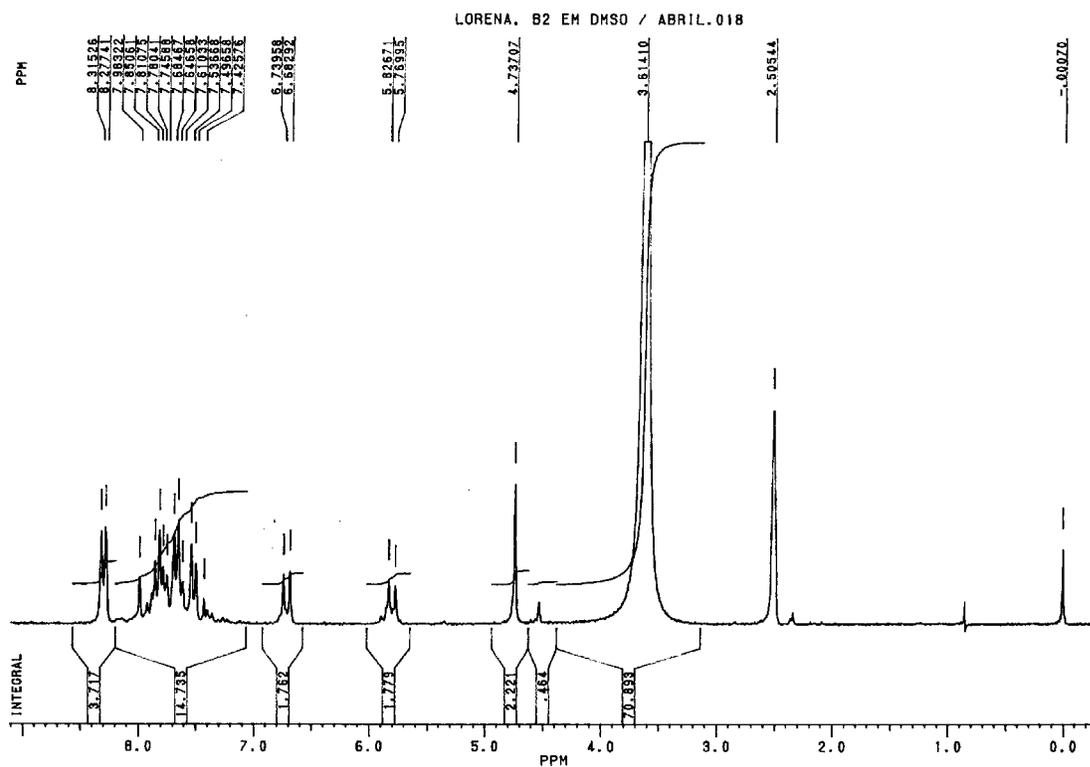


Espectro referente ao composto C18

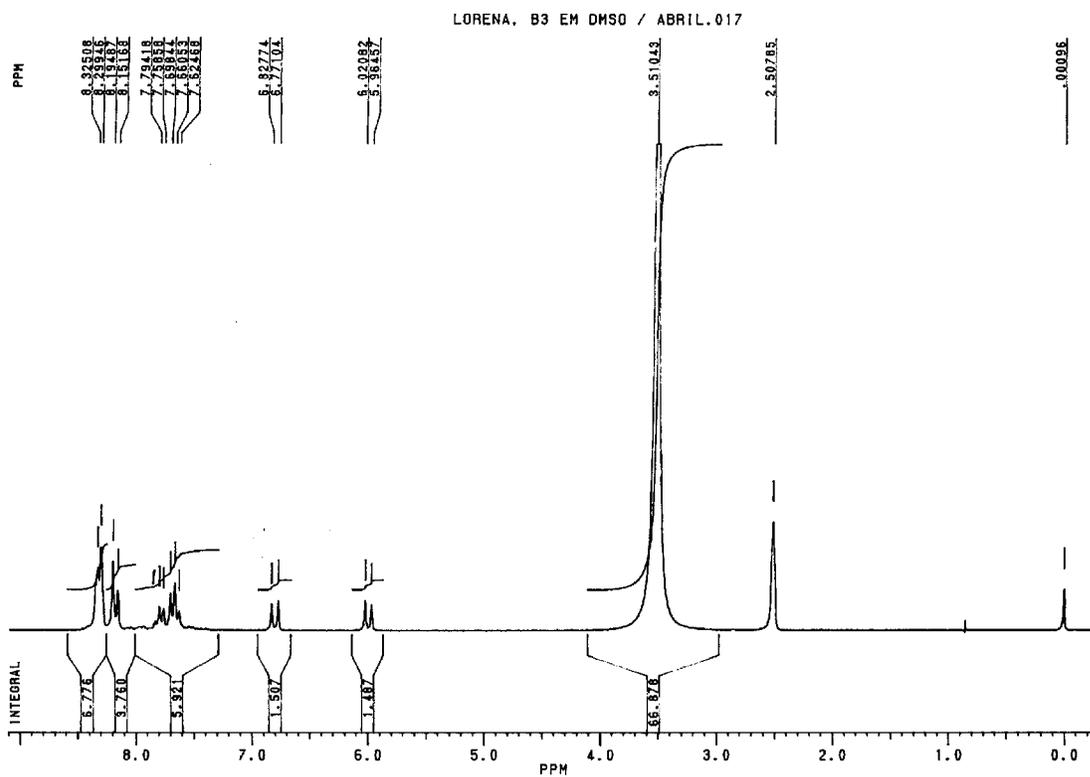


Espectro referente ao composto C19

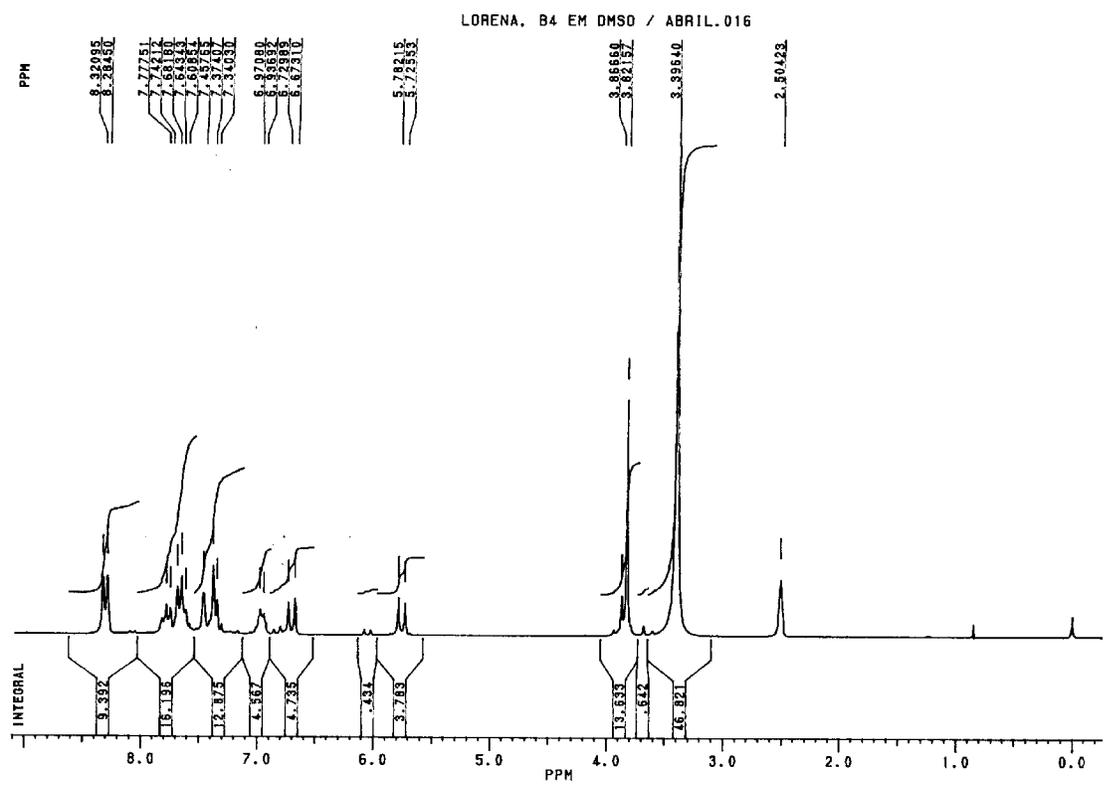




Espectro referente ao composto B2



Espectro referente ao composto B3



Espectro referente ao composto B4

III – Certificado de credenciamento com a CEUA/PRPG-UFSC

IV – Co-autoria em artigo publicado