



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E HUMANAS
Trabalho de Conclusão de Curso | Bacharelado em
Química

Gabriela Di Iorio Leite

**Avaliação anti-*Trypanosoma cruzi* do hiperosídeo,
um flavonoide isolado do resíduo do chá preto**

Santo André – SP

Novembro - 2023

Gabriela Di Iorio Leite

**Avaliação anti-*Trypanosoma cruzi* do hiperosídeo,
um flavonoide isolado do resíduo do chá preto**

Monografia de Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado ao Bacharelado em Química da UFABC para obtenção do título de Bacharel em Química.

Orientador: Prof. Dr. João Henrique Ghilardi Lago

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família por todo suporte durante toda essa etapa acadêmica. Principalmente ao meu pai que me buscou e me levou na faculdade todos os dias e a minha mãe que tentava sempre me acalmar nas semanas de avaliações orais.

Ao meu orientador João Lago por toda a atenção e disponibilidade que teve comigo, além do aprendizado passado. Agradeço pelo apoio e confiança nesta reta final da minha formação.

À todos do laboratório 407-3 por todo auxílio durante esses meses. Em especial ao Eric, Anderson, Calvin e Marina, que tiveram paciência para me acompanhar e me ensinar os vários fracionamentos cromatográficos que fiz durante esses meses.

Ao pessoal do meu trabalho, que sempre me incentivaram a continuar estudando na área química, em especial à Ana Paula e à Sandra, que tem os melhores conselhos sobre a vida.

RESUMO

O chá é a bebida mais consumida no mundo depois da água. Os polifenóis, retidos nos resíduos do chá preto após a produção comercial de bebidas à base dessa infusão, representam um recurso subutilizado. Paralelo a isso, os polifenóis, em especial os flavonoides, apresentam diversas atividades biológicas em especial atividades antioxidantes, antitumorais e antivirais. Frente a isto, a proposta deste trabalho é isolar e caracterizar o principal flavonoide presente na fase etanólica do extrato do resíduo gerado para a produção do chá preto, utilizando técnicas cromatográficas para isolamento e técnicas espectroscópicas para a caracterização estrutural. Além disso, o flavonoide hiperosídeo, teve seu potencial antiparasitário avaliado frente ao *Trypanosoma cruzi*, protozoário responsável pela Doença de Chagas. O hiperosídeo e sua forma aglicona (quercetina) mostraram atividade frente às formas tripomastigota do *T. cruzi* com valores de CE_{50} de 47,3 e 42,4 μM respectivamente. Quando testadas nas formas amastigotas do parasita, ambos os flavonoides apresentaram ativos, com CE_{50} de 35,4 e 7,2 μM respectivamente. Além disso, foi observada reduzida toxicidade em relação às células NCTC ($CC_{50} > 200 \mu\text{M}$). Dessa forma, o flavonoide extraído do resíduo do chá é uma opção obtida de fontes naturais, para a obtenção de protótipos de drogas destinadas ao tratamento da Doença de Chagas.

Palavras-chave: chá; flavonoides; *trypanosoma cruzi*; hiperosídeo.

ABSTRACT

Tea is the most consumed drink in the world after water. Polyphenols, retained in black tea residues after the commercial production of drinks based on this infusion, represent an underutilized resource. Parallel to this, polyphenols, especially flavonoids, have several biological activities, especially antioxidative, antitumor and antiviral activities. In view of this, the purpose of this work is to isolate and characterize the main flavonoid present in the ethanolic phase of the residue extract generated for the production of black tea, using chromatographic techniques for isolation and spectroscopic techniques for structural characterization. Furthermore, the flavonoid hyperoside had its antiparasitic potential evaluated against *Trypanosoma cruzi*, the protozoan responsible for Chagas Disease. The hyperoside and its aglycone form (quercetin) showed activity against the trypomastigote forms of *T. cruzi* with EC_{50} values of 47.3 and 42.4 μM respectively. When tested on amastigote forms of the parasite, both flavonoids were active, with EC_{50} of 35.4 and 7.2 μM respectively. Furthermore, reduced toxicity towards NCTC cells ($CC_{50} > 200 \mu\text{M}$) was observed. Therefore, the flavonoid extracted from tea residue is an option obtained from natural sources, for obtaining prototypes of drugs intended for the treatment of Chagas Disease.

Keywords: tea; flavonoids; *trypanosoma cruzi*; hyperoside.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura molecular básica dos flavonoides.....	13
Figura 2 - Estrutura das molecular das catequinas.....	14
Figura 3 - Estrutura molecular das teaflavinas.....	15
Figura 4 - Principais flavonoides glicosilados no chá de <i>Camellia sinensis</i>	16
Figura 5 - Estrutura molecular do hiperosídeo.....	17
Figura 6 - Transmissão e ciclo de vida da <i>Trypanosoma cruzi</i>	19
Figura 7 - Estruturas moleculares de flavonoides com ação anti- <i>Trypanosoma cruzi</i>	20
Figura 8 - Fluxograma de obtenção dos extratos de chá preto a partir da planta <i>Camellia sinensis</i>	23
Figura 9 - Fracionamento da coluna XAD-2 da fase orgânica (B) do extrato etanólico do resíduo do chá preto.....	24
Figura 10 - Atribuição dos sinais de H-2', H-5' e H-6' do anel B, no espectro de RMN- ¹ H do hiperosídeo.....	28
Figura 11 - Atribuição dos sinais de H-6 e H-8 do anel A, no espectro de RMN- ¹ H do hiperosídeo.....	29
Figura 12 - Atribuição dos sinais de hidrogênio e carbono, do glicosídeo, nos espectros de RMN- ¹ H e ¹³ C do hiperosídeo.....	29
Figura 13 - Atribuição dos sinais de carbono, dos anéis A, B e C, no espectro RMN- ¹³ C do hiperosídeo.....	30
Figura 14 - Estrutura molecular do hiperosídeo (quercetina-3-O-β-D galactopiranosídeo).....	31
Figura 15 - Estruturas moleculares do hiperosídeo e da quercetina.....	33
Figura 16 - Formas amastigotas intracelulares do <i>Trypanosoma cruzi</i>	34
Figura 17 - Formas tripomastigotas sanguíneas do <i>Trypanosoma cruzi</i>	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Frações e massas de material obtido após fracionamento com resina XAD-2 do resíduo do chá preto.....	25
Tabela 2 – Grupos de frações e massas de material obtido após fracionamento da fração 3 do extrato etanólico do resíduo do chá preto, em coluna com resina sephadex LH-20 em MeOH.....	26
Tabela 3 – Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz, δ , DMSO- d_6) para o flavonoide hiperosídeo.....	32
Tabela 4 – Atividades antiparasitárias e citotoxicidade do hiperosídeo e da quercetina.....	33

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

°C – Graus Celsius

AcOEt - Acetato de etila

CC - Cromatografia em coluna

CC₅₀ – Concentração citotóxica a 50%

CE₅₀ – Concentração efetiva a 50%

CCD - Cromatografia em Camada Delgada

d - Duplete

dd - Duplo duplete

DMSO-d₆ - Dimetilsulfóxido deuterado

g – Gramas

Hz - Hertz

IS – Índice de Seletividade

J - Constante de acoplamento

m – Multiplete

MeOH - Metanol

mg – Miligramas

NCTC – Coleção Nacional Tipo de Cultura

P.A. – Pureza Analítica

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

RMN de ¹³C - Ressonância Magnética Nuclear de carbono 13

RMN de ¹H - Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio

s – Simpleto

SFB – Soro Fetal Bovino

UV – Ultravioleta

δ_C – Deslocamento químico do carbono

δ_H – Deslocamento químico do hidrogênio

μL – Microlitros

μM – Micromolar

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1 Chá preto	10
1.2 Resíduo do chá preto	12
1.3 Polifenóis dos chás da planta <i>Camellia sinensis</i>	13
1.4 Flavonoide hiperosídeo	16
1.5 Doença de Chagas	17
2. OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo geral	21
2.2 Objetivos específicos	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1 Procedimentos gerais	22
3.2 Solventes e reagentes	22
3.3 Estudo fitoquímico	22
3.3.1 <i>Aquisição do chá</i>	22
3.3.2 <i>Preparação do extrato da infusão e do resíduo do chá preto</i>	23
3.3.3 <i>Fracionamento cromatográfico dos extratos das folhas de chá preto</i>	24
3.4 Ensaio biológico	26
3.4.1 <i>Cultura de parasitas</i>	26
3.4.2 <i>Células de Mamífero NCTC</i>	26
3.4.3 <i>Determinação in vitro de Concentração Efetiva 50% (CE₅₀)</i>	27
3.3.4 <i>Citotoxicidade</i>	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1 Caracterização estrutural do hiperosídeo	28
4.2 Avaliação da atividade antiparasitária	33
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	37
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
ANEXOS	45

1. INTRODUÇÃO

As plantas medicinais são uma alternativa terapêutica há milhares de anos, principalmente nos países do Oriente Médio e na Ásia. Historicamente, várias espécies são utilizadas no tratamento de vários distúrbios de saúde, na prevenção de inúmeras doenças (DONADEL, *et al.*, 2022). Em 1978, a Organização Mundial da Saúde (OMS) passou a reconhecer o uso de plantas medicinais e fitoterápicos como estratégias efetivas em saúde, validando suas propriedades curativas, profiláticas e paliativas (IBIAPINA, *et al.*, 2014). No Brasil, a temática foi abordada na 8ª Conferência Nacional, em 1986, definindo-se que práticas alternativas de assistência à saúde deveriam ser parte do Sistema Único de Saúde (SUS), ainda em construção, permitindo ao usuário escolher a terapêutica desejada.

O uso de terapias menos onerosas para o tratamento de enfermidades crônico-degenerativas representa um ganho importante nos investimentos humanos e financeiros empregados na área de saúde (PEDROSO, *et al.*, 2021). Neste sentido, folhas e galhos usados para fazer chás, são uma fonte rica e de fácil acesso de plantas medicinais, como o chá preto, proveniente da planta *Camellia sinensis*, pertencente à família *Theaceae*, que se destaca pela sua conhecida atividade antioxidante (XU, QIAO & HUANG, 2022).

1.1 Chá preto

O chá preto é uma bebida popular originária da China, sendo responsável por aproximadamente 75% do consumo de chá em todo o mundo (XU, QIAO & HUANG, 2022). É bem recebido por consumidores de diferentes idades, lugares, culturas e sociedades, devido ao seu sabor atraente e forte e aos benefícios para a saúde. Em geral, seu processo de produção inclui cinco etapas: murchamento, laminação, fermentação, secagem e classificação (WU, *et al.*, 2019; LEE, *et al.*, 2016; SAMANTA, *et al.*, 2015). O processo de fermentação é a etapa mais crítica devido ao poderoso efeito no sabor e na qualidade do chá preto. Embora a fermentação excessiva do chá preto gere um sabor azedo, a fermentação

insuficiente pode resultar em “infusão verde”, dando uma sensação de ressecamento na boca (BHATTACHARYYA, *et al.*, 2007 a,b).

A composição do chá varia com a estação do ano, o clima, a idade da folha e a variedade do chá (GRAHAM, 1992). No caso dos chás provenientes da planta *Camellia sinensis*, como o chá verde, branco e preto, um dos compostos fenólicos mais interessantes são os da classe dos flavan-3-óis, (catequinas, em especial, epigallocatequina e epicatequina), sendo potentes antioxidantes e inibidores da lipoperoxidação, protegendo componentes proteicos e DNA celular (VINSON; DABBAGH, 1998; HIGDON; FREI, 2003; GIADA; FILHO, 2006; DOU *et al.*, 2008).

A mudança entre o chá verde, branco e preto ocorre no processamento das folhas usadas para a extração do chá. Para a obtenção do chá preto, as folhas são secadas, reduzindo-se o seu conteúdo de umidade, até que sua massa seja 55% da folha original. Posteriormente, as folhas são trituradas em rolos para rompimento das paredes celulares e exposição das catequinas ao oxigênio do ar e à enzima polifenoloxidase contida no meio celular, iniciando assim a oxidação e dimerização convertendo os polifenóis catequinas em teaflavinas (TFs), tearubiginas (TRs) e teasinensinas. Por fim, as folhas são tostadas, na qual, a oxidação é interrompida por aplicação de calor. No caso do chá verde, ocorre a inativação da enzima polifenoloxidase por injeção de vapor ou calor direto e em seguida, as folhas são secadas e tostadas (MUTHUMANI & KUMAR, 2007; STODT *et al.*, 2014).

Os constituintes químicos do chá preto são objetos de investigação há bastante tempo, sendo descritos uma variedade de compostos, principalmente compostos fenólicos, os quais têm atraído muita atenção da comunidade científica pelas propriedades biológicas, como as catequinas e as teaflavinas, que possuem atividades antitumorais, como redução da ligação carcinógeno-DNA, proteção da comunicação célula-célula (NIMBALKAR, GANGAR, SHAI, *et al.*, 2022), retardo de crescimento e morte apoptótica seletivamente em células cancerígenas (AGGARWAL, *et al.*, 2022) e muitas outras funções protetoras no mecanismo cancerígeno estudado *in vitro*.

O polifenol teaflavina foi descoberto pela primeira vez no início da década de 1960 e explorado extensivamente depois disso, porém não foi feito muito progresso em outros polifenóis desconhecidos, que constituem uma parte significativa dos constituintes do chá preto, compostos estes que normalmente são descartados após o preparo da bebida (STODT, *et al.*, 2015. YASSIN, *et al.*, 2015).

1.2 Resíduo do chá preto

O chá preto, preparado a partir das folhas da *Camellia sinensis*, é responsável pela maior parte do chá consumido em todo o mundo. Depois que o chá é preparado, as folhas de chá usadas tornam-se resíduos e precisam ser descartadas. Com exceção de uma pequena porcentagem que é usada como matéria-prima agrícola (ARVANITOYANNIS & VARZAKAS, 2008), esses resíduos de chá são atualmente incinerados ou enviados para aterros. Uma grande quantidade de subprodutos vegetativos é emitida como biomassa pelas indústrias alimentícias. Os constituintes químicos desses subprodutos, como celulose e hemiceluloses, lignina, proteínas, lipídios e extrativos de baixa massa molecular, são atraentes como recursos renováveis para matérias-primas nas indústrias químicas (KAMM & KAMM, 2004) como substituição de polímeros, fibra de carbono, cola e ligantes (ZHANG, 2008).

No Japão, resíduos de chás verde, preto e oolong (chá semi-oxidado, possui oxidação entre o chá verde e o chá preto), são um dos principais subprodutos dos alimentos industriais (TSUBAKI, *et al.*, 2010). Visando a economia circular, são feitos diversos estudos no país acerca da composição química desses resíduos. O Brasil, no entanto, não está entre os maiores consumidores de chás, porém espera-se um crescimento de 43% desse mercado entre 2019 e 2023, levando em conta o aumento da procura por alimentos e bebidas saudáveis e o surgimento crescente de lojas e estabelecimentos especializados na venda de chás no país (SEBRAE, 2019), sendo necessária uma maior atenção para o descarte desses resíduos no país.

Como comentado anteriormente, as folhas de chá contêm polifenóis, antioxidantes com muitas propriedades biológicas benéficas (SHARMA & RAO, 2009; DRYNAN, *et al.*, 2010). Recuperando as formas ativas dessas substâncias

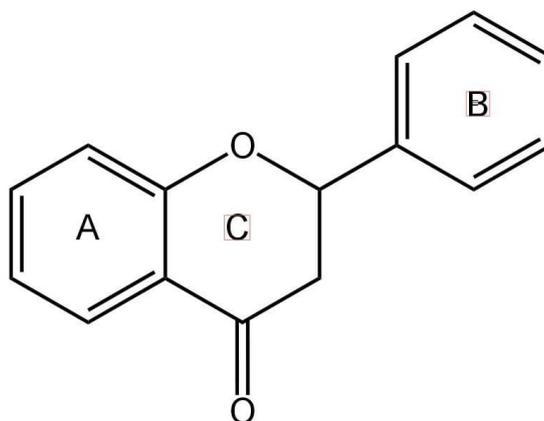
dos resíduos do chá preto, elas poderão ser usadas em suplementos, medicamentos, cosméticos e outros. Conforme resultados de um artigo de 2012, cujos polifenóis dos resíduos de chá preto inibiram a lipase pancreática, na qual, poderiam ser usados como suplementos dietéticos para a prevenção e tratamento da obesidade (YUDA, *et al.*, 2012).

1.3 Polifenóis dos chás da planta *Camellia sinensis*

Os polifenóis ou compostos fenólicos, são compostos bioativos de origem vegetal, que não são sintetizados pelo nosso corpo, e apresentam ação protetora na saúde humana quando consumidos em quantidades significativas. Eles possuem em sua estrutura química múltiplas unidades fenólicas, destacando-se, entre esses compostos, os flavonoides. Estes são biossintetizados a partir da via dos fenilpropanóides e podem ser encontrados na forma não glicosilada, conhecida como aglicona ou genina, ou ligados a uma molécula de açúcar, forma conjugada denominada de glicosídeo ou heterosídeo (LAGO, *et al.*, 2014; ZUANAZZI, *et al.*, 2017).

A estrutura básica dos flavonoides, em geral, consiste em um núcleo fundamental, constituído de quinze átomos de carbono arranjados em três anéis (C6-C3-C6), sendo dois anéis fenólicos substituídos (A e B) e um pirano (cadeia heterocíclica C) acoplado ao anel A, como esquematizado na Figura 1 (GRECCO, *et al.*, 2021; LI, 2007).

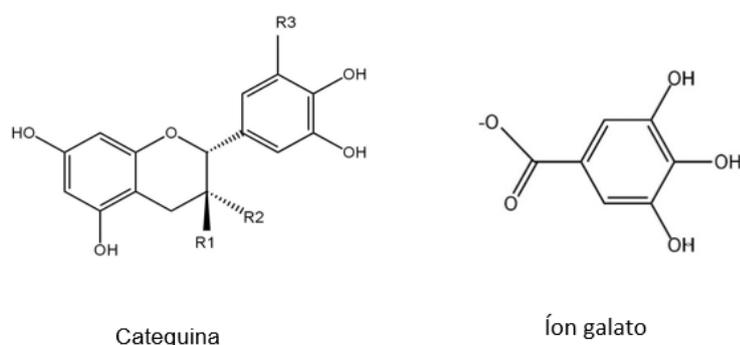
Figura 1 – Estrutura molecular básica dos flavonoides.



São compostos conhecidos como flavonoides as flavonas, isoflavonas, antocianinas, flavonóis e flavanóis. No chá verde são encontrados em sua composição principalmente os flavonóis e flavanóis. Para o chá preto, o grupo de compostos característicos são as teaflavinas, que são polifenóis, mas não são classificados como flavonoides (XI & JIANG, 2019; MATSUBARA, 2001).

As teaflavinas que estão em maior quantidade são produzidas a partir da condensação oxidativa entre epicatequinas (EC) e epigalocatequinas (EGC), conforme ilustrado na Figura 2.

Figura 2 – Estrutura molecular das catequinas.

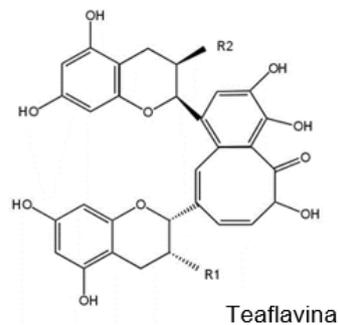


1. (+)Catequina = R1=OH; R2=H; R3=H
- 1.a (-)Epigalocatequina (EGC) = R1=H; R2=OH; R3=OH
- 1.b (-)Epigalocatequinagalato (ECGC) = R1=H; R2=galato; R3=OH
- 1.c (-)Epigacatequina (EC) = R1=H; R2=OH; R3=H
- 1.d (-)Epigacatequinagalato (ECG) = R1=H; R2=galato; R3=H

Fonte: autoria própria (KingDraw®).

Teasinensinas são dímeros formados pelo acoplamento oxidativo da epigalocatequina (EGC) ou galato-epigalocatequina (EGCG) (HASHIMOTO, *et al.*, 1988), nos quais dois anéis B de catequinas são conectados por meio de ligações covalentes do tipo C-C, conforme mostrado na Figura 3 (LI, *et al.*, 2013). Elas são responsáveis por grande do sabor da infusão do chá preto e contribuem para a formação da sua cor, que varia entre amarelo e marrom (TAKEMOTO & TAKEMOTO, 2018).

Figura 3 – Estrutura molecular das teaflavinas.

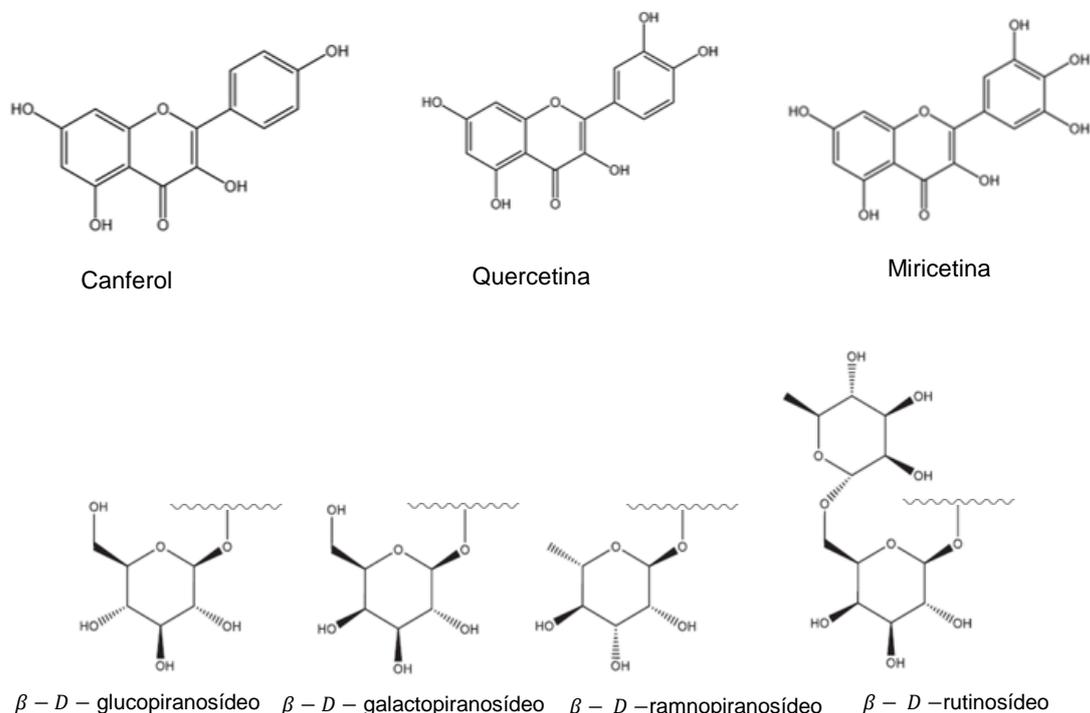


- 2. Teaflavina (EC + EGC)= R1=OH; R2=OH
- 2.a Teaflavina-3-galato (ECG + EGC)= R1=galato; R2=OH
- 2.b Teaflavina-3'-galato (EC + ECGC)= R1=OH; R2=galato
- 2.c Teaflavina-3-3'-digalato (ECG + ECGC)= R1= galato; R2= galato

Fonte: Autoria própria (KingDraw®).

Os flavonoides, como a quercetina e a miricetina, são também observados em quantidades consideráveis no chá de *Camellia sinensis* (SAITO & MIYATA, 2000). Os flavonoides glicosilados representam cerca de 2% a 3% do material do extrato aquoso (chá) e são menos encontrados em quantidades significativas em bebidas de chá devido à sua baixa solubilidade em água, mas são importantes compostos adstringentes no chá preto (MIEAN & MOHAMED, 2001; ENGSTRÖM, PÄLIJÄRVI, & SALMINEN, 2015; SOUZA *et al.*, 2020). O hiperosídeo é um importante flavonoide glicosilado encontrado na bebida e sua aglicona é representada pela quercetina, mostrada na Figura 4.

Figura 4 - Principais flavonoides glicosilados no chá de *Camellia sinensis*.



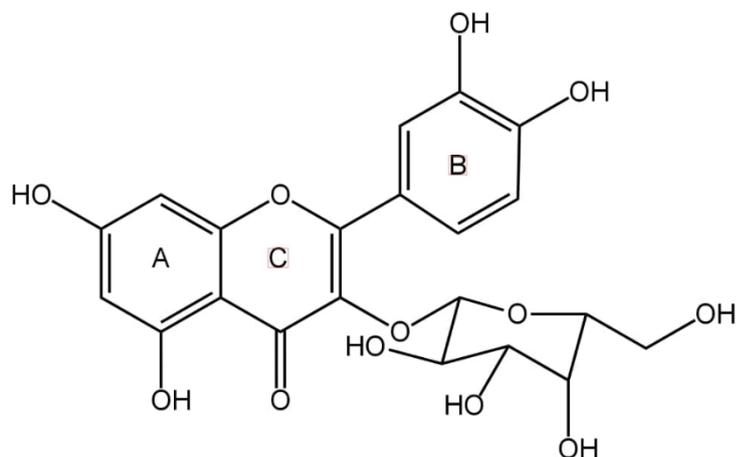
Fonte: Tea as a food ingredient, 2022 (Adaptado).

1.4 Flavonoide hiperosídeo

O hiperosídeo (quercetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo, Figura 5) é um metabólito sintetizado por algumas plantas com o objetivo principal de proteção a estresses abióticos e bióticos. Pertence ao grupo dos flavonóides glicosilados, sendo um dos flavonóides ativos no chá preto, encontrado também em diferentes espécies vegetais como *Hypericum perforatum* (Butterweck, *et al.*, 2000), *Apocynum venetum* (Zheng, *et al.*, 2012), espécies de *Hypericum* nativas do Rio Grande do Sul (Dall'Agnol, *et al.*, 2003) e entre outras.

Diversos estudos demonstram que esse flavonoide possui diversas atividades biológicas, como antioxidante (SUKITO & TACHIBANA, 2014), anti-inflamatória (YANG, YAO e LI, 2021), antiviral (WU, 2016), proteção de órgãos (ZHOU, *et al.*, 2021) e atividades antitumorais (DONG, *et al.*, 2021; KONG, *et al.*; 2020).

Figura 5 - Estrutura molecular do hiperosídeo.



Fonte: Autoria própria (KingDraw®).

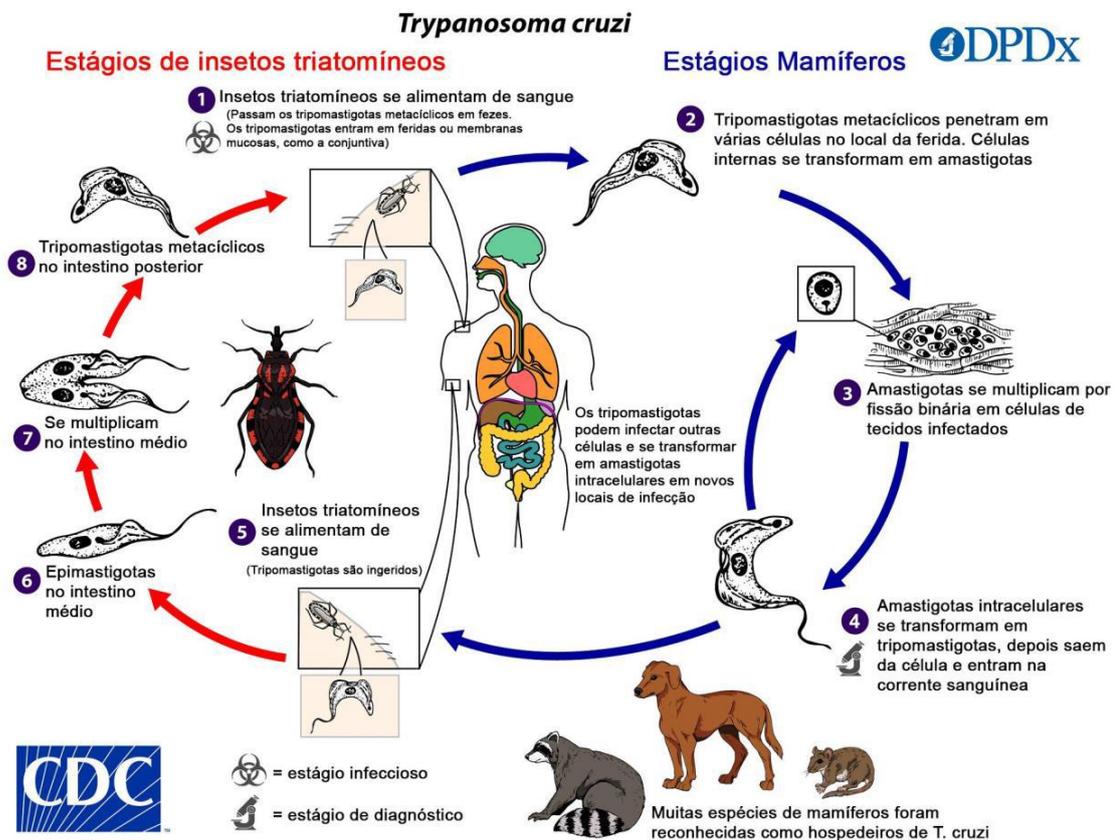
O hiperosídeo foi extraído e isolado pela primeira vez de *Hypericum perforatum* L. em 1937 (JERZMANOWSKA, 1937) e ocorre como um sólido amarelo e sua aglicona é a quercetina (GAO, 2009). Considerando o baixo teor e a difícil extração desse composto, costumam empregar métodos químicos e biossintéticos para obter o hiperosídeo (XU, 2022). Sua atividade antioxidante pode estar relacionada aos grupos hidroxila nos anéis A e B e aos glicosídeos ligados ao anel C (CHEN, 2002), enquanto seu efeito analgésico pode estar relacionado ao 3-galactopiranosídeo (ZHOU, 2002). Estudos anteriores relacionaram os compostos acetil hiperosídeo e quercetina com a atividade antiparasitária da *Trypanosoma cruzi* (BOUTALEB-CHARKI, SAMIRA et al., 2011).

1.5 Doença de Chagas

A doença de Chagas, conhecida também por tripanossomíase americana é causada por um protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, e que inclui passagem obrigatória por vários hospedeiros mamíferos, ou seja, é uma doença antropozoonose, primária em animais e que pode ser transmitida ao ser humano. Os insetos transmissores (triatomíneos) possuem várias denominações, dentre elas: barbeiro, chupões e procotó, possuem hábitos noturnos e são encontrados

geralmente em locais de baixa renda, principalmente em casas de pau-a-pique, onde o inseto se esconde dentro dos buracos de barro durante o dia (MANDAL, 2014). Os sintomas dessa doença dependem das diferentes fases clínicas, passando por inflamações e inchaço local, nas pernas e braços e no local da picada do barbeiro, até a insuficiência cardíaca levando a casos de falecimento por arritmia cardíaca (BRASIL, 2021; BERN, *et al.*, 2017).

A infecção pelo *T. cruzi* pode ocorrer em diferentes rotas de transmissão, como por via vetorial, que continua sendo a via predominante e clássica de contaminação através do triatomíneo hematófago. A transmissão por via oral é ocasionada pelo consumo de alimentos contaminados, como açaí, cana-de-açúcar ou frutas contendo as fezes ou vetor com as formas tripomastigotas de *T. cruzi*. Em contrapartida, existem outras vias de transmissão, como por via transfusional, congênita, vertical (ocorre durante a gestação e no pós-parto, entre a mãe e o bebê) e acidental (causado pelo contato com algum material contaminado com o parasita) (BERN, *et al.*, 2019). O protozoário possui três formas evolutivas principais no seu ciclo biológico: formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas. As formas epimastigotas e amastigotas se replicam no intestino posterior do vetor triatomíneo e por fissão binária em células de mamíferos, respectivamente. Enquanto as formas tripomastigotas estão presentes em dois estágios distintos do ciclo de vida: na corrente sanguínea do hospedeiro mamífero e no reto e fezes dos vetores, como tripomastigotas metacíclicos, conforme apresentado na Figura 6 (ACOSTA, *et al.*, 2017).

Figura 6 - Transmissão e ciclo de vida da *Trypanosoma cruzi*.

Fonte: Centros de Controle e Prevenção de Doenças - CDC (Adaptado).

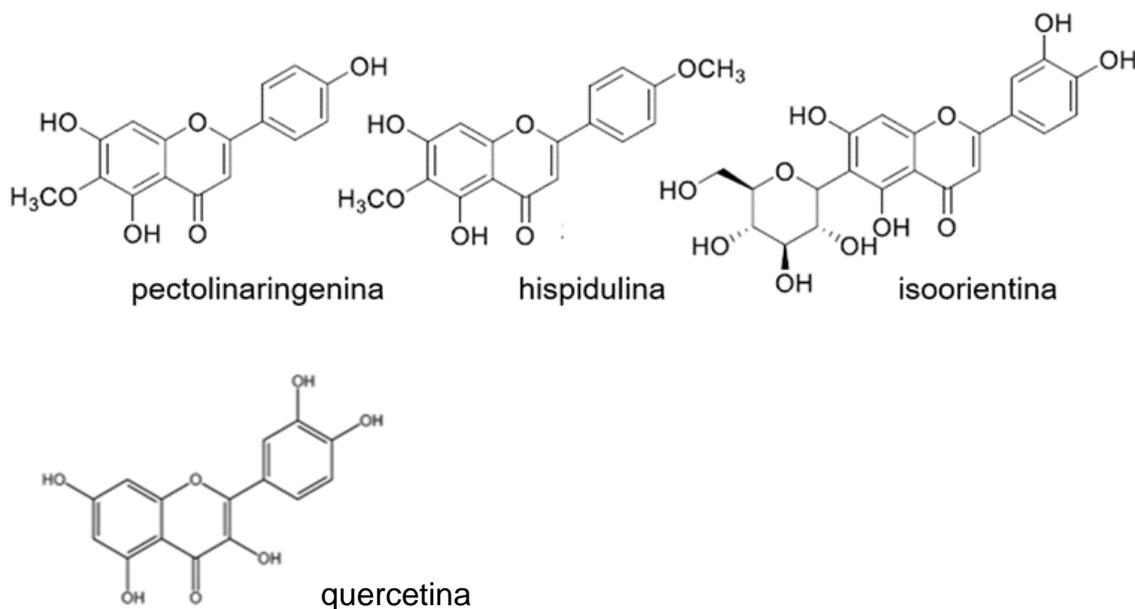
A Doença de Chagas, faz parte do grupo de doenças infecciosas e parasitárias com prevalência em regiões tropicais e subtropicais, especialmente em áreas empobrecidas e são classificadas como doenças tropicais negligenciadas (DTN). Estas doenças afetam globalmente milhões de pessoas e são responsáveis por mais de meio milhão de mortes anualmente (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2021). No cenário atual, a Doença de Chagas é uma das sete DNTs que acometem o Brasil, na qual, as áreas mais afetadas são o Norte e o Nordeste (COSTA, *et al.*, 2020).

Como esta doença afeta principalmente as populações pobres dos países em desenvolvimento e marginalizadas socioeconomicamente, o desenvolvimento de novos medicamentos para seu combate não é uma prioridade para a indústria farmacêutica (LAURELLA, 2023). Além disso, o alto custo do tratamento, o surgimento de resistência em estágios mais avançados da doença, o modo de administração, a alta toxicidade e a baixa biodisponibilidade são algumas das lacunas das terapias atuais para Doença de

Chagas, que se concentram em dois medicamentos: benznidazol e nifurtimox (JOSHI, QUADIR e YADAV, 2021). Estes motivos citados, impulsionam crescentes estudos sobre produtos naturais como uma alternativa terapêutica para essas doenças.

Neste contexto, na busca por moléculas novas e promissoras frente a essa doença, pesquisas anteriores relataram potenciais inibições dos flavonoides contra o protozoário *Trypanosoma cruzi*, como é o caso da pectolinarigenina, hispidulina, isoorientina e quercetina (BARBOSA, *et al.*, 2022), mostrados na Figura 7.

Figura 7 – Estruturas moleculares de flavonoides com ação anti-*Trypanosoma cruzi*.



Fonte: BARBOSA, *et al.*, 2023 (Adaptado).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo o isolamento e a caracterização estrutural do flavonoide majoritário (hiperosídeo) do extrato etanólico do resíduo do chá preto, além de avaliar o potencial da substância frente às formas tripomastigota e amastigota do protozoário *Trypanosoma cruzi*.

2.2 Objetivos específicos

- Isolar o flavonoide majoritário da fração etanólica do resíduo de chá preto;
- Caracterizar tal flavonoide por meio de métodos espectroscópicos;
- Avaliar a atividade biológica do flavonoide frente ao *Trypanosoma cruzi*, por meio da determinação dos valores de concentração efetiva CE_{50} , frente a forma tripomastigota e amastigota do parasita;
- Avaliar a citotoxicidade CC_{50} do flavonoide purificado frente as células NCTC.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Procedimentos gerais

Para a eliminação de solventes, tanto da infusão como da extração do resíduo, foi utilizado um rotaevaporador da marca Büchi® de modelo R-215 equipado com controlador de vácuo modelo V-491 e bomba de vácuo modelo V-710.

As análises de cromatografia em camada delgada (CCD) foram utilizadas cromatofolhas de sílica 60 - F254 com espessura de 0,25 mm e suporte de alumínio da Merck®. Para a revelação das cromatofolhas foi utilizado uma câmara de irradiação em UV/VIS da marca Spence® em λ 254 e 356 nm.

Para o fracionamento cromatográfico foram utilizados como preenchimento as resinas XAD-2 da marca Merck® e Sephadex LH-20 da Sigma-Aldrich®.

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C foram registrados em espectrômetro Varian INOVA 500, operando a 500 MHz e 125 MHz, respectivamente, na Central Experimental Multiusuário da UFABC.

3.2 Solventes e reagentes

Os solventes utilizados para a extração e separações cromatográficas foram de grau P.A. das marcas Casa Americana® e Labsynth®. Para as análises de RMN, as amostras foram preparadas com metanol deuterado e DMSO deuterado da Sigma-Aldrich®.

3.3 Estudo fitoquímico

3.3.1 Aquisição do chá

Amostras comerciais de chá preto da marca Dr.Oetker foram adquiridas no supermercado da cidade de Santo André, Estado de São Paulo, entre os meses de maio e junho de 2023.

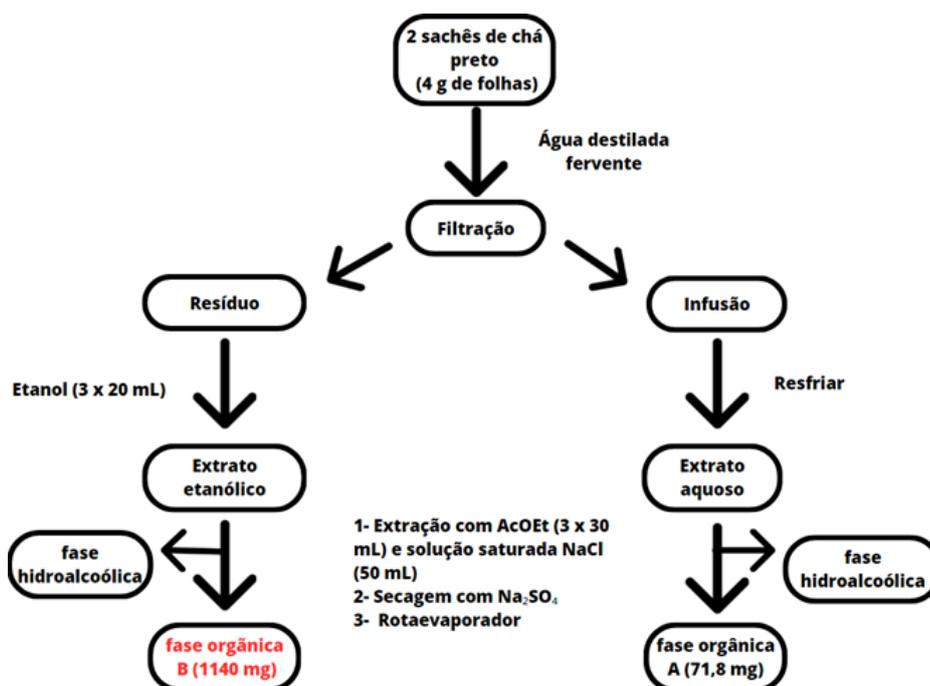
3.3.2 Preparação do extrato da infusão e do resíduo do chá preto

As amostras foram preparadas de modo semelhante ao recomendado nas embalagens.

Para o preparo da bebida, os sachês do chá preto (4g de folhas) foram submetidos a infusão de água destilada fervente (400 mL) por 4 minutos. Após esse tempo, as folhas foram filtradas, com papel de filtro qualitativo, e a infusão foi resfriada. Após esse processo, foi feita a extração com acetato de etila (3 x 30 mL) seguido da adição de solução saturada de cloreto de sódio (50 mL). Após secagem com sulfato de sódio e filtração, o solvente foi evaporado sob pressão em rotaevaporador.

As folhas filtradas, que são os resíduos da infusão, foram submetidas à secagem em estufa (35° C), durante dois dias e posteriormente à extração com etanol (3 x 20 mL). Após filtração e evaporação parcial do solvente em rotoevaporador, o resíduo foi extraído com acetato de etila (3 x 30 mL), seguida da adição de solução saturada de cloreto de sódio (50 mL). Após secagem com sulfato de sódio e filtração, o solvente foi evaporado sob pressão em rotaevaporador, conforme descrito na figura 8.

Figura 8 - Fluxograma de obtenção dos extratos de chá preto a partir da planta *Camellia sinensis*.



Fonte: Autoria própria.

3.3.3 Fracionamento cromatográfico dos extratos das folhas de Chá preto

A fase orgânica (B) do extrato etanólico (obtido pelo resíduo da infusão) foi submetida a fracionamento cromatográfico. Para tanto, a fase B foi fracionada em coluna (90 cm de comprimento e 2,5 cm de diâmetro) preenchida com resina XAD-2. Após aplicação do extrato, a mesma foi eluída com 400 mL de H₂O ácida (pH 2 com HCl), 400 mL de H₂O neutra, 350 mL de H₂O:MeOH na proporção 1:1 e por último 375 mL de MeOH. Deste processo foram obtidas seis frações (Figura 9 e Tabela 1).

Figura 9 - Fracionamento da coluna XAD-2 da fase orgânica (B) do extrato etanólico do resíduo do chá preto.



Fonte: Autoria própria.

Tabela 1 – Frações e massas de material obtido após fracionamento com resina XAD-2 do resíduo do chá preto.

Fração	Massa (mg)
1 (H ₂ O ácida)	874
2 (H ₂ O neutra)	17
3 (H ₂ O:MeOH)	119
4 (MeOH)	9
5 (MeOH)	57
6 (MeOH)	65

Fonte: Autoria própria

Após o fracionamento e secagem do solvente, as frações obtidas após a cromatografia do extrato etanólico do resíduo do chá preto foram analisadas por RMN e em cromatografia em camada delgada (CCD), usando, para tanto, o padrão de cafeína. Assim, foi possível observar alta concentração de cafeína na fração 3, além de outras substâncias fenólicas. Afim de extrair a cafeína, tal fração foi submetida ao fracionamento em resina sephadex LH-20, a qual, foi eluída com MeOH. Deste processo foram recolhidas 137 frações, que foram analisadas por CCD, com um sistema de eluente CHCl₃:MeOH (1:1) e sistema BAW (Butanol; ácido acético e água 4:1:5). Deste processo, foram reunidas em 6 grupos (A-F) de acordo com a semelhança após revelação sob luz UV, conforme mostra a Tabela 2.

Tabela 2 – Grupos de frações e massas de material obtido após fracionamento da fração 3 do extrato etanólico do resíduo do chá preto, em coluna com resina sephadex LH-20 em MeOH.

Grupo	Frações	Massa (mg)
A	1 a 25	8,6
B	26 a 29	13,6
C	30 a 41	8,9
D	42 a 59	7,6
E	60 a 123	43,2
F	123 a 137	37,3

Fonte: Autoria própria

As análises por RMN de ^1H e ^{13}C mostraram que, na fração C, foi possível obter o flavonoide hiperosídeo puro.

3.4 Ensaios biológicos

Os ensaios biológicos com os compostos: hiperosídeo, quercetina e benzimidazol foram realizadas no Laboratório de Novos Fármacos para Doenças Negligenciadas, do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, sob supervisão do Prof. Dr. André Gustavo Tempone Cardoso.

3.4.1 Cultura de parasitas

As formas tripomastigotas e amastigotas (cepa Y) de *Trypanosoma cruzi* foram coletadas de camundongos (*Mus musculus*), previamente infectados e empregadas para infectar culturas celulares LLC-MK2 (Células epiteliais renais de *Macaca mulatta*), em meio suplementado com RPMI-1640 com 2% de soro fetal bovino. (GRECCO, 2017). As culturas de células infectadas foram mantidas à 37 °C em estufa com 5% de CO₂.

3.4.2 Células de Mamífero NCTC

As células do tecido conjuntivo de camundongo, NCTC clone 929, do American Type Culture Collection (ATCC CCL-1), foram fornecidas pela Seção de Culturas Celulares do Instituto Adolfo Lutz, e armazenadas em nitrogênio

líquido ou freezer à -70 °C (FEBRONIO, 2021). Posteriormente foram mantidas em meio RPMI-1640, suplementado com 10% de SFB, sob temperatura de 37 °C em estufa com 5% de CO₂.

3.4.3 Determinação *in vitro* de Concentração Efetiva 50% (CE₅₀)

Para os ensaios contra as formas tripomastigota e amastigota de *Trypanosoma cruzi*, os compostos foram dissolvidos em DMSO e diluídos em meio RPMI-1640 em diferentes concentrações e incubados com os parasitas, sendo que a concentração de solvente não passou de 0,5%, de modo a não causar danos aos parasitas. Os compostos foram diluídos em série, utilizando o meio RPMI-1640, em placas de 96 poços e em seguida, as formas tripomastigotas e amastigotas de *Trypanosoma cruzi* foram semeadas na concentração de 1x10⁶ parasitas/poço. A placa foi incubada por 24h a 37 °C, em uma incubadora umidificada com 5% de CO₂. A viabilidade dos tripomastigotas e amastigotas foram verificadas pela adição de 20 µL do corante resazurina (Alamar Blue®) a 10% e as placas foram incubadas por mais 20h sob as mesmas condições. Após isso, a leitura das placas foi feita por absorbância em espectrofotômetro de placas (Filter Max F5 Multi-Mode Microplate Reader) no comprimento de onda de 570 nm (FEBRONIO, 2021 apud GEHRKE et al., 2013). O fármaco padrão benznidazol foi utilizado como controle positivo, e células não tratadas foram usadas como controle negativo.

3.4.4 Citotoxicidade

A citotoxicidade foi avaliada mediante o uso de células NTCT (clone 929), com concentração de 6x10⁴ células/poço. As células foram incubadas, com os compostos diluídos serialmente em meio RPMI-1640, o qual foi suplementado com 10% de SFB. A incubação foi feita em 37 °C, com 5% de CO₂, durante 48 horas. Em seguida, 20 µL de resazurina a 10% foi adicionada em todos os poços, que foram novamente incubados por mais 20h. A leitura das microplacas foi realizada como descrita anteriormente. O Índice de Seletividade (IS), apresentado na Equação 1, foi calculado com o objetivo de determinar a toxicidade dos flavonoides (hiperosídeo e quercertina).

$$IS = \frac{\text{Toxicidade (CC}_{50} \text{ em células de mamífero NCTC)}}{\text{CE}_{50} \text{ contra parasitas}} \quad (\text{Equação 1})$$

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

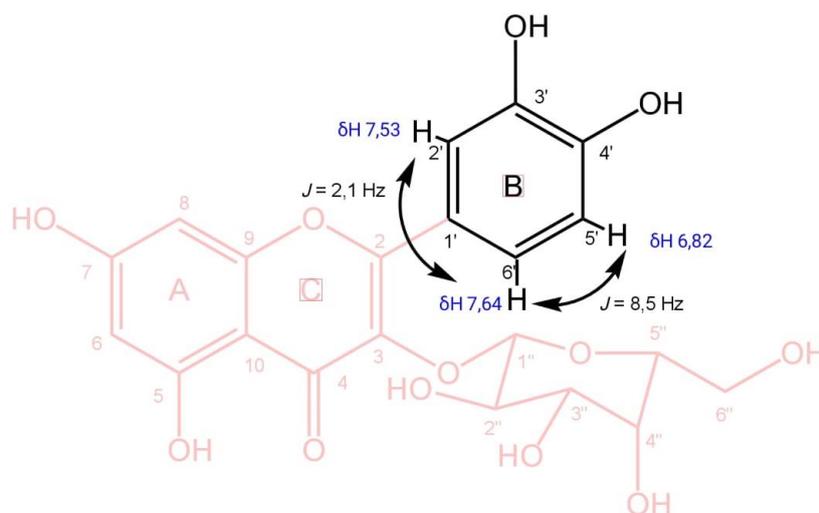
Após fracionamento cromatográfico em colunas de XAD-2 e sephadex LH-20 da fase em AcOEt do extrato EtOH do resíduo do chá preto foi possível obter um flavonoide puro (hiperosídeo), cuja a identificação estrutural foi identificada por meio de análise dos espectros de RMN e comparação com dados da literatura. Além disso, tanto o hiperosídeo quanto sua aglicona (quercetina) foram avaliados quanto a atividade anti-*T. cruzi* (formas tripomastigotas e amastigotas) e citotoxicidade frente a células NCTC.

4.1 Caracterização estrutural do hiperosídeo

O espectro de RMN ^1H (anexo espectro A) mostrou sinais entre δ_{H} 6,0 e 8,0 ppm característicos de hidrogênios de núcleos aromáticos e sinais entre δ_{H} 3,0 e 5,5 ppm característicos de glicosídeos.

Os sinais em δ_{H} 7,53 (d, $J = 2,1$ Hz, H-2'), 7,64 (dd, $J = 8,5$ Hz e 2,1 Hz, H-6') e 6,82 (d, $J = 8,5$ Hz (orto), H-5') referem-se aos hidrogênios trissubstituídos do anel aromático B do flavonoide, que possui hidroxilas nas posições 3' e 4', como observado na Figura 10.

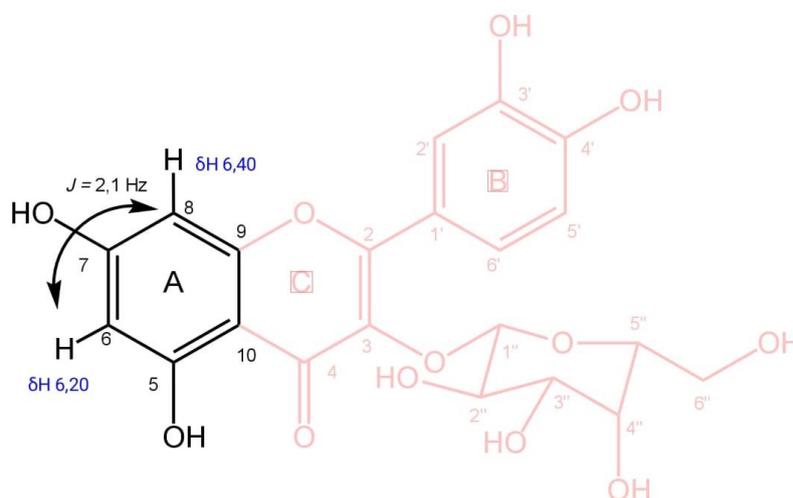
Figura 10 – Atribuição dos sinais de H-2', H-5' e H-6' do anel B, no espectro de RMN- ^1H do hiperosídeo.



Fonte: Autoria própria (KingDraw®).

Os dupletos observados em δ_H 6,40 (d, $J = 1,9$ Hz, H-8) e 6,20 (d, $J = 1,9$ Hz, H-6) foram atribuídos aos hidrogênios meta H-6 e H-8 do anel A do flavonoide, como mostrado na Figura 11.

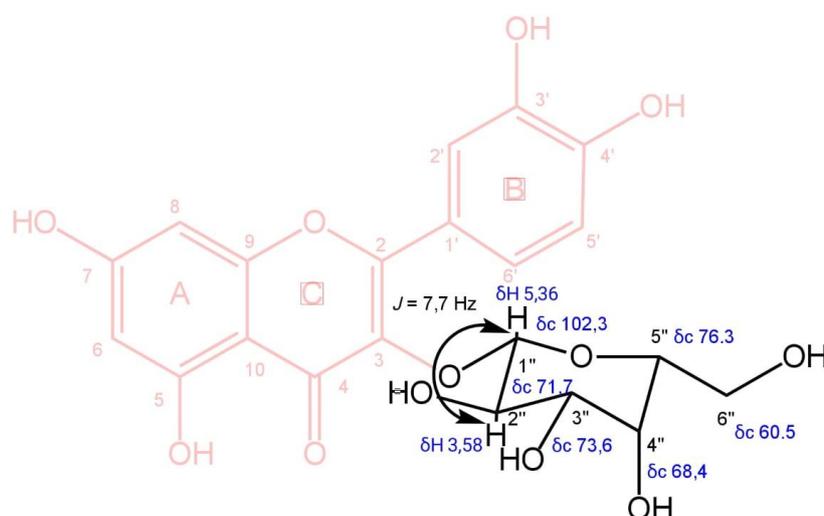
Figura 11 – Atribuição dos sinais de H-6 e H-8 do anel A, no espectro de RMN- 1H do hiperosídeo.



Fonte: Autoria própria (KingDraw®).

Adicionalmente, foi observada a presença de hidrogênio de carbono anomérico (H-1'') de carboidrato, em δ_H 5,36 (d, $J = 7,7$ Hz). Tal sinal, em conjunto com aqueles entre (C-1'' a C-6'') do espectro de carbono em δ_C 60,5 a 76,3, indicam a presença de uma galactose (WAN, *et al.*, 2012), deferindo que o composto isolado é um flavonoide glicosilado, conforme indica a Figura 12.

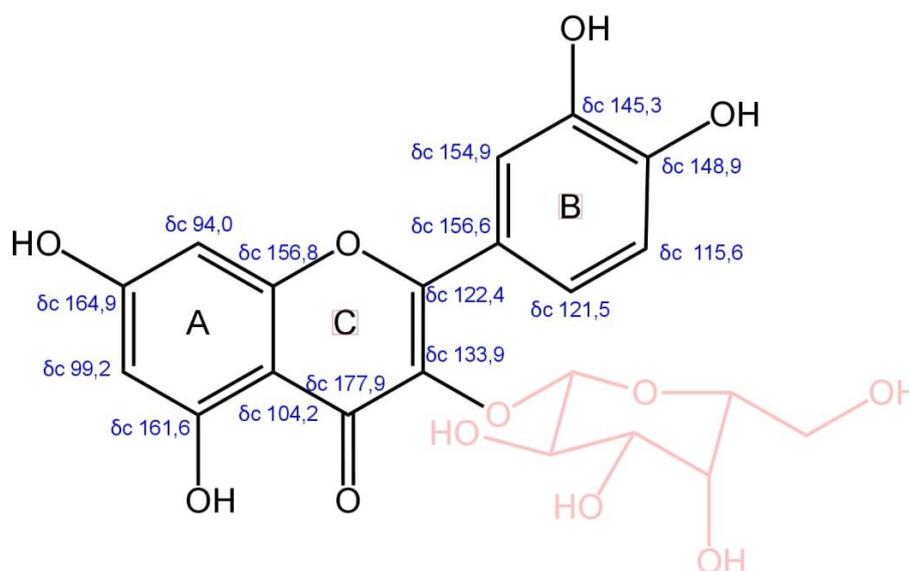
Figura 12 – Atribuição dos sinais de hidrogênio e carbono, do glicosídeo, nos espectros de RMN- 1H e ^{13}C do hiperosídeo.



Fonte: Autoria própria (KingDraw®).

Além disso, O espectro de RMN de ^{13}C (Anexo espectro B) indicou a presença de um sinal referente a um grupo carbonila em δ_c 177,9 (C-4). Ainda neste espectro, os carbonos aromáticos foram observados em δ_c 94,0 (C-8), 99,2 (C-6), 104,2 (C-10), 164,9 (C-2'), 115,6 (C-5'), 121,5 (C-6'), 122,4 (C-1'), 133,9 (C-3), 145,3 (C-3'), 156,6 (C-2), 148,9 (C-4'), 156,8 (C-9), 161,6 (C-5) e 164,9 (C-7) (Figura 13).

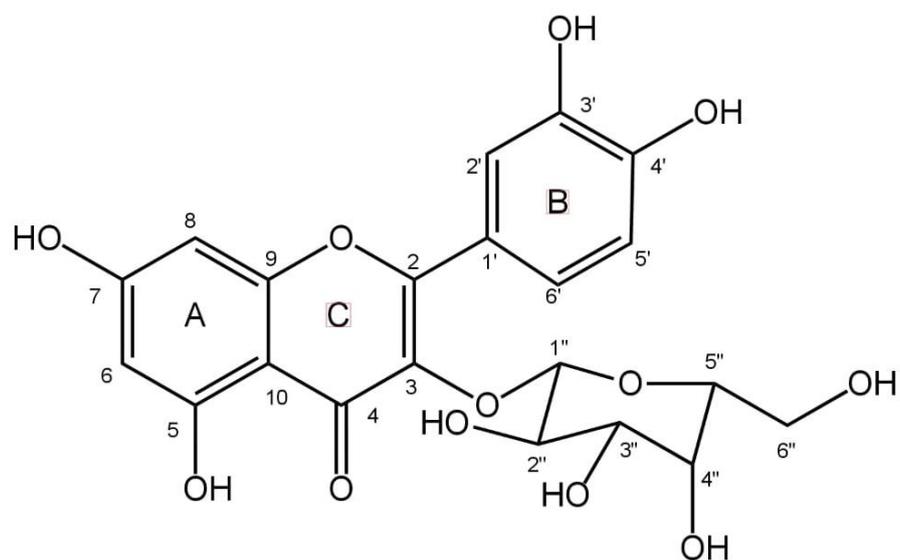
Figura 13 – Atribuição dos sinais de carbono, dos anéis A, B e C, no espectro RMN- ^{13}C do hiperosídeo.



Fonte: Autoria própria (KingDraw®).

Assim, a estrutura do flavonoide isolado da fase AcOEt do extrato EtOH do resíduo do chá preto foi deferida como a do hiperosídeo (quercetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo), como indicado na figura 14. Os dados dos espectros RMN- ^1H e ^{13}C estão organizados na Tabela 3.

Figura 14 – Estrutura molecular do hiperosídeo (quercetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo).



Fonte: Autoria própria (KingDraw®).

Tabela 3 – Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz, δ , DMSO- d_6) para o flavonoide hiperosídeo.

Posição	δ_{H} (multiplicidade, J em Hz)		δ_{C}	
	Experimental	Literatura*	Experimental	Literatura*
2	-	-	156,6	156,7
3	-	-	133,9	133,9
4	-	-	177,9	178,0
5	-	-	161,6	161,7
6	6,20 (d, 1,9)	6,20 (d, 2,0)	99,2	99,1
7	-	-	164,9	164,6
8	6,40 (d, 1,9)	6,41 (d, 2,0)	94,0	94,0
9	-	-	156,8	156,8
10	-	-	104,2	104,4
1'	-	-	121,5	121,5
2'	7,53 (d, 2,1)	7,53 (d, 2,2)	116,4	116,4
3'	-	-	145,3	145,3
4'	-	-	148,9	148,9
5'	6,82 (d, 8,5)	6,82 (d, 8,5)	115,6	115,6
6'	7,67 (dd, 8,5 e 2,1)	7,67 (dd, 8,4 e 2,2)	122,4	122,5
1''	5,36 (d, 7,7)	5,38 (d, 7,7)	102,3	102,2
2''	3,58 (m)	3,58 (m)	71,7	71,7
3''	3,38 (d, 3,2)	3,38 (d, 4,5)	73,6	73,6
4''	3,65 (sl)	3,65 (sl)	68,4	68,4
5''	3,34 – 3,28 (m)	3,33 – 3,26 (m)	76,3	76,3
6''	3,46 (dd, 10,0 e 5,5)	3,45 (dd, 9,9 e 5,6)	60,5	60,6

* (TANG, CUI, et al.,2020)

Fonte: Autoria própria.

4.2 Avaliação da atividade antiparasitária

O potencial antiparasitário do hiperosídeo foi avaliado *in vitro* frente à forma tripomastigota e a amastigota de *Trypanosoma cruzi* e frente à citotoxicidade em células de mamíferos (NCTC). Neste ponto vale destacar que, tendo em vista a unidade aglicônica presente na estrutura do hiperosídeo (quercetina), conforme a Figura 15, e a ocorrência deste flavonoide no laboratório, a mesma foi também usada para a avaliação do efeito da ausência da unidade glicosídica no potencial antiparasitário e da toxicidade, como indicado na Tabela 4.

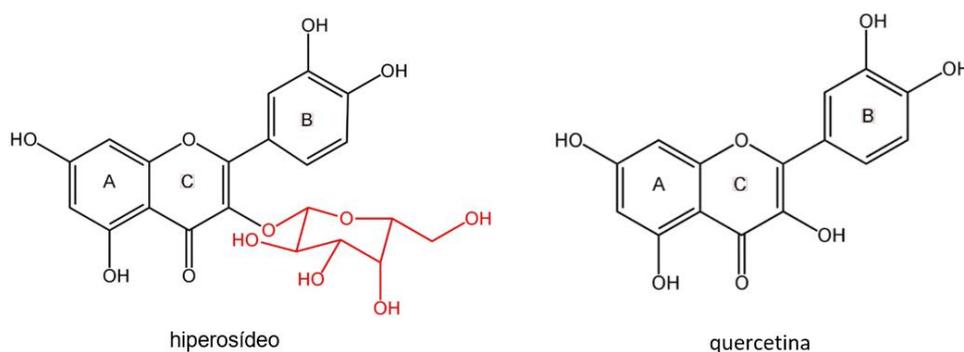
Tabela 4 — Atividades antiparasitárias e citotoxicidade do hiperosídeo e da quercetina.

Código da amostra	CE ₅₀ (μM)		Toxicidade CC ₅₀ (μM) NCTC	IS	
	Tripomastigota	Amastigota		Tripomastigota	Amastigota
Hiperosídeo	47,3 ± 3,9	35,4 ± 2,6	>200	>4,2	>5,6
Quercetina	42,4 ± 5,1	7,2 ± 3,8	>200	>4,7	>27,8
Benznidazol ^d	18,7 ± 4,1	5,5 ± 1,4	>200	>10,7	>36,4

CE₅₀: 50% Concentração efetiva; CC₅₀: 50% Concentração citotóxica; IS: Índice de Seletividade; d: Fármaco padrão.

Fonte: Autoria própria

Figura 15 – Estruturas moleculares do hiperosídeo e da quercetina.



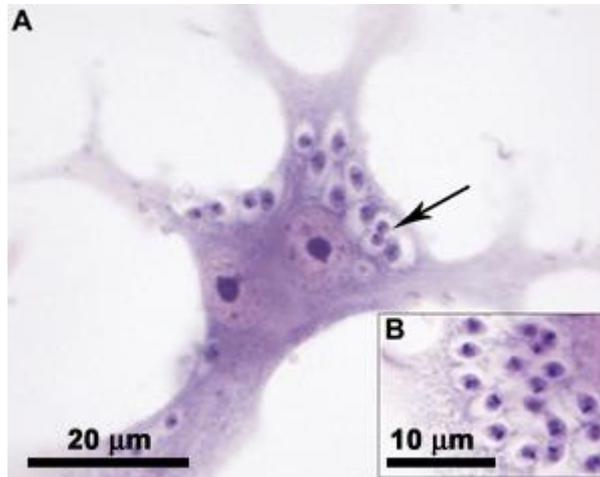
Fonte: Autoria própria (KingDraw®).

Os resultados obtidos nos ensaios frente à forma tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*, permitiram observar que tanto o hiperosídeo como a quercetina, são ativos, com valores de CE₅₀ 47,3 e 42,4 μM respectivamente. Quanto à forma amastigota, ambos os flavonoides também se mostraram ativos

contra o protozoário, porém em concentrações bem distintas, ou seja, CE_{50} de 35,4 e 7,2 μM respectivamente. Sendo assim, é possível inferir que a presença do grupo glicosídeo teve influência na atividade antiparasitária entre as formas da *Trypanosoma cruzi*.

Comparando as estruturas moleculares do hiperosídeo e da quercetina (Figura 15), cujas diferenças estruturais ocorrem somente na ausência ou presença do grupo glicosídeo ligado ao anel B do flavonoide, é possível fazer um estudo preliminar da atividade biológica frente às formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*. Uma possível explicação da quercetina apresentar resultados melhores que o hiperosídeo é por possuir uma estrutura química de caráter menos polar devido à ausência do grupo glicosídeo, favorecendo assim a atividade anti-*Trypanosoma cruzi* (MORTH, *et al.*, 2011). Como a forma amastigotas da *T.cruzi* é intracelular (Figura 16), esse favorecimento se deve à sua melhor capacidade lipofílica, difundindo-se mais facilmente através da membrana celular e conseqüentemente indicando maior inibição do parasita.

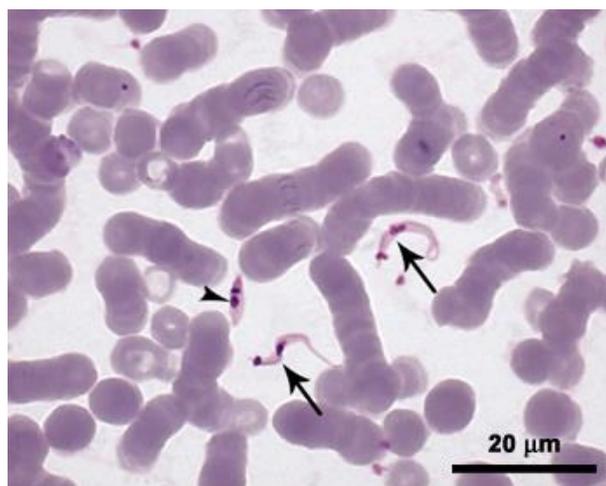
Figura 16 – Formas amastigotas intracelulares do *Trypanosoma cruzi*.



Fonte: Estudo de microscopia óptica (Portal da doença de chagas- Fiocruz).

Por outro lado, a forma tripomastigota (Figura 17) é extracelular e é a mais infecciosa de *Trypanosoma cruzi* em vários tipos celulares (DE SOUZA, 2002), nesta forma do parasita, os flavonoides não apresentaram diferença na citotoxicidade.

Figura 17 – Formas tripomastigotas sanguíneas do *Trypanosoma cruzi*.



Fonte: Estudo de microscopia óptica (Portal da doença de chagas- Fiocruz).

Quando testados frente às células NCTC, os flavonoides e o fármaco padrão da doença (benznidazol) não exibiram citotoxicidade em concentrações inferiores a 200 μM . Na literatura, estudos *in vitro* da administração oral de benznidazol, sugerem que ocorre um efluxo causado pelo acúmulo metabolizado desse fármaco nas células, o que explicaria o seu declínio na eficácia terapêutica na fase crônica da Doença de Chagas (PERDOMO, *et al.*, 2013). Conseqüentemente, altas doses de benznidazol seriam necessárias para atingir a concentração terapêutica, aumentando sua toxicidade e gerando efeitos colaterais. No caso da quercetina, foram feitos estudos *in vivo* (camundongos CD₂F₁ machos e fêmeas) da análise do efeito desse flavonoide no comportamento e nos processos metabólicos, indicando que não há efeitos colaterais adversos associados a uma dieta com infusão de quercetina nas doses analisadas (dose baixa, média e alta, calculadas de acordo com a massa do camundongo) (PATTON, *et al.*, 2022).

Por fim, os testes biológicos mostraram que o hiperosídeo é eficaz contra a forma tripomastigota e amastigota da *Trypanosoma cruzi*, assim a sua forma aglicona (quercetina) que apresentou potencial semelhante ao fármaco padrão da doença.

Na forma tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*, o hiperosídeo e a quercetina apresentaram novamente resultados bem similares entre si, quanto a seletividade (4,2 e 4,7 respectivamente). Na forma amastigota, o hiperosídeo e

a quercetina apresentam novamente valores bem diferentes entre si (5,6 e 27,8 respectivamente), na qual, comparados com a droga padrão, a seletividade da quercetina se mostra mais próxima que a do hiperosídeo. No geral, os valores de concentração efetiva e seletividade da quercetina são muito similares com os da droga padrão (benznidazol), na qual, por esse aspecto biológico, seria interessante adicionar o processo da hidrólise, na extração do resíduo do chá preto, para se obter o flavonoide hidrolisado (quercetina) a partir do flavonoide glicosilado (hiperosídeo).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho, o flavonoide hiperosídeo foi extraído da fração etanólica do resíduo de chá preto através de processos cromatográficos. A presença de sinais característicos do seu grupo glicosídeo foi observada nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C para a sua caracterização estrutural.

Com base no potencial antiviral, antioxidante e outros descritos na literatura sobre o hiperosídeo, ele foi analisado quanto ao seu potencial antiparasitário, avaliando frente as formas tripomastigota e amastigota do protozoário *Trypanosoma cruzi*, onde se mostrou ativo contra o protozoário nas suas duas formas e atóxico frente às células mamíferas (NCTC) na concentração testada. A forma hidrolisada do hiperosídeo (quercetina) mostrou resultados similares ao fármaco padrão benznidazol usado para o tratamento da Doença de Chagas, na qual, foi sugerido que a atividade antiparasitária possa ser aprimorada adicionando a hidrólise desse flavonoide após a sua extração do resíduo, em condições ácidas e temperaturas elevadas (90-120°C). O composto hidrolisado, portanto, pode ser utilizado futuramente no desenvolvimento de protótipos destinados ao combate da Doença de Chagas, sendo uma opção de origem natural e corroborando com a economia circular na indústria química e farmacêutica.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acosta, N. et al. **Hosts and vectors of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in the Chagas disease endemic region of the Paraguayan Chaco.** Parasitology, v. 144, n. 7, 2017, p. 884-898.

Aggarwal V.; Tania M.; Srivastava S., et al. **Molecular mechanisms of action of epigallocatechin gallate in cancer: Recent trends and advancement.** Seminars in Cancer Biology, 2022; p. 256-275.

Arvanitoyannis, I., Varzakas, T. 2008. **Vegetable waste treatment: comparison and critical presentation of methodologies.** Critical Reviews in Food Science and Nutrition, v. 48, 2008, p. 205-47.

Barbosa, H., et al. **The Potential of Secondary Metabolites from Plants as Drugs or Leads against *Trypanosoma cruzi*-An Update from 2012 to 2021.** Current Topics in Medicinal Chemistry, v. 23, 2023, p.159-213.

Bern, C. et al. **Chagas disease in the United States: a public health approach.** Clinical Microbiology Reviews, v. 33, n. 1, 2019.

Bern, C.; Kjos, S.; Yabsley, M.; Montgomery, S. ***Trypanosoma cruzi* and Chagas disease in the United States.** Clinical Microbiology Reviews, v. 24, 2011, p. 655-681.

Bhattacharyya, N., Seth, S., Tudu, B., et al. **Detection of optimum fermentation time for black tea manufacturing using electronic nose.** Sensors and Actuators B-Chemical, v. 122, n. 2, 2007a, p. 627–634.

Bhattacharyya, N., Seth, S., Tudu, B., et al. **Monitoring of black tea fermentation process using electronic nose.** Journal of Food Engineering, v. 80, n. 4, 2007b, p. 1146–1156.

Brasil. Ministério da Saúde. Doença de Chagas, 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/doenca-de-chagas>. Acesso em: 20 out. 2023.

Butterweck, V.; Jürgenliemk, G.; Nahrstedt, A.; Winterhoff, H. **Flavonoids from *Hypericum perforatum* show antidepressant activity in the forced swimming test.** *Planta Medica*, v. 66, 2000, p. 3-6.

Chen, J.; Zhu, Z.; Hang, K.; Yang, X. **Relationship between structure and activity of eight natural flavonoids against oxidation.** *Journal of East China Normal University (Natural Science)*. 2002, p. 90–95.

Costa, A., et al. **Prevalência da Infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em Doadores de Sangue.** *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 115, n. 6, 2020, p. 1082–1091.

Cunningham, P., Patton, E., VanderVeen, B., et al. **Triagem de toxicidade oral subcrônica de quercetina em camundongos.** *BMC complementary medicine and therapies*, p. 279.

Dall'agnol, R.; Ferraz, A.; Bernardi, A., et al. **Antimicrobial activity of some *Hypericum* species.** *Phytomedicine*, v. 10, 2003, p. 511-516.

Donadel, G., et al. **Safety Investigations of Two Formulations for Vaginal Use Obtained from *Eugenia uniflora* L. Leaves in Female Rats.** *Pharmaceuticals*, v. 15, n. 12, 2022, p.1567-1580.

Dou, Q.; Chan, T.; Smith, D. **Polyphenol proteasome inhibitors, synthesis, and methods of use.** United States Patent, 2008.

Drynan, J.; Clifford, M.; Obuchowicz J; Kuhnert N. **The chemistry of low molecular weight black tea polyphenols.** *Natural Product Reports*, v. 27, 2010, p. 417–62.

Engström, M.; Päljärvi, M.; Salminen, J. **Rapid fingerprint analysis of plant extracts for ellagitannins, gallic acid, and quinic acid derivatives and quercetin, kaempferol and myricetin based flavonol glycosides by UPLC-QqQ-MS/MS.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 63, n. 16, 2015, 4068–4079.

Estudo microscopia óptica. Portal da doença de chagas (fiocruz). Disponível em: <https://chagas.fiocruz.br/parasita/organizacao-estrutural/#:~:text=Amastigota%3A%20forma%20arredondada%2C%20com%2>

Ocinetoplasto,bem%20como%20em%20cultivo%20ax%C3%AAnico. Acessado em: 7 de nov. 2023.

Febrônio, J. **Metabólitos especiais de *Nectandra leucantha* (Lauraceae): Caracterização estrutural e avaliação da atividade antiparasitária**. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química) - Universidade Federal do ABC. Santo André, 2021.

Gao, T. ***Crataegus pinnatia* Bge Chemical Composition and Quality Specification Research**. Master's Thesis, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang, China, 2009.

Giada, M.; Filho, J. **Importância dos compostos fenólicos da dieta na promoção da saúde humana**. Revista Publicatio UEPG - Ciências Biológicas e da Saúde, v. 12, n. 4, 2006, p. 7-15.

Graham, H. **Green Tea Composition, Consumption, and Polyphenol Chemistry**. Preventive Medicine, v. 21, 1992, p. 334-350.

Grecco, S.; Sessa, D.; Lago, J.H. **Flavonoids of *Baccharis***. Baccharis, Springer International Publishing, 2021, p. 259-304.

Green, M.; Harari, G. **Association of serum lipoproteins and health-related habits with coffee and tea consumption in free-living subjects examined in the Israeli CORDIS study**. Cardiovascular Epidemiology Unit, Occupational Health and Rehabilitation Institute. Preventive Medicine, v. 21, n. 4, 1992, p. 532–545.

Higdon, J.; Frei, B. **Tea Catechins and Polyphenols: Health Effects, Metabolism, and Antioxidant Functions**. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, v. 43, n. 1, 2003, p. 89-143.

Ibiapina W.; Leitão B.; Batista M.; Pinto D. **Inserção da fitoterapia na atenção primária aos usuários do SUS**. Revista de Ciências da Saúde Nova Esperança, v.12, n. 1, 2014, p. 58-68.

Jerzmanowska, Z. **Hyperin, a glucoside of *Hypericum perforatum* L.** Chemical Abstracts, v. 64, 1937, p. 527.

Joshi G, Quadir SS, Yadav KS. **Road map to the treatment of neglected tropical diseases: Nanocarriers interventions.** Journal of Controlled Release, v. 339, 2021, p. 51-74.

Kamm, B.; Kamm, M. **Principles of biorefineries.** Applied Microbiology and Biotechnology, v. 64, 2004, p. 137–145.

Lago, J.H.; Toledo-arruda, A.; Mernak, M., et al. **Structure-Activity Association of Flavonoids in Lung Diseases.** Molecules, v. 19, n. 3, 2014, p. 3570-3595.

Laurella, L.; Rodriguez, R., et al. **Antiprotozoal compounds from *Mikania periplocifolia* (Asteraceae).** Fitoterapia, v. 167, 2023.

Li, J.; Jiang, Y. **Litchi Flavonoids: isolation, identification and biological activity.** Molecules, v. 12, n. 4, 2007, p. 745-758.

Mandal, S. **Epidemiological Aspects of Chagas Disease – a Review.** Journal of Infections Diseases & Preventive Medicine, v. 2, 2014, p. 2.

Matsubara, S. **Polifenóis em chás comercializados no Brasil.** Departamento de ciências de alimentos – Universidade Estadual de Campinas, SP, 2001.

Miean, K.; Mohamed, S. **Flavonoid (Myricetin, Quercetin, Kaempferol, Luteolin, and Apigenin) Content of Edible Tropical Plants.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 49, n. 6, 2001, p. 3106–3112.

Morth, J.; Pedersen, B.; buch-pedersen, M., et al. **A structural overview of the plasma membrane Na⁺, K⁺-ATPase ion pumps.** Nature Reviews Molecular Cell Biology, v. 12, 2011, p. 60-70.

Muthumani, T.; Kumar R. **Influence of fermentation time on the development of compounds responsible for quality in black tea.** Food Chemistry, v. 101, n. 1, 2007, p. 98-102.

Pedroso, R.; Andrade, G.; Pires, R. **Plantas medicinais: uma abordagem sobre o uso seguro e racional.** Physis: Revista de Saúde Coletiva, v. 31, 2021.

Perdomo, V., et al. **Modulation of biotransformation systems and ABC transporters by benznidazole in rats.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 57, n. 10, 2013, p. 4894–4902.

Rassi, A.; De Rezende, J. **American trypanosomiasis (Chagas disease)**. *Infectious Disease Clinics*, v. 26, n. 2, 2012, p. 275-291.

Relatório final da 8ª Conferência Nacional de Saúde [Internet]. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/8_conferencia_nacional_saude_relatorio_final.pdf. Acessado em 04 de nov. 2023.

Saito, T.; Miyata g. **The nutraceutical benefit. Part I: green tea**. *Nutrition*, v. 16, 2000, n. 5, p. 315-317.

Sebrae - Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. Sistema de Inteligência Setorial. Mercado de chá no Brasil e em Santa Catarina. Set. 2019. Disponível: <<https://atendimento.sebraesc.com.br/inteligencia/potencial-de-mercado/mercado-de-cha-nobrasil-e-em-santa-catarina>>. Acesso em: 01 de ago. 2023.

Sharma, V.; Rao, L. **A thought on the biological activities of black tea**. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2009, p. 379–404.

Shen, B.; Wu, N.; Shen, C., et al. **Hyperoside nanocrystals for HBV treatment: process optimization, *in vitro* and *in vivo* evaluation**. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 2016, p. 1772-1781.

Shiming, L.; Chih-Yu, L., et al. **Black tea: chemical analysis and stability**. *Food and Function*, 2013, p. 10-18.

Souza, N., et al. **Anti-inflammatory and antioxidant properties of blend formulated with compounds of *Malpighia emarginata* D.C (acerola) and *Camellia sinensis* L. (green tea) in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages**. *Biomed Pharmacother*. 128:110277, 2020.

Souza, W. **Structural organization of *Trypanosoma cruzi***. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, 2009, p. 89-100.

Stodt, U.; Blauth, N., et al. **Investigation of processes in black tea manufacture through model fermentation (oxidation) experiments**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, p. 7854-7861.

Stodt, U.; Stark, J.; Engelhardt, U. **Comparison of three strategies for the 466 isolation of black tea thearubigins with a focus on countercurrent chromatography.** 467 *J. Food Compos. Anal.* 2015, p. 160-168.

Sukito, A.; Tachibana, S. **Isolation of hyperoside and isoquercitrin from *Camellia sasanqua* as antioxidant agentes.** *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 2014, p. 999-1006.

Takemoto, M., Takemoto, H. **Synthesis of theafavins and their functions.** *Molecules*, 2018, p. 918.

Tang, C., et al. **Natural hyperoside based novel light-up fluorescent probe with AIE and ESIPT characteristics for on-site and long-term imaging of β -galactosidase in living cells.** Electronic Supplementary Material (ESI) for *Journal of Materials Chemistry C*. This journal is © The Royal Society of Chemistry, 2020.

Vinson, J.; Dabbagh, Y. **Effect of green and black tea supplementation on lipids, lipid oxidation and fibrinogen in the hamster: mechanisms for the epidemiological benefits of tea drinking.** *Chemistry Department, University of Scranton, FEBS Letters* 433, 1998, p. 44-46.

Wan, C. et al. **Antioxidant and α -glucosidase inhibitory phenolics isolated from highbush blueberry flowers.** *Food Chemistry*, v. 135, 2012, p. 1929-1937.

World Health Organization (WHO). 2021. Disponível em: <https://www.who.int/teams/control-of-neglected-tropical-diseases/overview>. Acessado em: 20 out. 2023.

Wu, H.; Huang, W., et al. **GC-MS-based metabolomic study reveals dynamic changes of chemical compositions during black tea processing.** *Food Research International*, 2019, p. 330-338,

Xu, S.; Chen, S.; Xia, W.; Sui, H.; Fu, X. **Hyperoside: A Review of Its Structure, Synthesis, Pharmacology, Pharmacokinetics and Toxicity.** *Molecules*, 2022, p. 3009.

Xu, Y.; Qiao, F.; Huang, J. **Black tea markets worldwide: Are they integrated?**. Journal of Integrative Agriculture, 2022, p. 552-565.

Yang, Y.; Yao, X.; Li, H.. **Study on the inhibitory effects of hyperoside on lipopolysaccharides-induced inflammatory response in mouse macrophage RAW264.7**. Journal of Traditional Chinese Medicine, 2021, p. 944-1040.

Yassin, G.; Koek, J.; Kuhnert, N. **Model system-based mechanistic studies of black tea thearubigin formation**. Food Chemistry, v. 180, 2015, p. 272-279.

Yuda, N. et al. **Polyphenols Extracted from Black Tea (*Camellia sinensis*) Residue by Hot-Compressed Water and Their Inhibitory Effect on Pancreatic Lipase *in vitro***. Journal of Food Science, v. 77, 2012, p.254-261.

Zeng, X.; Xi, Y.; Jiang, W. **Protective roles of flavonoids and flavonoid-rich plant extracts against urolithiasis: A review**. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2019, p. 1–11.

Zheng, M.; Liu, C.; Pan, F.; Shi, D.; Zhang, Y. **Antidepressant-like effect of hyperoside isolated from *Apocynum venetum* leaves: possible cellular mechanism**. Phytomedicine; v. 19, 2012, p. 145-149.

Zhou, J. **Synthesis of New Type Analgesic Drug-Hyperin and Its Derivatives**. Master's Thesis, Zhejiang University, Hangzhou, China, 2002.

Zhou, J.; Zhang, S., et al. **Hyperoside ameliorates diabetic nephropathy induced by STZ via targeting the miR-499-5p/APC axis**. Journal of Pharmacological Sciences, 2021, p. 10-20.

Zuanazzi, J.; Montanha, J., et al. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2017. p. 209-233.

ANEXOS

Espectro A1. Atribuição dos sinais referentes aos hidrogênios do anel B, no espectro de RMN ^1H da fração C (δ , DMSO- d_6 , 500 MHz)

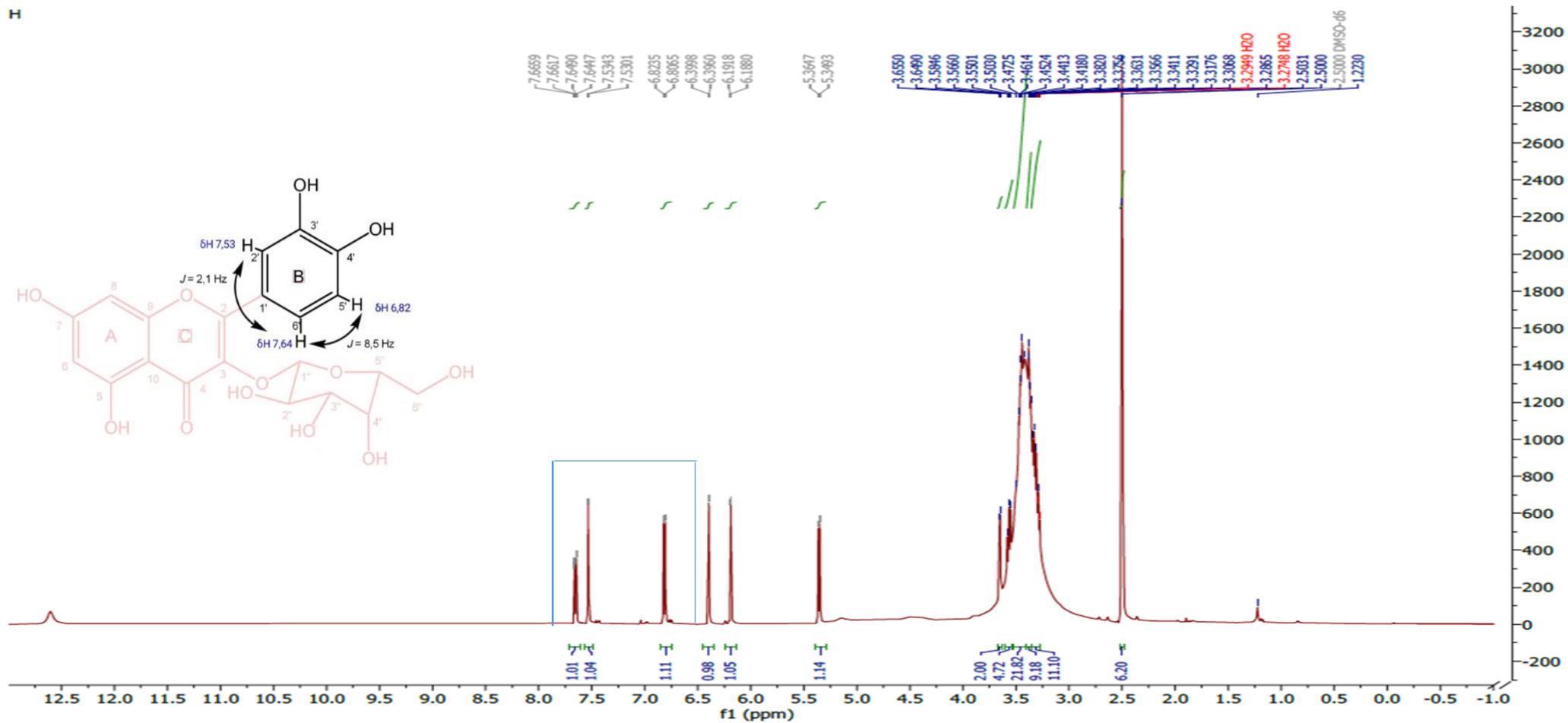
Espectro A2. Atribuição dos sinais referentes aos hidrogênios do anel A, no espectro de RMN ^1H da fração C (δ , DMSO- d_6 , 500 MHz)

Espectro A3. Atribuição do sinal referente ao hidrogênio da unidade de açúcar, no espectro de RMN ^1H da fração C (δ , DMSO- d_6 , 500 MHz)

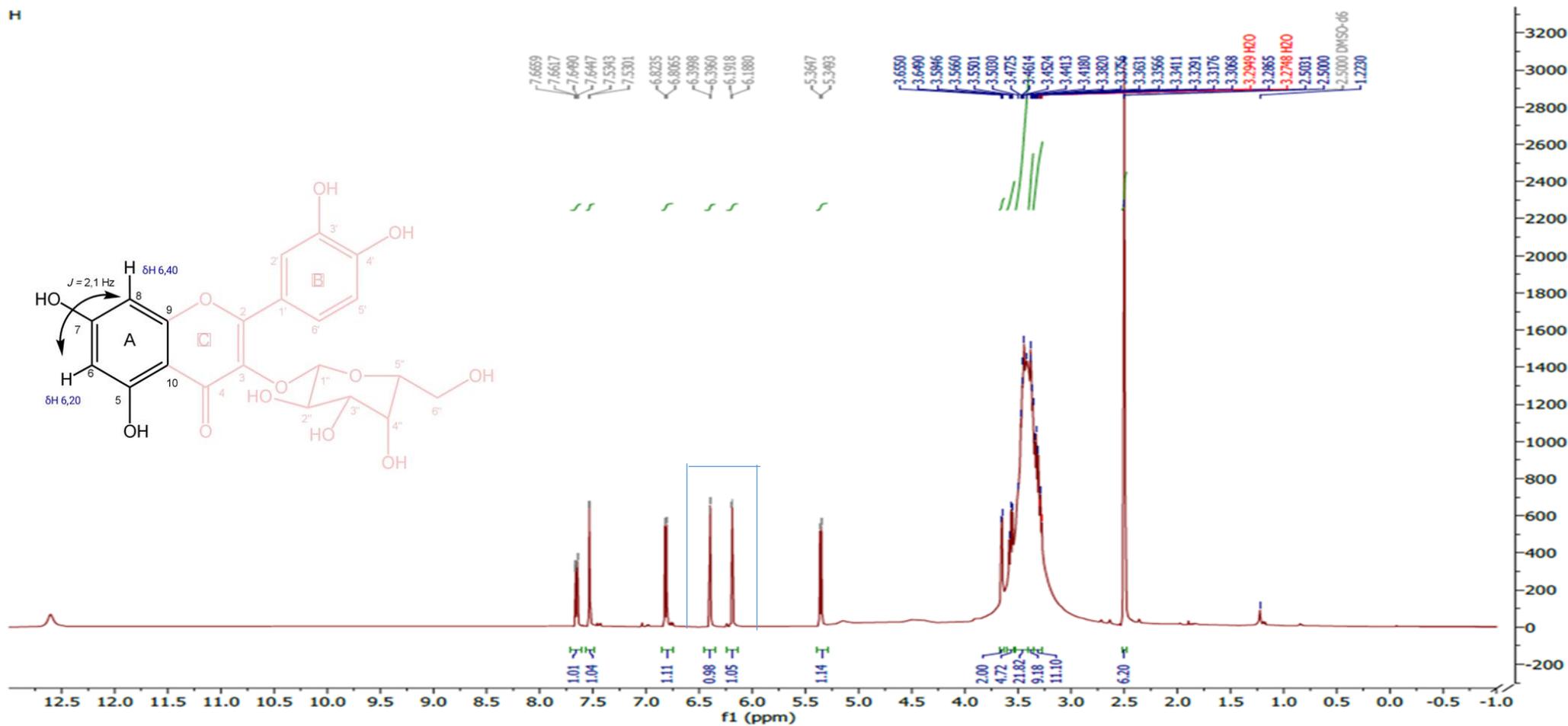
Espectro B1. Atribuição dos sinais referentes aos carbonos nos anéis A,C e B, do espectro de RMN ^{13}C da fração C (δ , DMSO- d_6 , 125 MHz)

Espectro B2. Atribuição dos sinais referentes aos carbonos da unidade de açúcar, do espectro de RMN ^{13}C da fração C (δ , DMSO- d_6 , 125 MHz)

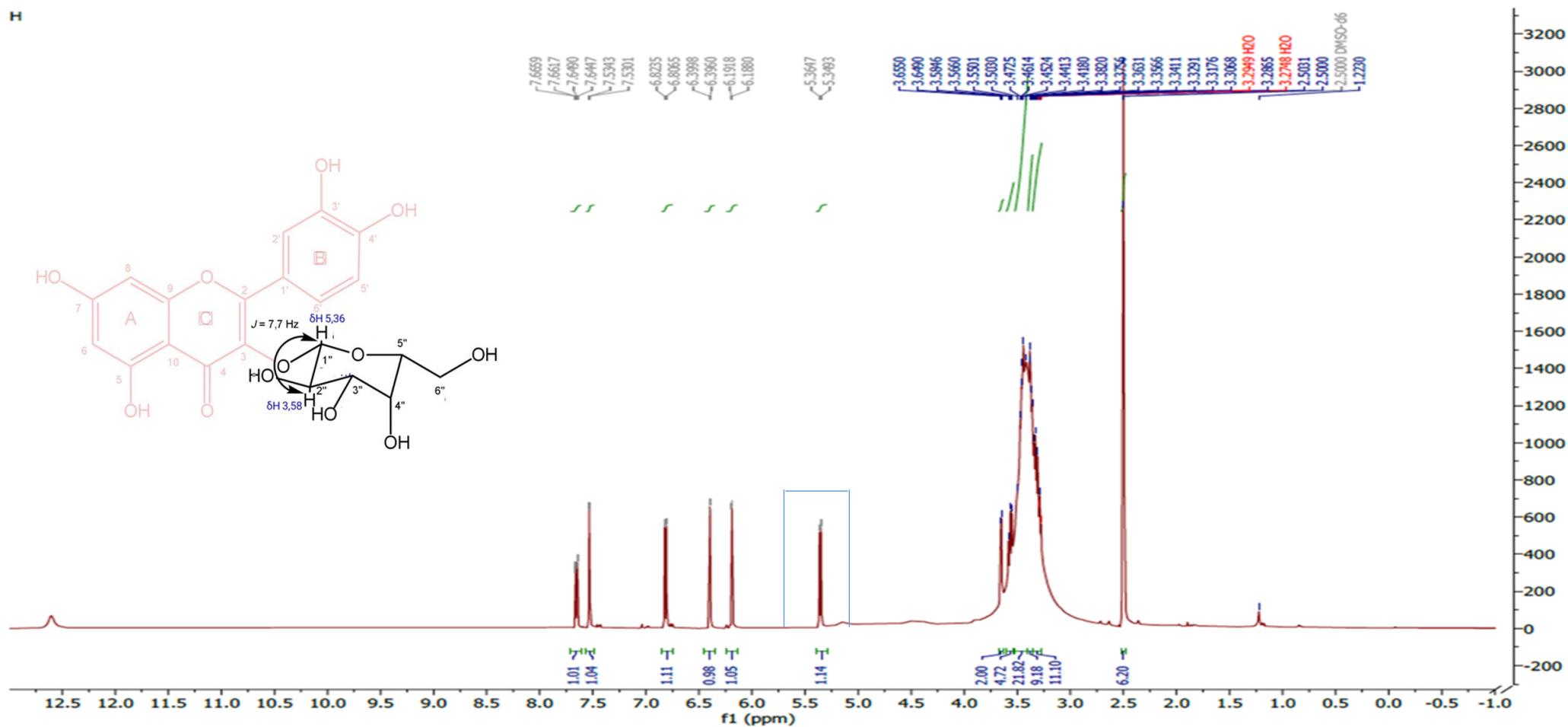
Espectro A1. Atribuição dos sinais referentes aos hidrogênios do anel B, no espectro de RMN ^1H da fração C (δ , DMSO- d_6 , 500 MHz)



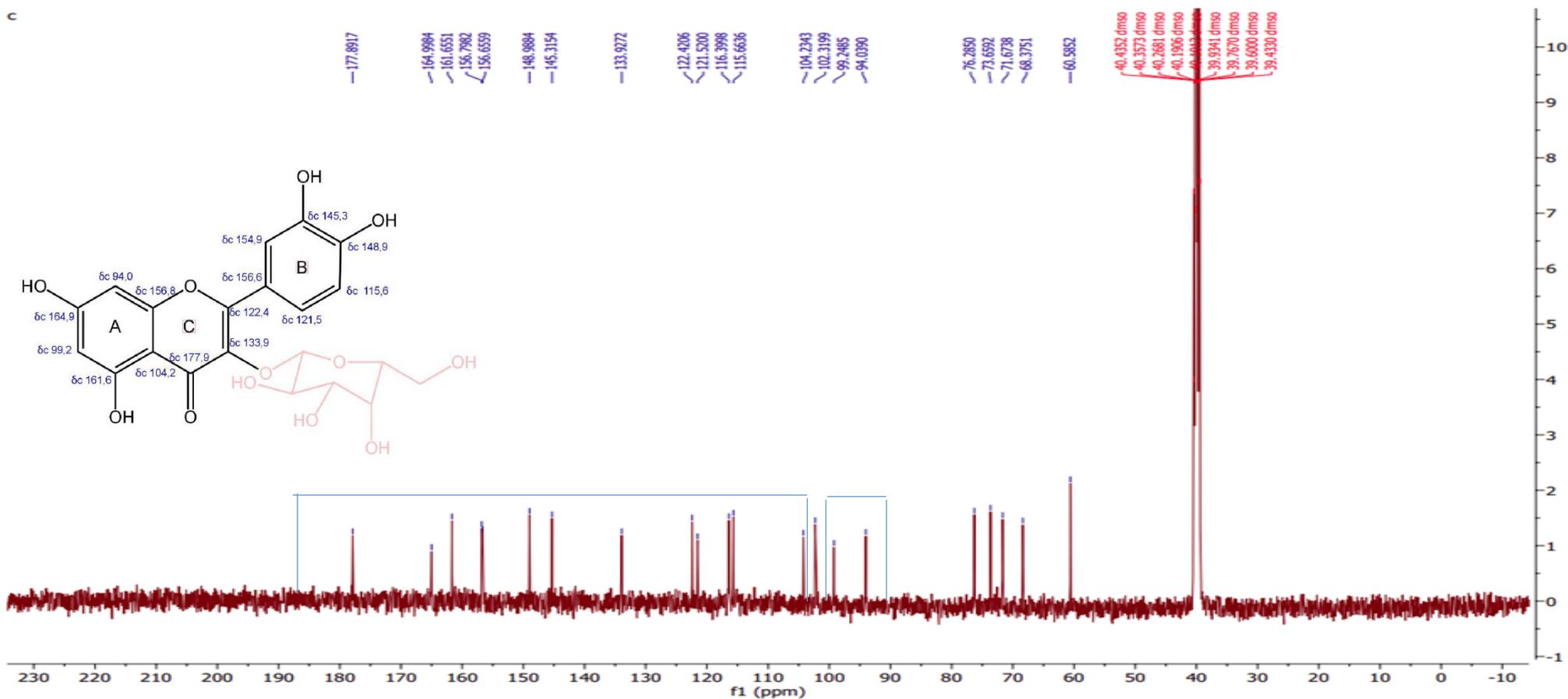
Espectro A2. Atribuição dos sinais referentes aos hidrogênios do anel A, no espectro de RMN ^1H da fração C (δ , DMSO- d_6 , 500 MHz)



Espectro A3. Atribuição do sinal referente ao hidrogênio da unidade de açúcar, no espectro de RMN ^1H da fração C (δ , DMSO- d_6 , 500 MHz)



Espectro B1. Atribuição dos sinais referentes aos carbonos nos anéis A,C e B, do espectro de RMN ^{13}C da fração C (δ , DMSO- d_6 , 125 MHz)



Espectro B2. Atribuição dos sinais referentes aos carbonos da unidade de açúcar, do espectro de RMN ^{13}C da fração C (δ , DMSO- d_6 , 125 MHz)

