



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL de LONDRINA

---

ISABELLA MARIA TOMAZ BISSOCHI

**ATIVIDADE ANTIVIRAL DE PECTINA SULFATADA  
DERIVADA DE *Passiflora edulis* NA REPLICAÇÃO DE  
VÍRUS RESPIRATÓRIOS (RSV E SARS-CoV-2) *IN VITRO***

ISABELLA MARIA TOMAZ BISSOCHI

**ATIVIDADE ANTIVIRAL DE PECTINA SULFATADA  
DERIVADA DE *Passiflora edulis* NA REPLICAÇÃO DE  
VÍRUS RESPIRATÓRIOS (RSV E SARS-CoV-2) *IN VITRO***

Dissertação apresentada à  
Universidade Estadual de Londrina -  
UEL, como requisito parcial para a  
obtenção do título de Mestre em  
Microbiologia.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ligia Carla Faccin  
Galhardi

Corientador: Prof. Dr. Edison Luiz  
Durigon

Londrina  
2026

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Bissochi, Isabella Maria Tomaz.

Atividade antiviral de pectina sulfatada derivada de *Passiflora edulis* na replicação de vírus respiratórios (RSV e SARS-CoV-2) in vitro / Isabella Maria Tomaz Bissochi. - Londrina, 2026.

85 f.

Orientador: Ligia Carla Faccin Galhardi .

Coorientador: Edison Luiz Durigon.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2026.

Inclui bibliografia.

1. SARS-CoV-2 - Tese. 2. RSV - Tese. 3. *Passiflora edulis* - Tese. 4. Pectina sulfatada - Tese. I. Faccin Galhardi , Ligia Carla. II. Durigon, Edison Luiz. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. IV. Título.

CDU 574.6:61

ISABELLA MARIA TOMAZ BISSOCHI

**ATIVIDADE ANTIVIRAL DE PECTINA SULFATADA  
DERIVADA DE *Passiflora edulis* NA REPLICAÇÃO DE  
VÍRUS RESPIRATÓRIOS (RSV E SARS-CoV-2) *IN VITRO***

Dissertação apresentada à  
Universidade Estadual de Londrina -  
UEL, como requisito parcial para a  
obtenção do título de Mestre em  
Microbiologia.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof<sup>a</sup> . Dr<sup>a</sup> . Ligia Carla Faccin  
Galhardi  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof<sup>a</sup> . Dr<sup>a</sup> . Nathalia de Sousa Pereira  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Dr<sup>a</sup>. Briani Gisele Bigotto  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 21 de julho de 2026.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus e à Nossa Senhora, minha intercessora e Mãe, por não apenas terem me sustentado, mas também me carregado durante todo este ciclo. Obrigada por me concederem paciência e resiliência para enfrentar os desafios desta caminhada e pela bênção de reconhecer, com humildade, que cada conquista é fruto da graça e das pessoas que colocaram em meu caminho.

Aos meus pais, Jean e Rosana, e ao meu irmão, João, agradeço por estarem presentes e me apoiarem em todas as etapas da minha vida. Obrigada por partilharem comigo todas as alegrias e por enfrentarem todas as dificuldades ao meu lado, especialmente durante o desenvolvimento desta dissertação, período em que precisei estar longe da minha família. Todo amor, incentivo e sacrifício de vocês fizeram de mim quem sou hoje. Obrigada por caminharem ao meu lado e me apoiarem em cada sonho e em cada decisão.

Ao meu grande amor e meu maior incentivador, Eduardo, agradeço por ser meu lugar de amparo e descanso. Obrigada por sonhar comigo os meus sonhos, e por tornar os meus sonhos seus também. Nunca terei palavras suficientes para agradecer a Deus por tamanha bondade ao me presentear com o seu coração. Sua paciência, confiança e incentivo me fazem ir muito além do que eu jamais conseguiria imaginar. Que possamos celebrar inúmeras conquistas juntos.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lígia Carla Faccin Galhardi, expresso minha gratidão pela confiança depositada em mim desde o início. Mesmo em meio a imprevistos, sempre pude contar com seu apoio e disponibilidade, não só como orientadora, nos experimentos e escrita, mas também por meio de seus conselhos e incentivo. Obrigada por comemorar comigo o alívio de cada experimento que dava certo, serei sempre grata por confiar em mim como pessoa e pesquisadora.

Aos Prof. Dr. Edison Luiz Durigon, do Laboratório de Virologia Clínica e Molecular do ICB-USP, ao Prof. Dr. Carsten Wrenger e à Dr<sup>a</sup>. Edmarcia Elisa de Souza, da *Unit for Drug Discovery*, do ICB-USP, bem como ao Prof. Dr. Alexandre Orsato, do Departamento de Química da UEL, agradeço pela colaboração, disponibilidade e pelo auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus colegas de laboratório, que ao longo destes anos se tornaram amigos que guardo com carinho no coração, agradeço por tornarem o laboratório um lugar onde sempre fui feliz. Obrigada por dividirem comigo os desafios, as horas de experimentos e as muitas risadas. Em especial, agradeço à minha amiga Mariana, que compartilhou comigo uma das etapas mais importantes deste trabalho. Obrigada por ter topado viver essa experiência ao meu lado e por ter tornado os dias e passeios por São Paulo

infinitamente mais legais.

Aos meus amigos Amanda, Beatriz P., Beatriz B. e Pedro, obrigada pelos anos de amizade e por permanecerem ao meu lado em qualquer circunstância. Obrigada por torcerem por mim e pelas minhas conquistas. Estarei sempre aqui por vocês.

À banca examinadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nathalia de Sousa Pereira e Dr<sup>a</sup>. Biani Gisele Bigotto, agradeço pelo tempo dedicado à leitura deste trabalho e pelas contribuições.

À Universidade Estadual de Londrina, agradeço pela oportunidade de realizar uma formação acadêmica de excelência. Ao Departamento de Microbiologia, ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação (PROPPG), agradeço pelo apoio institucional e pela infraestrutura disponibilizada para o desenvolvimento deste trabalho.

Por fim, agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado, cujo apoio foi essencial para a realização desta pesquisa.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para que este trabalho se tornasse realidade, o meu mais sincero obrigada.

**Faz o que deves e está no que fazes.**

São Josemaria Escrivá

## RESUMO

BISSOCHI, Isabella Maria Tomaz. **Atividade antiviral de pectina sulfatada derivada de *Passiflora edulis* na replicação de vírus respiratórios (RSV e SARS-CoV-2 *in vitro*)**. 2026. 85. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2026.

As infecções virais respiratórias representam um importante problema de saúde pública mundial, responsáveis por elevada morbidade, especialmente em populações vulneráveis. Destaca-se entre essas a COVID-19 e a bronquiolite infantil, causados, respectivamente, por Coronavírus da Síndrome Respiratória 2 (SARS-CoV-2) e Vírus Sincicial Respiratório (RSV). Apesar dos avanços terapêuticos observados nos últimos anos, as opções antivirais disponíveis ainda são limitadas, reforçando a necessidade da busca por novos compostos com potencial antiviral, seguros e de amplo espectro. Nesse contexto, polissacarídeos naturais e quimicamente sulfatados vêm sendo amplamente investigados devido às suas propriedades biológicas, incluindo a atividade antiviral. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar a citotoxicidade, atividade antiviral e possível mecanismo de ação da pectina sulfatada extraída da casca do fruto de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* (PecMS2.4) frente à infecção por SARS-CoV-2 e RSV, *in vitro*. Para isso, foram utilizadas, respectivamente, células Vero e HEp-2, cultivadas e mantidas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. A avaliação da citotoxicidade e da atividade antiviral foi realizada através dos ensaios CellTiter-Glo® Cell Viability Assay ou MTT, com determinação das concentrações citotóxicas (CC<sub>50</sub>) e inibitórias (IC<sub>50</sub>) de 50%, além do índice de seletividade (IS: CC<sub>50</sub>/ IC<sub>50</sub>). O mecanismo de ação nas etapas iniciais de infecção foi investigado através dos ensaios simultâneo, virucida e de inibição de adsorção viral, por TCID<sub>50</sub> e MTT e confirmados por RT-qPCR. PecMS2.4 não apresentou citotoxicidade nas maiores concentrações testadas em células Vero e HEp-2, apresentando CC<sub>50</sub> > 250 µg/mL. O composto demonstrou elevada atividade antiviral durante a triagem com IC<sub>50</sub> < 1,9 µg/mL e IS > 131,6 para RSV e IC<sub>50</sub> de 40,7 µg/mL e IS > 6,14 para SARS-CoV-2. Sua eficácia foi confirmada demonstrando inibir diferentes etapas iniciais da infecção viral para ambos os vírus. Até o momento, PecMS2.4 demonstrou efeito simultâneo, virucida e na adsorção para SARS-CoV-2 e RSV. Dessa forma, os resultados obtidos demonstram que PecMS2.4 apresenta promissora atividade de amplo espectro antiviral *in vitro*, contra RSV e SARS-CoV-2. Destaca-se também a baixa citotoxicidade e seu potencial biotecnológico como candidatas ao desenvolvimento de novos agentes antivirais. Estudos futuros ainda são necessários para aprofundar a compreensão dos mecanismos de ação envolvidos em etapas posteriores da infecção e investigação em modelos *in vivo*.

**Palavras-chave:** SARS-CoV-2; RSV; *Passiflora edulis*; Pectina sulfatada; *In vitro*.

## ABSTRACT

BISSOCHI, Isabella Maria Tomaz. **Antiviral activity of a sulfated compound derived from *Passiflora edulis* on the replication of respiratory viruses (RSV and SARS-CoV-2) *in vitro***. 2026. 85. Dissertation (Master's Degree in Microbiology) – State University of Londrina, Londrina, 2026.

Respiratory viral infections represent a major global public health concern, accounting for high morbidity rates, especially among vulnerable populations. Among these infections, Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) and infant bronchiolitis stand out, caused respectively by Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and Respiratory Syncytial Virus (RSV). Despite therapeutic advances achieved in recent years, the currently available antiviral options remain limited, highlighting the need to identify new safe, broad-spectrum antiviral compounds. In this context, natural and chemically sulfated polysaccharides have been extensively investigated due to their biological properties, including antiviral activity. Therefore, the aim of the present study was to evaluate the cytotoxicity, antiviral activity, and possible mechanism of action of sulfated pectin extracted from the peel of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* (PecMS2.4) against SARS-CoV-2 and RSV infection *in vitro*. For this purpose, Vero and HEP-2 cells were used, respectively, and cultured under standard conditions at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. Cytotoxicity and antiviral activity were assessed using the CellTiter-Glo® Cell Viability Assay or MTT assay, with determination of the 50% cytotoxic concentration (CC<sub>50</sub>), 50% inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>), and selectivity index (SI = CC<sub>50</sub>/IC<sub>50</sub>). The mechanism of action during the early stages of infection was investigated through simultaneous, virucidal, and viral adsorption inhibition assays using TCID<sub>50</sub> and MTT and subsequently confirmed by RT-qPCR. PecMS2.4 exhibited no cytotoxicity at the highest concentrations tested in either Vero or HEP-2 cells, with CC<sub>50</sub> values > 250 µg/mL. The compound demonstrated high antiviral activity during screening, with an IC<sub>50</sub> < 1.9 µg/mL and SI > 131.6 against RSV, and an IC<sub>50</sub> of 40.7 µg/mL and SI > 6.14 against SARS-CoV-2. Its efficacy was further confirmed by its ability to inhibit different early stages of viral infection for both viruses. To date, PecMS2.4 has demonstrated simultaneous, virucidal, and viral adsorption inhibitory effects against SARS-CoV-2 and RSV. Overall, the results indicate that PecMS2.4 exhibits promising broad-spectrum antiviral activity *in vitro* against both RSV and SARS-CoV-2. Furthermore, its low cytotoxicity and biotechnological potential highlight its promise as a candidate for the development of new antiviral agents. Further studies are still required to better understand its mechanisms of action during later stages of infection and to evaluate its efficacy in *in vivo* models.

**Keywords:** SARS-CoV-2; RSV; *Passiflora edulis*; Sulfated pectin; *In vitro*.

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                        |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1</b> - Estrutura da pectina e da pectina sulfatada .....                                    | 22 |
| <b>Figura 2</b> - Frutos de <i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> .....                        | 23 |
| <b>Figura 3</b> - Organização genômica e estrutural do RSV .....                                       | 26 |
| <b>Figura 4</b> - Etapas da replicação do RSV. ....                                                    | 30 |
| <b>Figura 5</b> - Organização genômica e estrutural do SARS-CoV-2.....                                 | 35 |
| <b>Figura 6</b> - Ciclo Replicativo do SARS-CoV-2.....                                                 | 39 |
| <b>Figura 7</b> - Linha do tempo das variantes e subvariantes do SARS-CoV-2.....                       | 40 |
| <b>Figura 8</b> - Efeito antiviral da PecMS2.4 sobre o ECP induzido pelo RSV em células<br>HEp-2. .... | 61 |

## LISTA DE GRÁFICOS

|                                                                                                                                    |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Gráfico 1</b> - Espectro de FT-IR da amostra PecMS2.4. ....                                                                     | 56 |
| <b>Gráfico 2</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da amostra PecMS2.4 (em D <sub>2</sub> O, com supressão do sinal da água). .... | 56 |
| <b>Gráfico 3</b> - Citotoxicidade do composto PecMS2.4 em células Vero CCL-81 e HEp-2 CCL-23. ....                                 | 57 |
| <b>Gráfico 4</b> - Triagem antiviral de PecMS2.4 contra SARS-CoV-2. ....                                                           | 58 |
| <b>Gráfico 5</b> - Mecanismo de ação de PecMS2.4 na replicação do SARS-CoV-2, avaliado por TCID <sub>50</sub> . ....               | 59 |
| <b>Gráfico 6</b> - Mecanismo de ação de PecMS2.4 na replicação do SARS-CoV-2, avaliado por RT-qPCR. ....                           | 60 |
| <b>Gráfico 7</b> - Triagem antiviral de PecMS2.4 contra RSV. ....                                                                  | 62 |
| <b>Gráfico 8</b> - Mecanismo de ação de PecMS2.4 na replicação do RSV, avaliado por TCID <sub>50</sub> e MTT. ....                 | 63 |
| <b>Gráfico 9</b> - Mecanismo de ação de PecMS2.4 na replicação do RSV, avaliado por RT-qPCR. ....                                  | 64 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1</b> - Genótipos de RSV A e RSV B.....                                                                           | 31 |
| <b>Tabela 2</b> - Sequências dos iniciadores e do amplicon utilizados para amplificação do gene N do RSV (cepa Long A)..... | 53 |
| <b>Tabela 3</b> - Sequências dos iniciadores e da sonda utilizados para amplificação do gene E do SARS-CoV-2.....           | 54 |
| <b>Tabela 4</b> - Atividade citotóxica em células Vero e atividade antiviral de PecMS2.4 contra SARS-CoV-2.....             | 58 |
| <b>Tabela 5</b> - Atividade citotóxica em células HEp-2 e atividade antiviral de PecMS2.4 contra RSV. ....                  | 62 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|            |                                                                                         |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| ITRI       | Infecções do Trato Respiratório Inferior                                                |
| ITRS       | Infecções do Trato Respiratório Superior                                                |
| RSV        | Vírus Sincicial Respiratório                                                            |
| SARS-CoV-2 | <i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus</i>                                    |
| IRA        | Infecções Respiratórias Agudas                                                          |
| CCA        | <i>Chimpanzee Coryza Agent</i>                                                          |
| mRNA       | RNA mensageiro                                                                          |
| L          | <i>Large</i>                                                                            |
| N          | <i>Nucleoprotein</i>                                                                    |
| P          | <i>Phosphoprotein</i>                                                                   |
| RNP        | Ribonucleoproteico                                                                      |
| G          | <i>Glycoprotein</i>                                                                     |
| F          | <i>Fusion</i>                                                                           |
| SH         | <i>Small hydrofobic</i>                                                                 |
| M          | Matriz                                                                                  |
| HBD        | Domínios de Ligação à Heparina                                                          |
| GAGs       | Glicosaminoglicanos                                                                     |
| HS         | Heparan Sulfato                                                                         |
| CCD        | Domínio Central Conservado                                                              |
| RdRp       | Polimerase Dependente de RNA                                                            |
| ECP        | Efeito citopático                                                                       |
| UTI        | Unidade de Terapia Intensiva                                                            |
| mAbs       | Anticorpos Monoclonais                                                                  |
| RT-qPCR    | Reação em Cadeia da Polimerase com Transcrição Reversa e<br>Quantificação em Tempo Real |
| FDA        | <i>Food and Drug Administration</i>                                                     |
| IV         | Intravenosa                                                                             |
| OMS        | Organização Mundial da Saúde                                                            |
| ORFs       | Janelas de Leitura Aberta                                                               |
| UTRs       | Regiões Não Traduzidas                                                                  |
| sgRNAs     | RNAs Subgenômicos                                                                       |
| TRS        | Sequências Reguladoras de Transcrição                                                   |
| S          | <i>Spike</i>                                                                            |
| M          | <i>Membrane</i>                                                                         |

|                    |                                                                                   |
|--------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| E                  | <i>Envelope</i>                                                                   |
| HSV                | Vírus do Herpes Simplex                                                           |
| RBD                | Domínio de Ligação ao Receptor                                                    |
| ERGIC              | Compartimento Intermediário Entre o Retículo Endoplasmático e o Complexo de Golgi |
| PLpro              | Protease Semelhante à Papaína                                                     |
| Mpro               | Protease Principal                                                                |
| 3CLpro             | Protease Semelhante à 3-cisteína                                                  |
| DMVs               | Vesículas de Dupla Membrana                                                       |
| IFN-I              | Interferon tipo I                                                                 |
| RTC                | Complexo de Replicação e Transcrição                                              |
| VOCs               | Variantes de Preocupação                                                          |
| SRAG               | Respiratória Aguda Grave                                                          |
| HSV-1              | Vírus do Herpes Simplex tipo 1                                                    |
| NDV                | Newcastle                                                                         |
| CC <sub>50</sub>   | Concentração Citotóxica de 50%                                                    |
| IC <sub>50</sub>   | Concentração Inibitória de 50%                                                    |
| IS                 | Índice de Seletividade                                                            |
| DMEM               | Eagle modificado por Dulbecco                                                     |
| SFB                | Soro Fetal Bovino                                                                 |
| ICB-USP            | Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo                     |
| NB3                | Laboratório de Nível de Biossegurança 3                                           |
| NB2                | Laboratório de Nível de Biossegurança 2                                           |
| PBS                | Tampão Fosfato Salino                                                             |
| DMEM-SF            | DMEM Sem Soro Fetal Bovino                                                        |
| TCID <sub>50</sub> | <i>Median Tissue Culture Infectious Dose</i>                                      |
| CC                 | Controle Celular                                                                  |
| DMSO               | Dimetilsulfóxido                                                                  |
| MTT                | (3-4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina                     |
| DO <sub>T</sub>    | Densidade Óptica do Grupo Tratado                                                 |
| DO <sub>cc</sub>   | Densidade Óptica do Controle Celular                                              |
| MOI                | Multiplicidade de Infecção                                                        |
| CV                 | Controle Viral                                                                    |
| %IV                | Porcentagem de Inibição Viral                                                     |
| DO <sub>cv</sub>   | Densidade Óptica do Controle Viral                                                |
| FT-IR              | Espectroscopia Vibracional de Absorção na Região do Infravermelho                 |

|       |                                                 |
|-------|-------------------------------------------------|
| RMN   | Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear |
| DS    | Grau de Sulfatação                              |
| S%    | Porcentagem de Enxofre em Massa                 |
| ANOVA | Análise de Variância                            |
| PV    | Poliovírus                                      |
| HSV-2 | Vírus do Herpes Simplex tipo 2                  |

## SUMÁRIO

|                                                                                 |    |
|---------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b>                                                            | 18 |
| <b>2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA</b>                                                 | 21 |
| 2.1 Compostos Naturais com Atividade Antiviral                                  | 21 |
| 2.1.1 Pectinas e derivados sulfatados                                           | 22 |
| 2.2 <i>Passiflora edulis</i>                                                    | 23 |
| 2.3 Vírus Respiratórios de Importância Clínica                                  | 24 |
| 2.4 Virus Sincicial Respiratório                                                | 25 |
| 2.4.1 Classificação                                                             | 25 |
| 2.4.2 Organização Genômica e Estrutura Viral                                    | 25 |
| 2.4.2.1 Proteínas estruturais                                                   | 26 |
| 2.4.2.2 Proteínas não estruturais                                               | 28 |
| 2.4.3 Ciclo Replicativo                                                         | 29 |
| 2.4.4 Infecção por RSV                                                          | 30 |
| 2.4.4.1 Epidemiologia                                                           | 30 |
| 2.4.4.2 Patogênese e Manifestações Clínicas                                     | 31 |
| 2.4.4.3 Diagnóstico e Tratamento                                                | 32 |
| 2.5 SARS-CoV-2                                                                  | 33 |
| 2.5.1 Classificação                                                             | 33 |
| 2.5.2 Organização Genômica e Estrutura Viral                                    | 34 |
| 2.5.2.1 Proteínas estruturais                                                   | 35 |
| 2.5.2.2 Proteínas não estruturais                                               | 36 |
| 2.5.2.2.1 Proteínas envolvidas na replicação e transcrição                      | 36 |
| 2.5.2.2.2 Proteínas com atividade proteolítica                                  | 37 |
| 2.5.2.2.3 Proteínas relacionadas à revisão do RNA viral                         | 37 |
| 2.5.2.2.4 Proteínas relacionadas à maturação do mRNA e evasão imune             | 37 |
| 2.5.2.2.5 Proteínas envolvidas na modulação celular e outras funções associadas | 37 |
| 2.5.2.3 Proteínas acessórias                                                    | 38 |
| 2.5.3 Ciclo Replicativo                                                         | 38 |
| 2.5.4 Infecção por SARS-CoV-2                                                   | 39 |
| 2.5.4.1 Epidemiologia                                                           | 39 |
| 2.5.4.2 Patogênese e Manifestações Clínicas                                     | 40 |
| 2.5.4.3 Diagnóstico e Tratamento                                                | 41 |

|                                                                                 |    |
|---------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>3. OBJETIVOS</b>                                                             | 43 |
| 3.1 Objetivo Geral                                                              | 43 |
| 3.2 Objetivos Específicos                                                       | 43 |
| <b>4. METODOLOGIA</b>                                                           | 44 |
| 4.1 Caracterização Química                                                      | 44 |
| 4.1.1 Espectroscopia Vibracional de Absorção na Região do Infravermelho (FT-IR) | 44 |
| 4.1.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)                     | 44 |
| 4.1.3 Quantificação dos grupos sulfato                                          | 44 |
| 4.2 Cultural Celular                                                            | 45 |
| 4.3 Estoque viral                                                               | 45 |
| 4.4 Titulação Viral                                                             | 46 |
| 4.5 <i>Passiflora edulis</i>                                                    | 46 |
| 4.6 Avaliação de Citotoxicidade                                                 | 46 |
| 4.7 Avaliação da Atividade Antiviral                                            | 47 |
| 4.7.1 Triagem antiviral contra RSV                                              | 47 |
| 4.7.2 Triagem antiviral contra SARS-CoV-2                                       | 48 |
| 4.8 Mecanismo Antiviral nas etapas iniciais da infecção                         | 49 |
| 4.8.1 Ensaio Simultâneo                                                         | 49 |
| 4.8.1.1 RSV                                                                     | 49 |
| 4.8.1.2 SARS-CoV-2                                                              | 50 |
| 4.8.2 Inibição de Adsorção                                                      | 51 |
| 4.8.2.1 RSV                                                                     | 51 |
| 4.8.2.2 SARS-CoV-2                                                              | 51 |
| 4.8.3 Virucida                                                                  | 52 |
| 4.8.3.1 RSV                                                                     | 52 |
| 4.8.3.2 SARS-CoV-2                                                              | 52 |
| 4.9 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-qPCR)                      | 52 |
| 4.9.1 RT-qPCR para RSV                                                          | 52 |
| 4.9.2 RT-qPCR para SARS-CoV-2                                                   | 53 |
| 4.10 Análise Estatística                                                        | 54 |
| <b>5. RESULTADOS</b>                                                            | 55 |
| 5.1 Caracterização Química                                                      | 55 |
| 5.2 Citotoxicidade                                                              | 57 |
| 5.3 SARS-CoV-2                                                                  | 57 |
| 5.3.1 Triagem de Atividade Antiviral                                            | 57 |
| 5.3.2 Mecanismo Antiviral                                                       | 59 |

|                                            |           |
|--------------------------------------------|-----------|
| 5.4 RSV .....                              | 61        |
| 5.4.1 Triagem de Atividade Antiviral ..... | 61        |
| 5.4.2 Mecanismo Antiviral .....            | 62        |
| <b>6. DISCUSSÃO .....</b>                  | <b>65</b> |
| <b>7. CONCLUSÃO .....</b>                  | <b>72</b> |
| <b>REFERÊNCIAS .....</b>                   | <b>73</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

As infecções respiratórias virais representam um importante problema de saúde pública mundial, sendo uma das principais causas de morbidade e mortalidade em diferentes faixas etárias (HANAGE; SCHAFFNER, 2025). Em 2021, foram estimados aproximadamente 344 milhões de novos casos de infecções do trato respiratório inferior (ITRI) em todo o mundo, resultando em cerca de 2,18 milhões de mortes, incluindo mais de 500 mil óbitos em crianças menores de cinco anos. Nesse cenário, as ITRI permaneceram como a principal doença infecciosa fatal no mundo, excluindo a COVID-19, e a quinta principal causa de morte global (BENDER et al., 2024; WHO, 2024). Além das ITRIs, as infecções do trato respiratório superior (ITRS) apresentam frequência ainda maior, com estimativas de 17,2 bilhões de episódios anuais, correspondendo a quase 43% de todos os casos de doenças reportados mundialmente (JIN et al., 2021).

Entre os principais agentes etiológicos, o RSV e SARS-CoV-2 destacam-se pela ampla disseminação e gravidade clínica (HANAGE; SCHAFFNER, 2025). RSV é considerado o principal causador de bronquiolite e pneumonia em lactentes, sendo responsável por aproximadamente 33 milhões de casos de ITRI anualmente em crianças menores de cinco anos, levando a 3,6 milhões de hospitalizações e cerca de 100.000 mortes, principalmente em países de baixa e média renda (ALVAREZ DE TOLEDO et al., 2026). Já a pandemia de COVID-19, causada pelo SARS-CoV-2, resultou em mais de 700 milhões de casos confirmados e ultrapassou 7 milhões de mortes até o início de 2024 (HANAGE; SCHAFFNER, 2025).

Alguns grupos apresentam maior risco para o desenvolvimento de formas graves dessas infecções, incluindo crianças pequenas, idosos e indivíduos imunocomprometidos (ALVAREZ DE TOLEDO et al., 2026). Além disso, embora a pandemia de COVID-19 tenha alterado temporariamente os padrões de sazonalidade, a circulação do RSV e outros vírus respiratórios permanece constante, apresentando surtos de alta intensidade em diferentes populações (HANAGE; SCHAFFNER, 2025).

Apesar da relevância clínica dessas infecções, as terapias antivirais atualmente disponíveis ainda apresentam limitações significativas. Para o RSV, o suporte clínico continua sendo a principal abordagem terapêutica, uma vez que a ribavirina, único antiviral aprovado para casos graves, apresenta baixa eficácia e pode causar efeitos tóxicos, incluindo riscos de anemia e teratogenicidade (ALVAREZ DE TOLEDO et al., 2026). Embora avanços recentes tenham possibilitado a aprovação de vacinas e anticorpos monoclonais (mAbs) de longa duração para a prevenção da infecção por

RSV, o impacto epidemiológico global da doença ainda permanece elevado. Além disso, persistem incertezas relacionadas à eficácia dessas estratégias a longo prazo e ao possível surgimento de novas variantes, mantendo a necessidade da descoberta de novos antivirais (MAZUR et al., 2023). No caso do SARS-CoV-2, antivirais como o remdesivir demonstraram benefícios clínicos variáveis e eficácia reduzida em pacientes com quadros graves. Outra questão relevante é o surgimento de resistência viral, em que mutações rápidas nas proteínas de superfície dos vírus podem comprometer a eficácia de tratamentos já existentes, como observado com as variantes de SARS-CoV-2 (DU et al., 2026). Além disso, o alto custo e a complexidade de administração de imunoterapias restringem o acesso a esses tratamentos, especialmente em regiões menos favorecidas (FLY; STULTZ; EILAND, 2026).

Nesse contexto, observa-se uma baixa disponibilidade de antivirais de amplo espectro capazes de atuar contra múltiplos patógenos respiratórios, sendo que a maioria das intervenções atuais é altamente específica ou limitada por janelas terapêuticas (DU et al., 2026; SWEENEY; WITTEBOLE; KALIL, 2026). Com isso, o desenvolvimento de novos antivirais com mecanismos de ação inovadores torna-se necessário, e os produtos naturais têm despertado interesse como fonte de compostos bioativos, devido à sua diversidade química e baixa toxicidade (ALVAREZ DE TOLEDO et al., 2026; ELMAIDOMY et al., 2025; ZHAO et al., 2026). Entre eles, os polissacarídeos naturais e seus derivados sulfatados têm demonstrado potencial antiviral promissor (ZHAO et al., 2026).

A sulfatação de biomoléculas vegetais pode aumentar significativamente sua atividade biológica, permitindo que esses compostos atuem mimetizando receptores celulares para bloquear a adsorção e a entrada do vírus na célula hospedeira, além de inibir estágios intracelulares da replicação viral (FLY; STULTZ; EILAND, 2026). Vírus envelopados, como o RSV e o SARS-CoV-2, representam alvos importantes para polissacarídeos sulfatados devido à dependência de interações eletrostáticas iniciais durante o processo de infecção. Por apresentarem carga negativa, os polissacarídeos sulfatados podem mimetizar receptores celulares, ligando-se competitivamente às regiões carregadas positivamente do envelope viral, dificultando a adsorção e a invasão da célula hospedeira (LU et al., 2021).

O gênero *Passiflora*, que engloba cerca de 500 espécies, destaca-se por apresentar diferentes propriedades farmacológicas. Estudos fitoquímicos e computacionais com extratos de *Passiflora edulis* identificaram metabólitos capazes de interagir com proteases virais essenciais, sugerindo atividade contra diferentes vírus envelopados (ELMAIDOMY et al., 2025). Além disso, do ponto de vista biotecnológico, essa espécie também apresenta interesse devido à possibilidade de aproveitamento de

resíduos agroindustriais, como as cascas do fruto, frequentemente descartadas. Essas cascas são uma importante fonte de pectina, principal bioproduto obtido de *P. edulis*, permitindo a transformação desses subprodutos em biomoléculas com potencial terapêutico (CORRÊA et al., 2016). O aproveitamento dessa biomassa contribui para abordagens mais sustentáveis e de baixo custo, além do potencial de escalabilidade industrial, fatores essenciais para o desenvolvimento de novas aplicações terapêuticas acessíveis (CORRÊA et al., 2016; ZHAO et al., 2026).

Embora estudos recentes tenham demonstrado que extratos brutos de *P. edulis* possuem atividade inibitória contra outros vírus envelopados, como o vírus da Febre Amarela, a investigação de seus derivados quimicamente modificados ainda é pouco explorada. Dessa forma, biomoléculas vegetais derivadas desta espécie, especialmente polissacarídeos modificados, podem representar uma alternativa interessante para o desenvolvimento de novas terapias antivirais de amplo espectro (ELMAIDOMY et al., 2025). Portanto, investigar as propriedades biotecnológicas e a atividade antiviral de derivados sulfatados de *P. edulis* pode contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas contra vírus respiratórios relevantes, como o RSV e o SARS-CoV-2 (ZHAO et al., 2026).

## 2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA

### 2.1 Compostos Naturais com Atividade Antiviral

Os compostos naturais vêm sendo amplamente investigados devido ao seu potencial terapêutico contra diversas doenças infecciosas. Entre esses compostos, destacam-se polissacarídeos naturais, macromoléculas encontradas em plantas, algas, fungos e microrganismos, capazes de apresentar diferentes atividades biológicas, incluindo atividades antivirais (CHEN; HUANG, 2018; FENG et al., 2023). A atividade biológica desses compostos pode ser relacionada às suas características estruturais, incluindo massa molecular, composição química, grau de ramificação e presença de grupos funcionais específicos (LU et al., 2021).

Nos últimos anos, diversos polissacarídeos naturais demonstraram potencial antiviral contra diferentes vírus de RNA e DNA, atuando principalmente na inibição das etapas iniciais da infecção viral, como adsorção e entrada nas células hospedeiras (WEI et al., 2022). A modificação química desses polímeros, especialmente por meio da sulfatação, vem sendo utilizada como estratégia para potencializar suas propriedades biológicas (LU et al., 2021).

Diversos estudos já demonstraram atividade antiviral de polissacarídeos naturais e derivados sulfatados frente a diferentes vírus respiratórios e não respiratórios. Carragenanas sulfatadas extraídas de algas vermelhas apresentaram atividade antiviral contra diferentes vírus respiratórios, incluindo influenza vírus, RSV e SARS-CoV-2, enquanto fucoidanas obtidas de algas marrons também demonstraram atividade contra influenza vírus, HSV e SARS-CoV-2, ambas associadas ao bloqueio das etapas iniciais de adsorção e entrada viral (JABEEN et al., 2021; WEI et al., 2022). Além disso, um polissacarídeo sulfatado derivado de *Caesalpinia ferrea* demonstrou atividade contra HSV-1 e poliovírus (PV), interferindo principalmente nas etapas iniciais da infecção (LOPES et al., 2013), enquanto polissacarídeos sulfatados derivados de *Laminaria angustata* e *Chuanmingshen violaceum* também apresentaram atividade antiviral contra HSV-1 e vírus da doença de Newcastle (NDV), respectivamente (CHEN; HUANG, 2018).

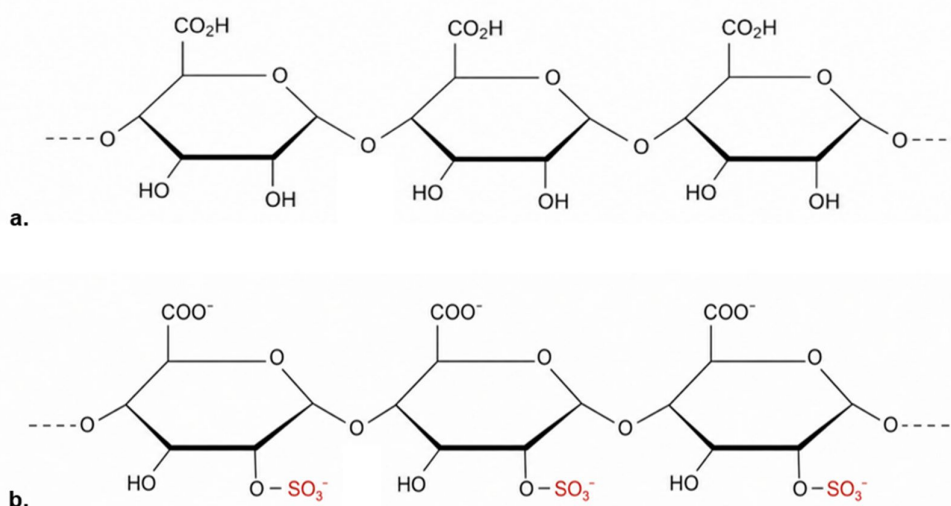
Dessa forma, os polissacarídeos naturais e seus derivados sulfatados destacam-se como compostos promissores para o desenvolvimento de novas estratégias antivirais, especialmente devido à capacidade de interferir em etapas cruciais da infecção viral e ao amplo espectro de atividade observado contra diferentes vírus de importância clínica (LU et al., 2021; WEI et al., 2022).

### 2.1.1 Pectinas e derivados sulfatados

Entre os diversos compostos naturais estão as pectinas, polissacarídeos naturais presentes na parede celular de plantas superiores, constituídas majoritariamente por unidades de ácido galacturônico unidas por ligações glicosídicas  $\alpha$ -(1  $\rightarrow$  4) (Figura 1a) (MOHNEN, 2008). Esses polímeros são amplamente distribuídos em diferentes espécies vegetais, incluindo o maracujá (*Passiflora edulis*), cuja casca representa uma importante fonte para obtenção de pectina (CORRÊA et al., 2016). Além da ampla disponibilidade e do baixo custo de obtenção, esses polímeros apresentam biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa toxicidade, características que favorecem sua aplicação em diferentes áreas, incluindo a pesquisa de novos compostos bioativos (CORRÊA et al., 2016; LARA-ESPINOZA et al., 2018).

As propriedades biológicas das pectinas podem ser potencializadas por modificações químicas, sendo a sulfatação uma das estratégias mais utilizadas. A introdução de grupos sulfato aumenta a densidade de cargas negativas na molécula, favorecendo interações com proteínas virais e receptores celulares envolvidos nas etapas iniciais da infecção (Figura 1b) (GHOSH et al., 2009; LU et al., 2021). Além disso, características como grau de sulfatação, massa molecular e posição dos grupos sulfato influenciam diretamente a atividade antiviral observada (JEGADESHWARI; RAJARAM, 2024).

**Figura 1** - Estrutura da pectina e da pectina sulfatada



a. Estrutura simplificada da pectina.

b. Estrutura simplificada da pectina após sulfatação.

**Fonte:** Autoria própria.

Estudos demonstram que a sulfatação pode aumentar a atividade antiviral das pectinas, tornando esses derivados promissores para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas contra diferentes vírus envelopados (LU et al., 2021; ZHAO et al., 2026). No caso de *P. edulis*, a obtenção de pectina a partir das cascas do fruto também representa uma alternativa sustentável, agregando valor a resíduos agroindustriais e ampliando seu potencial de aplicação biotecnológica (CORRÊA et al., 2016).

## 2.2 *Passiflora edulis*

Popularmente conhecido como maracujá-amarelo ou maracujá-azedo, *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* é uma espécie pertencente à família Passifloraceae, amplamente cultivada em regiões tropicais e subtropicais (Figura 2). O gênero *Passiflora* apresenta mais de 400 espécies descritas, sendo cerca de 120 nativas do Brasil (BERNACCI, 2003). Apesar da grande diversidade de espécies, *P. edulis* f. *flavicarpa* representa mais de 95% dos pomares comerciais brasileiros (MELETTI; BRÜCKNER, 2001). A planta apresenta hábito trepador, caule semilenhoso e frutos arredondados de coloração amarela quando maduros, sendo utilizada tanto para consumo in natura quanto para produção de derivados industriais (HE et al., 2020).

**Figura 2** - Frutos de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*.



**Fonte:** CORRÊA et al. (2016).

Os extratos e compostos obtidos de diferentes partes de *P. edulis* f. *flavicarpa*, incluindo cascas, sementes, folhas, polpa e frutos, vêm sendo amplamente investigados devido à presença de diversos compostos bioativos, como flavonoides, compostos fenólicos, carotenoides, alcaloides e polissacarídeos, associados a diferentes atividades biológicas (HE et al., 2020; ZERAIK et al., 2010). Entre as propriedades descritas na literatura encontram-se atividades antioxidantes, anti-inflamatórias, antimicrobianas, hipoglicemiantes, gastroprotetoras e ansiolíticas (ZERAIK et al., 2010; ZHANG et al.,

2023). Além disso, resíduos gerados durante o processamento industrial do maracujá, principalmente cascas e sementes, vêm sendo investigados devido ao potencial aproveitamento como fonte de biomoléculas de interesse farmacêutico e alimentício (LARA-ESPINOZA et al., 2018).

Entre os principais biopolímeros presentes na casca do maracujá destaca-se a pectina, um heteropolissacarídeo estrutural amplamente presente na parede celular vegetal (MOHNEN, 2008). Os polissacarídeos naturais derivados de *Passiflora* passaram a despertar interesse devido às diferentes atividades biológicas observadas, incluindo propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e hipoglicemiantes descritas em modelos experimentais (SILVA et al., 2011; SILVA et al., 2015). Além dos polissacarídeos, diferentes compostos bioativos presentes em *P. edulis* também vêm sendo associados a atividades antimicrobianas, anti-inflamatórias, antioxidantes e outras aplicações farmacológicas descritas na literatura (HE et al., 2020; NIKOLOVA et al., 2024).

### 2.3 Vírus Respiratórios de Importância Clínica

Os vírus respiratórios compreendem uma ampla variedade de agentes causadores de infecções em humanos, apresentando significativo impacto na morbidade e mortalidade em nível global, principalmente em crianças. Estima-se que aproximadamente um quinto das mortes infantis no mundo esteja associado a infecções respiratórias agudas (IRAs) (BONCRISTIANI; CRIADO; ARRUDA, 2009). Esses agentes infectam células do trato respiratório, causando sintomas respiratórios e sistêmicos, e caracterizam-se por eficiente transmissão através de secreções respiratórias por múltiplas vias, incluindo contato direto, aerossóis, gotículas e fômites (LEUNG, 2021). Diversas famílias virais estão envolvidas nessa disseminação, destacando-se o Vírus Sincicial Respiratório (RSV) e o SARS-CoV-2, além de patógenos como Influenza, Rinovírus e Adenovírus, que contribuem significativamente para a incidência de infecções respiratórias, resultando em impactos econômicos globais e sobrecarga dos sistemas de saúde (WESTON; FRIEMAN, 2019; MIYASHITA et al., 2026).

Apesar dos avanços nos estudos sobre vírus respiratórios, o controle das infecções ainda enfrenta desafios, como a variabilidade genética viral, a emergência de novos patógenos e a limitada disponibilidade de terapias antivirais eficazes. Atualmente, a vacinação se destaca como a principal estratégia para reduzir o impacto e a disseminação viral mundialmente (GILLIM-ROSS; SUBBARAO, 2006).

Entre as terapias disponíveis, muitas são acompanhadas de fatores como a resistência aos antivirais, altos custos e potenciais efeitos adversos, o que reforça a necessidade de novas estratégias terapêuticas. Nesse contexto, os compostos de origem natural, atuando em múltiplas etapas do ciclo replicativo viral, têm ganhado relevância como alternativas promissoras para o desenvolvimento de novos fármacos, apresentando potencial para a obtenção de antivirais com menor toxicidade (ADHIKARI et al., 2021).

## 2.4 Vírus Sincicial Respiratório

### 2.4.1 Classificação

O RSV foi isolado e identificado pela primeira vez no ano de 1956 em chimpanzés com doenças respiratórias, apresentando sintomas como tosse, espirros e secreção nasal. O agente foi nomeado inicialmente como *Chimpanzee coryza agent* (CCA) (MORRIS; BLOUNT; SAVAGE, 1956). Posteriormente, o patógeno foi identificado em crianças com doenças respiratórias e passou a ser denominado RSV, devido à sua capacidade de induzir a formação de sincícios (fusão celular) em culturas celulares infectadas (CHANOCK et al., 1957).

Atualmente, o RSV é classificado como *Orthopneumovirus hominis*, pertencendo ao gênero *Orthopneumovirus*, família *Pneumoviridae*, ordem *Mononegavirales*, classe *Monjiviricetes*, filo *Negarnaviricota*, reino *Orthornavirae* e domínio *Riboviria*, de acordo com a classificação taxonômica mais recente. Até 2016, o RSV pertencia à família *Paramyxoviridae*, sendo posteriormente reclassificação devido a diferenças significativas em relação a outros vírus dessa mesma família (MASLOV et al., 2024).

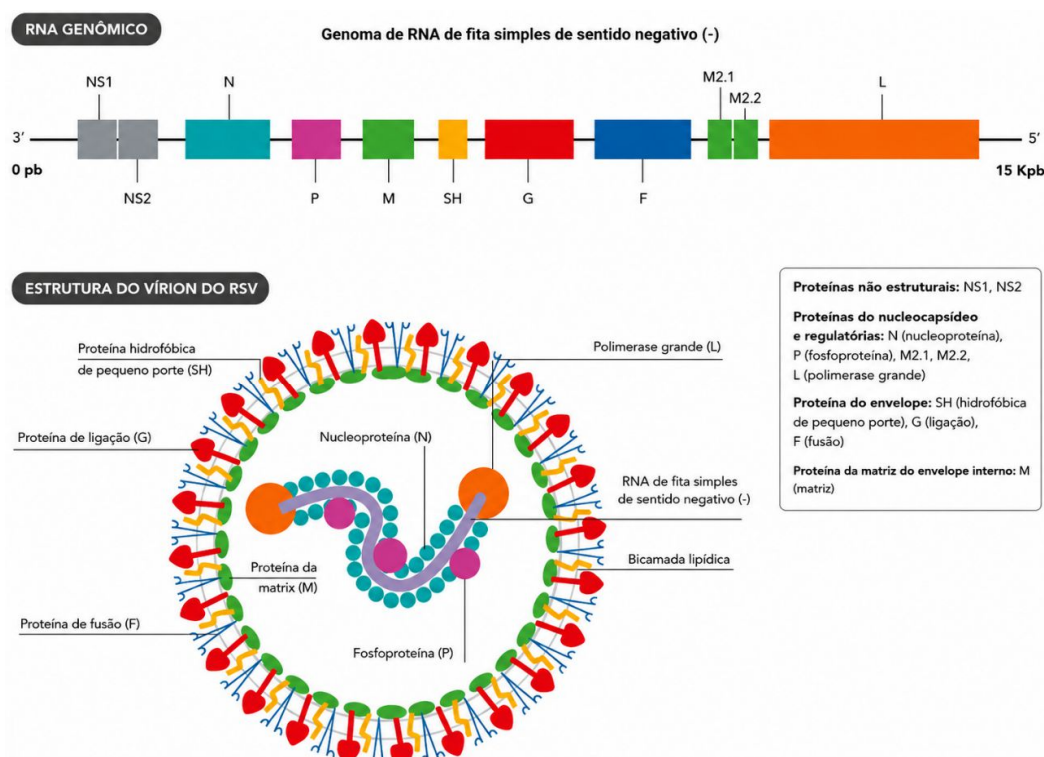
### 2.4.2 Organização Genômica e Estrutura Viral

O genoma do RSV é constituído por RNA de fita simples de sentido negativo e não segmentado, com aproximadamente 15.000 nucleotídeos. Esse genoma é composto por 10 genes organizados na sequência 3'–5': NS1, NS2, N, P, M, SH, G, F, M2 e L. Cada gene é transcrito em uma molécula de RNA mensageiro (mRNA), e cada mRNA codifica uma proteína, com exceção do gene M2, que apresenta duas regiões de leitura sobrepostas, resultando na síntese de 11 proteínas virais (Figura 3) (PANGESTI et al., 2018).

Além das regiões codificadoras, o genoma apresenta regiões não codificadoras nas extremidades, denominadas *leader* (3') e *trailer* (5'), envolvidas na replicação e transcrição viral, além de regiões intergênicas que separam os genes. A transcrição é regulada por sequências específicas, incluindo os sinais *gene-start* e *gene-end*, que delimitam o início e o término de cada mRNA (COLLINS; KARRON, 2014).

Em relação à estrutura, o RSV é um vírus envelopado e pleomórfico, apresentando-se em formas esféricas ou filamentosas. O virion é composto por um nucleocapsídeo helicoidal, formado pelo genoma viral associado às proteínas L (*Large*), N (*Nucleoprotein*), P (*Phosphoprotein*), que juntas formam o complexo ribonucleoproteico (RNP). Esse nucleocapsídeo é envolto por um envelope lipídico derivado da membrana celular hospedeira no qual estão ancoradas as glicoproteínas de superfície G (*Glycoprotein*), F (*Fusion*) e SH (*Small hydrofobic*), além da proteína M2-1, localizada na face interna do envelope (BONCRISTIANI; CRIADO; ARRUDA, 2009; WESTON; FRIEMAN, 2019).

**Figura 3 - Organização genômica e estrutural do RSV**



**Fonte:** Adaptado de NAM e ISON (2019).

#### 2.4.2.1 Proteínas estruturais

Entre as proteínas estruturais do RSV estão aquelas presentes no envelope (G, F e SH), a proteína de matriz (M) e as proteínas associadas ao nucleocapsídeo (N, P, L e M2-1) (NAM; ISON, 2019).

A proteína G é uma glicoproteína de superfície que atua na ligação do vírus às células hospedeiras. Ela é produzida em duas formas distintas: ancorada à membrana, responsável pela adesão; e na forma solúvel, que auxilia na modulação da resposta imune do hospedeiro. Estruturalmente, é a proteína mais variável do vírus, sendo o principal determinante da divisão dos grupos antigênicos A e B (ANDERSON et al., 2021). A proteína G possui domínios de ligação à heparina (HBD), responsáveis pela interação com glicosaminoglicanos (GAGs) presentes na superfície celular, principalmente as regiões negativamente carregadas de heparan sulfato, que atuam como importantes pontos de ancoragem inicial do vírus. Além disso, possui um domínio central conservado (CCD) que contém sítios de ligação que interagem com o receptor CX3CR1 (BATTLES; MCLELLAN, 2019; BERGERON et al., 2021).

A proteína F é responsável por mediar a fusão entre o envelope viral e a membrana da célula hospedeira. Diferente da proteína G, apresenta uma estrutura mais conservada, sendo considerada um dos principais alvos para o desenvolvimento de vacinas e antivirais. A proteína F é sintetizada inicialmente como um precursor denominado F0 e, para tornar-se funcionalmente ativa, precisa ser clivada, dando origem às subunidades F1 e F2. (SUN et al., 2013). Além disso, atua também na fusão entre membranas de células adjacentes, levando à formação dos sincícios, estruturas características dessa infecção. (MASLOV et al., 2024).

A função da proteína SH, também presente no envelope viral, não é totalmente compreendida. Essa proteína forma pentâmeros que se assemelham a canais, indicando possível atuação como viroporina, sendo capaz de alterar a permeabilidade de membranas. Além disso, estudos apontam que a SH desempenha papel auxiliar na fusão, mas sua presença não parece ser essencial para estabelecer infecções in vitro. Mesmo assim, o gene que codifica SH permanece conservado nas cepas circulantes, sugerindo que a proteína pode conferir alguma vantagem ao vírus (MCLELLAN; RAY; PEEPLES, 2013; HUONG et al., 2023).

A proteína M participa dos processos de montagem e brotamento das partículas virais (MITRA et al. 2012). No início da infecção, embora a replicação ocorra no citoplasma, a proteína M é encontrada no núcleo celular, desempenhando papel na inibição da transcrição celular e retardamento da formação de partículas virais até fases tardias, quando há acúmulo de glicoproteínas virais. Nessa etapa, a proteína M se associa aos complexos RNPs, resultando na inibição da transcrição viral e na facilitação da montagem das partículas (SHAHRIARI; WEI; GHILDYAL, 2018).

As proteínas N, L, P e M2-1 fazem parte do complexo RNP, responsável pela síntese de RNA viral. A proteína N forma o nucleocapsídeo que envolve o RNA viral, conferindo proteção ao genoma viral contra degradação (CAO; GAO; LIANG, 2021). A proteína L atua como polimerase dependente de RNA (RdRp), polimerizando o genoma e mRNA viral. Para exercer suas funções, a proteína L precisa estar associada à fosfoproteína P, que interage também com as proteínas N e M2-1 (OUIZOGUN-OUBARI et al., 2015). A proteína P, ao atuar como cofator de L, direciona o reconhecimento eficiente e específico da fita de RNA por parte do complexo de replicação (CARDONE et al., 2021). As proteínas N, L e P são consideradas essenciais para a replicação do material genético do RSV, enquanto a proteína M2-1 atua como um fator de processividade e antiterminador da transcrição, impedindo o desligamento prematuro da polimerase e garantindo a produção de mRNAs completos e de partículas virais infectantes (CAO; GAO; LIANG, 2021).

#### 2.4.2.2 Proteínas não estruturais

As proteínas NS1 e NS2 não estão presentes nas partículas virais maduras e, portanto, não são necessárias para a estruturação dos vírions (XU et al., 2014). Ainda assim, devido à organização do genoma do RSV, essas são as primeiras proteínas a serem sintetizadas (STRAUB et al., 2011). NS1 e NS2 apresentam diferenças relevantes quanto à estabilidade e localização celular: enquanto NS1 é mais estável e encontrada principalmente no núcleo celular, NS2 é rapidamente degradada após o início do ciclo replicativo viral e é encontrada predominantemente na mitocôndria, complexada à NS1 (THORNHILL; VERHOEVEN, 2020). Além disso, ambas atuam na modulação da resposta antiviral do hospedeiro, desencadeada pela presença de componentes virais no citoplasma, afetando diversas etapas da cascata de sinalização de receptores do tipo Toll e do Gene indutor de ácido retinóico I, especialmente em células epiteliais pulmonares (HIJANO et al., 2019; ZHANG et al., 2016).

Embora a função da proteína M2-2 ainda não esteja completamente estabelecida, há evidências de que ela desempenha um papel importante na regulação da replicação viral. Estudos com mutantes para o gene M2-2 demonstraram que sua ausência resultou no aumento da produção de mRNA, acompanhado por uma redução na síntese de RNA genômico, indicando assim seu papel no equilíbrio entre transcrição e replicação viral (CHENG et al., 2005; MCFARLAND et al., 2020).

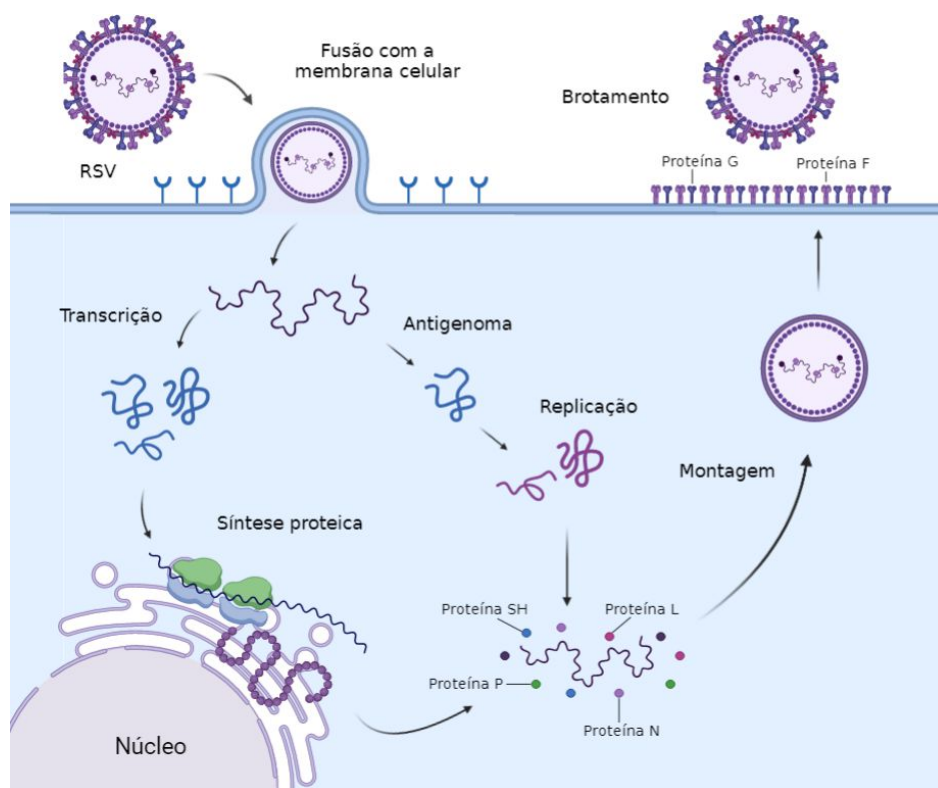
### 2.4.3 Ciclo Replicativo

O processo de replicação do RSV segue uma dinâmica semelhante à dos demais vírus: adsorção, penetração, desnudamento, transcrição e replicação do genoma viral, montagem e liberação dos vírions por brotamento (Figura 4) (FLINT et al., 2015). O RSV infecta inicialmente células epiteliais das vias respiratórias superiores, podendo se disseminar para o epitélio bronquiolar e células alveolares do trato respiratório inferior (MERRITT; PEI; LEUNG, 2024).

A etapa inicial da infecção ocorre através da adesão viral à superfície celular, mediada principalmente pela interação entre HBDs da proteína G e receptores celulares, especialmente GAGs. Em seguida, a proteína F liga-se aos resíduos de nucleolina presentes na superfície da célula hospedeira, desencadeando mudanças conformacionais que promovem a fusão entre o envelope viral e a membrana celular, permitindo a entrada do vírus na célula (GRIFFITHS; DREWS; MARCHANT, 2017; GILMAN et al., 2019). A expressão da proteína F promove também a fusão entre células adjacentes infectadas, resultando na formação de sincícios, característica marcante do efeito citopático (ECP) causado pelo RSV (BONCRISTIANI; CRIADO; ARRUDA, 2009).

Após a fusão, o nucleocapsídeo contendo o RNA viral e as proteínas N, L, P e M2-1 é liberado no citoplasma celular e a transcrição e replicação do genoma ocorrem em corpos de inclusão citoplasmáticos. A proteína L, então, atua como RdRp e inicia a transcrição do genoma viral a partir de um único promotor na extremidade 3' do RNA, produzindo mRNAs (MERRITT; PEI; LEUNG, 2024; PALUCK et al., 2022). Os processos de montagem e brotamento das partículas virais ocorrem na face interna da membrana citoplasmática e, em células polarizadas, ocorrem na superfície apical (KALER et al., 2023). A montagem é mediada pela interação das proteínas transmembrana SH, G e F com a proteína M, promovendo a formação e brotamento de novos vírions que, por fim, serão liberados a partir da membrana celular (JORQUERA; ANDERSON; TRIPP, 2016). A eliminação das novas partículas virais geralmente se inicia dentro de um dia após a infecção (KALER et al., 2023).

**Figura 4** - Etapas da replicação do RSV.



**Fonte:** Autoria própria.

#### 2.4.4 Infecção por RSV

##### 2.4.4.1 Epidemiologia

Globalmente, o RSV é uma das principais causas de infecções respiratórias agudas (IRAs), representando importante causa de morbidade e mortalidade em crianças e idosos. A infecção pode variar de quadros leves até manifestações graves, podendo evoluir para necessidade de internação em UTI. A maioria das crianças é infectada nos dois primeiros anos de vida, podendo ser reinfectada ao longo da vida (BLYTH et al., 2026; GUPTA et al., 2026).

O RSV é classificado em dois subgrupos, RSV A e RSV B, inicialmente diferenciados por meio de mAbs específicos para a proteína G. Dentro destes dois grupos, diversos genótipos foram identificados e descritos posteriormente, embora ainda não exista um consenso bem estabelecido para sua classificação. O RSV continua em constante evolução, com novos genótipos surgindo ao longo dos anos. Até o momento, estima-se que foram documentados 37 genótipos para o RSV B e 13 para

RSV A, sendo os mais prevalentes listados na Tabela 1 (NUTTENS *et al.*, 2024; RIOS GUZMAN; HULTQUIST, 2022).

**Tabela 1** - Genótipos de RSV A e RSV B.

|           | RSV A                           | RSV B                                                                                                              |
|-----------|---------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Genótipos | GA1–GA7, SAA1, NA1 <sup>a</sup> | BA1–BA14, BA-C, BA-CCA, BA-CCB, BA-Ly, CB1, GB0, GB1–GB6, GB12, GB13, JAB1, NZB1, NZB2, SAB1–SAB4, THB, URU1, URU2 |

**Fonte:** Adaptado de NUTTENS *et al.* (2024).

A circulação do RSV varia de acordo com as condições climáticas e meteorológicas de cada região. Em climas temperados o pico de infecções ocorre durante o inverno, associado às baixas temperaturas e alta umidade, enquanto em climas tropicais e equatoriais, os padrões de circulação são mais variáveis e menos definidos (TANG; LOH, 2014). Apesar dos diferentes genótipos poderem circular simultaneamente durante uma mesma temporada, um único genótipo tende a predominar em determinada região geográfica, alternando anualmente entre os grupos A e B (GUZMAN; HULTQUIST, 2022).

#### 2.4.4.2 Patogênese e Manifestações Clínicas

A infecção pelo RSV inicia-se nas células epiteliais ciliadas do trato respiratório superior do hospedeiro, geralmente causando sintomas mais leves e frequentes, como rinorreia, congestão nasal, tosse e febre baixa. Conforme a infecção progride, o vírus pode se disseminar para o trato respiratório inferior, podendo atingir bronquíolos e pneumócitos do tipo I presentes nos alvéolos, causando formas mais graves da doença, com desenvolvimento de bronquiolite e pneumonia, caracterizadas por febre, dor torácica, chiado, fadiga, dispneia e taquipneia, condições que podem ser fatais (CARVAJAL *et al.*, 2019).

Os danos teciduais causados pela infecção estão relacionados tanto à replicação viral quanto à intensidade da resposta imune do hospedeiro (ASSERI, 2025). Uma resposta inflamatória intensa leva à necrose tecidual e ao desprendimento de células ciliadas, que, somado à hipersecreção de muco e à formação de sincícios, resultam na obstrução de pequenas vias aéreas (CARVAJAL *et al.*, 2019). A gravidade da doença também é influenciada por diversos fatores do hospedeiro. Lactantes, prematuros, bebês com baixo peso ao nascer e idosos estão mais suscetíveis às formas graves,

assim como indivíduos com cardiopatias congênitas, doenças pulmonares crônicas e imunodeficiências (COLLINS; GRAHAM, 2008; WATKISS et al., 2012).

A transmissão do RSV ocorre principalmente por contato direto com gotículas e secreções contaminadas, além do contato com superfícies contaminadas. A infecção ocorre quando partículas virais entram em contato com mucosas do nariz, boca ou olhos (KALER et al., 2023).

#### 2.4.4.3 Diagnóstico e Tratamento

Entre as metodologias utilizadas na detecção do RSV estão a propagação viral em cultura celular, testes rápidos de detecção de antígenos, testes de imunofluorescência e RT-PCR. Os testes são realizados geralmente a partir de amostras do trato respiratório superior, por meio de swabs nasais por exemplo. Atualmente, os métodos moleculares são considerados padrão-ouro devido à maior sensibilidade. Entretanto, esses testes não são realizados rotineiramente em todos os casos, uma vez que a identificação viral possui impacto limitado na conduta clínica, e, por isso, a infecção é provavelmente subdiagnosticada (ONWUCHEKWA et al., 2023).

O tratamento de infecções por RSV atualmente permanece baseado no cuidado de suporte, envolvendo o manejo de sintomas. As intervenções incluem hidratação oral ou intravenosa, oxigenação e suporte nutricional (ASSERI, 2025). A maioria dos casos podem ser tratados em casa, entretanto, a hospitalização deve ser considerada em pacientes com sinais de gravidade, como desidratação, dificuldade de alimentação, dificuldades respiratórias e baixa saturação (FLY; STULTZ; EILAND, 2026). Ao longo dos anos, diferentes antivirais foram avaliados para tratamento de crianças, adultos e pacientes imunocomprometidos, no entanto, muitos tiveram seu desenvolvimento suspenso por não apresentarem eficácia suficiente ou por questões relacionadas à segurança (DE TOLEDO et al., 2026).

A Ribavirina foi o primeiro antiviral aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para tratamento de pacientes com infecção por RSV. Trata-se de um análogo de nucleosídeo de amplo espectro capaz de inibir a replicação de vírus de DNA e RNA, disponível nas formulações aerossolizada, oral e intravenosa (IV). Entretanto, devido aos efeitos adversos, potencial teratogênico, limitações na administração e alto custo, seu uso é restrito e indicado apenas para pacientes de alto risco e casos graves, não sendo recomendado para o tratamento de bronquiolite (FLY; STULTZ; EILAND, 2026; GATT et al., 2023).

Atualmente, três anticorpos monoclonais são aprovados pela FDA para profilaxia da infecção: Palivizumabe, Nirsevimabe, Clesrovimabe (FLY; STULTZ; EILAND, 2026).

Esses anticorpos promovem imunização passiva, oferecendo proteção ao bloquear a entrada do vírus nas células hospedeiras (LIU; ZHONG, 2026). O Palivizumabe, primeiro anticorpo aprovado, demonstrou eficácia em prematuros e crianças com cardiopatias e doenças pulmonares, entretanto, a necessidade de aplicações mensais por via intramuscular, associada ao alto custo e à disponibilidade de alternativas mais recentes, reduziu sua ampla utilização. O Nirsevimabe, aprovado em 2023, demonstrou proteção eficaz em lactantes e crianças pequenas durante toda a sazonalidade viral com apenas uma aplicação intramuscular (ASSERI, 2025; FLY; STULTZ; EILAND, 2026). Já o Clesrovimabe, aprovado em 2025, apresentou eficácia na prevenção da infecção em recém-nascidos e lactentes, oferecendo proteção contínua por aproximadamente 5 a 6 meses após dose única intramuscular, cobrindo todo o período de circulação do vírus (PHILLIPS; JACKSON; PHILLIPS, 2026; NIU et al., 2026)

Além dos anticorpos, o desenvolvimento de vacinas representa um avanço importante na prevenção do RSV. As vacinas mais recentes são baseadas na proteína F estabilizada na sua conformação pré-fusão, devido ao seu papel essencial na penetração viral, alta capacidade de induzir anticorpos neutralizantes e sequência altamente conservada entre os subgrupos do vírus. Nos últimos anos, a FDA aprovou três vacinas destinadas a idosos e gestantes, com o objetivo de conferir imunidade passiva aos lactantes, sendo elas: Abrysvo® (RSVpreF), Arexvy® (RSVpreF3) e mRESVIA(mRNA-1345). Entre elas, destaca-se a Abrysvo® (RSVpreF), que demonstrou eficiente transferência placentária de anticorpos para o feto (KANEKO; MURAOKA, 2026).

## 2.5 SARS-CoV-2

### 2.5.1 Classificação

O SARS-CoV-2 foi identificado pela primeira vez em dezembro de 2019, após o surgimento de casos de pneumonia de causa desconhecida na cidade de Wuhan, China. Após o isolamento viral e sequenciamento genético, o novo patógeno passou a ser denominado 2019-nCoV (ZHU et al., 2020). Acredita-se que o vírus tenha uma origem zoonótica, sendo o morcego-ferradura (*Rhinolophus sinicus*) o provável hospedeiro primário e o pangolim (*Manis javanica*) um possível hospedeiro intermediário na transmissão para humanos. Posteriormente, o vírus foi renomeado como SARS-CoV-2, enquanto a doença causada por ele recebeu o nome de COVID-19 pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (KHALIL; DA SILVA KHALIL, 2020)

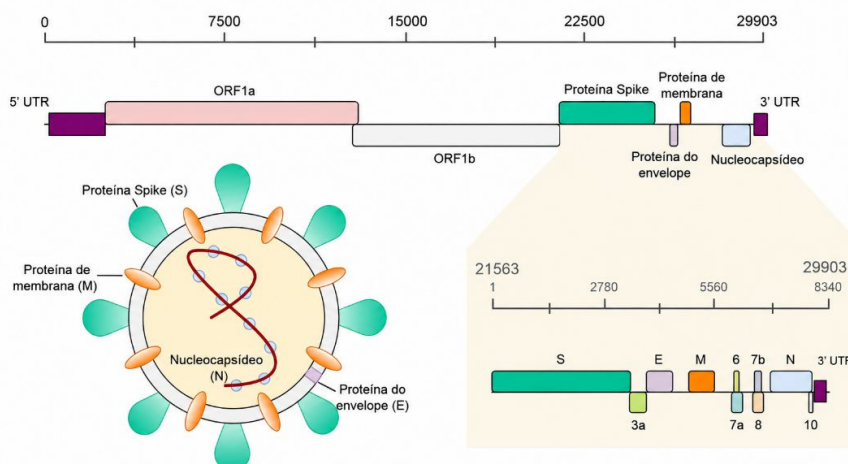
Atualmente, o SARS-CoV-2 pertence à espécie *Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus*, sendo classificado no gênero *Betacoronavirus* e subgênero *Sarbecovirus*, pertencente à família *Coronaviridae* e subfamília *Orthocoronavirinae*. Além disso, integra a ordem *Nidovirales* e subordem *Cornidovirineae*, dentro do domínio *Riboviria* (GORBALENYA et al., 2020).

### 2.5.2 Organização Genômica e Estrutura Viral

O SARS-CoV-2 possui um genoma de RNA de fita simples de sentido positivo e não segmentado, com aproximadamente 30.000 nucleotídeos, sendo um dos maiores genomas entre os vírus de RNA conhecidos. O genoma é organizado na sequência: 5'-leader sequence- ORF1/ab- S- ORF3a- E- MORF6a- ORF7a- ORF7b- ORF8- N- ORF10-3'; contendo 12 janelas de leitura aberta (ORFs), que codificam cerca de 27 proteínas. Aproximadamente dois terços do genoma, na extremidade 5', compreendem as regiões ORF1a e ORF1b, que codificam 16 proteínas não estruturais (NSP1-16). O terço restante do genoma, próximo a extremidade 3', codifica as quatro proteínas estruturais S, E, M e N e diversas proteínas acessórias. A extremidade 5' contém uma sequência líder, enquanto a extremidade 3' termina em uma cauda poli-A. O genoma do SARS-CoV-2 apresenta também regiões não traduzidas (UTRs) nas extremidades 5' e 3', fundamentais para a estabilidade do RNA e proteção contra degradação celular. A síntese das proteínas estruturais e acessórias depende da produção de RNAs subgenômicos (sgRNAs) através de um mecanismo de transcrição, regulado por sequências específicas chamadas Sequências Reguladoras de Transcrição (TRS) (RAHIMI; MIRZAZADEH; TAVAKOLPOUR, 2021; BRANT et al., 2021).

Com relação a estrutura, o SARS-CoV-2 é um vírus envelopado, geralmente de formato esférico, embora formas pleomórficas e ovais também possam ser encontradas. No interior do vírion, o material genético está associado à proteína N (*Nucleocapsid*), formando o nucleocapsídeo. O genoma é envolto por um envelope lipídico onde estão inseridas as proteínas S (*Spike*), M (*Membrane*) e E (*Envelope*) (Figura 5) (GRUDLEWSKA-BUDA et al., 2021).

**Figura 5** - Organização genômica e estrutural do SARS-CoV-2.



**Fonte:** Adaptado de SINGH e YI (2021).

### 2.5.2.1 Proteínas estruturais

Entre as proteínas estruturais do SARS-CoV-2 estão as proteínas S, M, E e N, que são codificadas por genes estruturais localizados na região 3' do genoma viral e são essenciais para a montagem e produção de novas partículas virais completas (YADAV et al., 2021; BAI; ZHONG; GAO, 2022).

A proteína S é uma glicoproteína transmembrana do tipo I responsável por formar as espículas que conferem a aparência características do SARS-CoV-2 e atuar como principal ponto de ancoragem da célula hospedeira. Estruturalmente, essa proteína é composta pelas subunidades S1 e S2. A subunidade S1 contém o domínio de ligação ao receptor (RBD), que atua no reconhecimento e ligação à célula hospedeira através da interação com receptores ACE2. Já a subunidade S2 medeia a fusão entre as membranas viral e celular, promovendo a entrada do vírus na célula hospedeira (GRUDLEWSKA-BUDA et al., 2021; ARYA et al., 2021). Para ser ativada, a proteína S precisa ser clivada por proteases do hospedeiro, como a furina e a TMPRSS2, permitindo a fusão de membranas e inserção do RNA viral na célula (ESSALMANI et al., 2022). A proteína S desempenha também um importante papel na resposta imune do hospedeiro e na patogênese viral, representando um potencial alvo para o desenvolvimento de vacinas e estratégias terapêuticas (YADAV et al., 2021; ZHANG et al., 2021).

A proteína M é uma proteína transmembrana do tipo III que interage consigo mesma e com outras proteínas estruturais. Essas interações são fundamentais para os processos de montagem, morfogênese e brotamento de novas partículas virais, além

de contribuírem para a definição do formato do envelope viral. Além disso, a proteína M induz resposta imune humoral e celular, indicando potencial alvo para o desenvolvimento de intervenções terapêuticas contra o SARS-CoV-2 (BAI; ZHONG; GAO, 2022; GORKHALI et al., 2021; ARYA et al., 2021).

A proteína E, a menor entre as proteínas estruturais e presente em menor número de cópias no envelope viral, atua como uma viroporina, organizando-se em homopentâmeros para formar canais iônicos seletivos de cátions através da membrana do compartimento intermediário entre o RE e o complexo de Golgi (ERGIC). Essa proteína participa dos processos de montagem, brotamento e liberação de novos vírions, além de atuar como importante determinante da patogênese e virulência, tornando-a um alvo promissor para o desenvolvimento de antivirais (DUART et al., 2020; MANDALA et al., 2020).

A proteína N localiza-se no interior do vírion associada ao RNA viral, conferindo proteção e estabilização ao genoma (KAKAVANDI et al., 2023). Suas funções abrangem diferentes etapas da replicação viral, auxiliando na transcrição e replicação, além de participar do empacotamento do genoma ao final do ciclo replicativo, formando o RNP e auxiliando a proteína M na montagem das novas partículas. A proteína N também contribui para a evasão do sistema imune, inibindo respostas do hospedeiro (BAI et al., 2021).

#### 2.5.2.2 Proteínas não estruturais

Além das proteínas estruturais, o SARS-CoV-2 codifica um conjunto de proteínas não estruturais denominadas NSP1 a NSP16. Essas proteínas desempenham funções fundamentais no ciclo infeccioso, participando da replicação e transcrição do RNA viral, da modulação da resposta imune do hospedeiro e da formação do complexo replicativo do vírus (YADAV et al., 2021). As principais NSPs podem ser agrupadas de acordo com suas funções no ciclo replicativo viral.

##### 2.5.2.2.1 *Proteínas envolvidas na replicação e transcrição*

A NSP12 é uma RdRP responsável pela síntese de novas moléculas de RNA fita simples a partir do RNA viral molde. As proteínas NSP7 e NSP8 atuam como cofatores, participando da montagem do complexo de replicação e transcrição necessário para a síntese do RNA viral. A NSP13 atua como helicase, desenrolando o RNA durante o processo de replicação e transcrição (TAM et al., 2023).

#### *2.5.2.2.2 Proteínas com atividade proteolítica*

A NSP3 é uma protease semelhante à papaína (PLpro) que cliva a poliproteína pp1a, liberando NSP1, NSP2 e NSP3, além de contribuir para mecanismos de evasão da resposta imune. Já a NSP5, também conhecida como protease principal (Mpro), é uma protease semelhante à 3-cisteína (3CLpro) que cliva as poliproteínas pp1a e pp1ab, liberando as NSP4 até NSP16 em suas formas intermediárias ou maduras (TAM et al., 2023; BAI; ZHONG; GAO, 2022).

#### *2.5.2.2.3 Proteínas relacionadas à revisão do RNA viral*

A NSP14 é uma exoribonuclease que atua na correção dos erros de replicação ao remover nucleotídeos incorretos incorporados ao RNA viral durante a replicação. A NSP10 atua como cofator, estimulando a NSP14 e aumentando sua atividade exonucleásica (TAM et al., 2023).

#### *2.5.2.2.4 Proteínas relacionadas à maturação do mRNA e evasão imune*

A NSP16 é uma metiltransferase que, junto ao cofator NSP10, participa do capeamento do mRNA viral, processo que permite que o mRNA viral escape da ação de RNases do hospedeiro (TAM et al., 2023). A NSP1 bloqueia a tradução de proteínas do hospedeiro, impedindo a expressão de diversos fatores envolvidos na resposta à infecção viral e no reconhecimento e eliminação do vírus pelo sistema imune inato (ARYA et al., 2021). A NSP15 é uma endoribonuclease que degrada resíduos de RNA viral para ocultar a infecção de sensores celulares de defesa (BAI; ZHONG; GAO, 2022).

#### *2.5.2.2.5 Proteínas envolvidas na modulação celular e outras funções associadas*

As proteínas NSP4 e NSP6 participam da modificação das membranas do RE para formar vesículas de dupla membrana (DMVs), que auxiliam na replicação e montagem viral. A proteína NSP2 interage com proteínas do hospedeiro PHB1 e PHB2, que estão envolvidos na biogênese mitocondrial. A NSP9 é uma proteína replicase de ligação ao RNA de fita simples que ativa a NSP8 como cofator. A NSP11 pode estar envolvida em interações de afinidade com membranas da célula hospedeira, mas suas funções ainda não são bem estabelecidas (TAM et al., 2023).

### 2.5.2.3 Proteínas acessórias

Além das proteínas estruturais e não estruturais, o genoma do SARS-CoV-2 codifica também diversas proteínas acessórias, sendo as principais ORF3a, 3b, 6, 7a, 7b, 8, 9b, e 10 (GORKHALI et al., 2021). Embora não sejam consideradas essenciais para a replicação viral, evidências indicam que essas proteínas desempenham papel importante na patogênese da infecção, atuando na modulação de interações vírus-hospedeiro e mecanismos de evasão do sistema imune. Apesar dos avanços nos estudos sobre as proteínas acessórias, suas funções ainda não estão completamente esclarecidas (REDONDO et al., 2021).

A proteína ORF3a forma canais iônicos na célula hospedeira, além de estar envolvida na liberação viral, apoptose e inflamação. As proteínas ORF3b, 6, 7a, 8 e 9b atuam como antagonistas do interferon tipo I (IFN-I), interferindo na resposta imune do hospedeiro. Além disso, ORF6 interage com proteínas de exportação de mRNA e ORF7a interage com proteínas estruturais e de transporte, ambas podendo inibir a tradução celular. A proteína ORF8 destaca-se por sua capacidade de reduzir a expressão de moléculas MHC-I na superfície celular, contribuindo para a evasão do sistema imune (BAI; ZHONG; GAO, 2022; REDONDO et al., 2021).

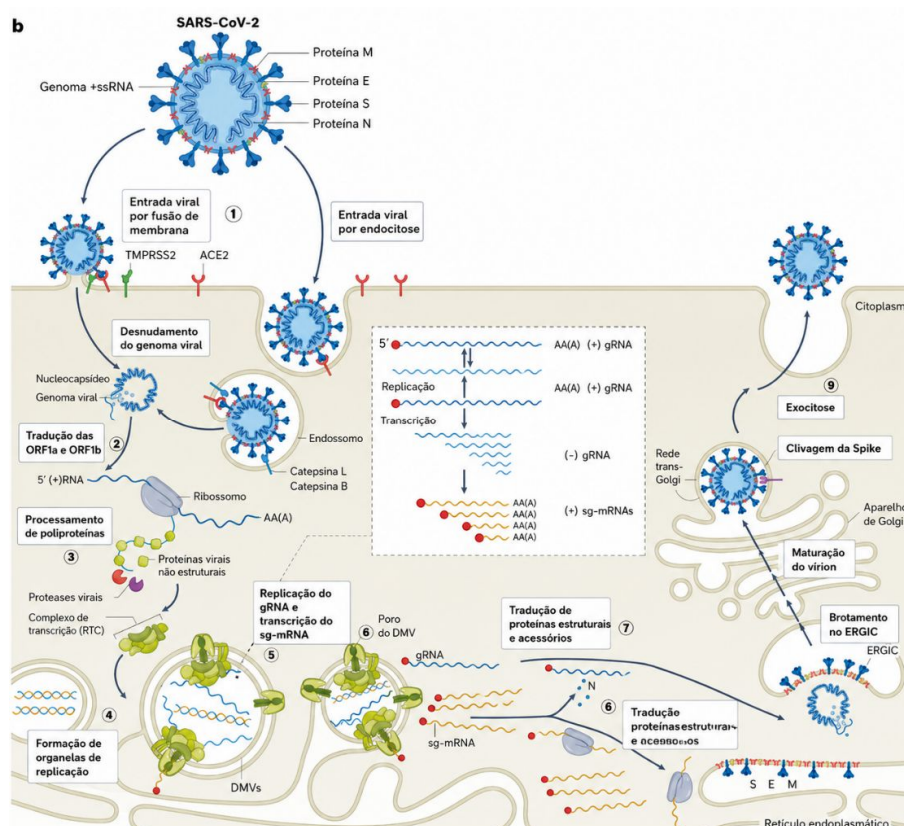
### 2.5.3 Ciclo Replicativo

O ciclo replicativo do SARS-CoV-2 inicia-se com a ligação da glicoproteína S ao receptor ACE2 presente na superfície da célula hospedeira, infectando inicialmente células epiteliais do trato superior, podendo se disseminar para células epiteliais bronquiais e pneumócitos (KHADE; YABAJI; SRIVASTAVA, 2021). Após a ligação ao receptor, a proteína S é clivada por proteases do hospedeiro, como TMPRSS2 e furina, permitindo a fusão entre o envelope viral e a membrana celular, ou entrada por endocitose, sendo a proteína S ativada por catepsinas presentes nos endossomos (JACKSON et al., 2022). Após a entrada do vírus e desnudamento, o RNA viral é liberado no citoplasma celular, atuando como RNAm e sendo traduzido pelos ribossomos do hospedeiro, produzindo inicialmente as poliproteína pp1a e pp1ab. Posteriormente, essas poliproteínas são clivadas pelas proteases virais PLpro e Mpro, originando as proteínas não estruturais, que se organizam formando o complexo de replicação e transcrição (RTC) (STEINER et al., 2024).

Simultaneamente, as membranas do RE são organizadas em DMVs, onde ocorre a síntese de novas cópias do genoma viral e de sgRNAs, que são então traduzidos em proteínas acessórias e estruturais (ROMANO et al., 2020). Dentre as

proteínas estruturais, a proteína N se associa ao novo RNA viral para formar o nucleocapsídeo, enquanto as proteínas S, M e E são direcionadas para o compartimento intermediário ERGIC para a montagem dos novos vírions. Após a montagem, as novas partículas virais são transportadas através do complexo de Golgi e liberadas para o meio extracelular por exocitose, permitindo a disseminação e infecção de novas células hospedeiras (Figura 6) (STEINER et al., 2024).

**Figura 6** - Ciclo Replicativo do SARS-CoV-2.



**Fonte:** Adaptado de STEINER et al. (2024).

## 2.5.4 Infecção por SARS-CoV-2

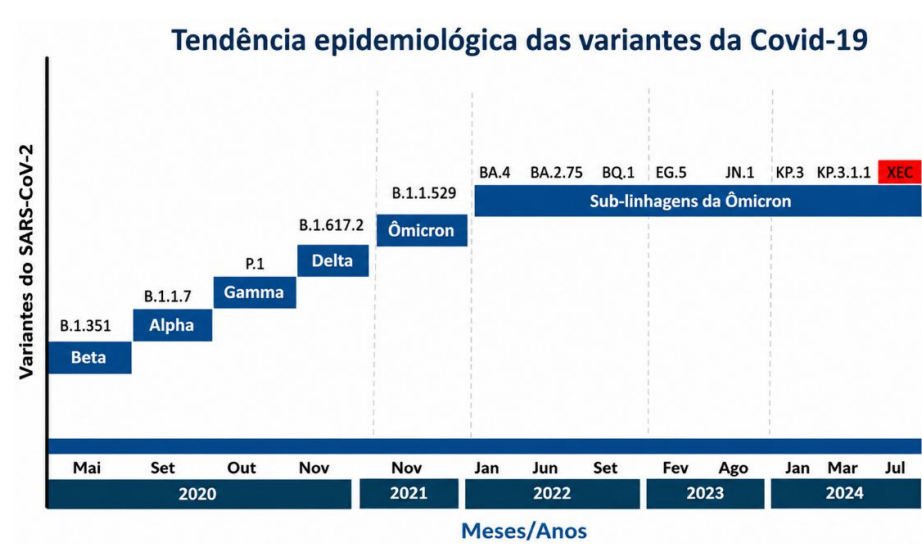
### 2.5.4.1 Epidemiologia

O SARS-CoV-2 é o agente etiológico da COVID-19, responsável por uma pandemia de grande impacto global. Desde sua identificação no final de 2019, o vírus disseminou-se rapidamente entre diferentes países e continentes, resultando em milhões de casos e óbitos em todo o mundo. Em março de 2020, a COVID-19 foi

declarada como pandemia pela OMS, tornando-se um dos maiores desafios de saúde pública das últimas décadas (HU et al., 2021; WHO, 2024).

O SARS-CoV-2 apresenta alta capacidade de evolução genética, resultando no surgimento de novas mutações e variantes ao longo da pandemia. Diversas linhagens foram descritas e classificadas pela OMS como variantes de preocupação (VOCs), principalmente devido ao aumento da transmissibilidade e menor reconhecimento pelo sistema imune. Entre as principais variantes descritas destacam-se Alpha (B.1.1.7), Beta (B.1.351), Gamma (P.1), Delta (B.1.617.2) e diferentes linhagens derivadas da variante Omicron (B.1.1.529), associada à rápida disseminação e predominante nos períodos mais recentes (Figura 7) (WHO, 2024; V'KOVSKI et al., 2021).

**Figura 7** - Linha do tempo das variantes e subvariantes do SARS-CoV-2.



**Fonte:** Adaptado de ADEJUMO; CHUKWUMA; EKWEBENE (2025).

A circulação e predominância das variantes do SARS-CoV-2 variaram entre diferentes regiões geográficas e períodos epidemiológicos, sendo influenciadas pela dinâmica populacional, medidas de controle sanitário e imunidade adquirida após infecção prévia ou vacinação. Dessa forma, a vigilância epidemiológica e genômica tornou-se fundamental para o monitoramento da evolução do vírus e identificação de novas variantes com potencial impacto em saúde pública (WHO, 2024; V'KOVSKI et al., 2021).

2.5.4.2 Patogênese e Manifestações Clínicas

A infecção pelo SARS-CoV-2 inicia-se principalmente nas células epiteliais do trato respiratório superior que expressam o receptor ACE2, podendo causar desde infecções assintomáticas até quadros graves. Os sintomas mais frequentes incluem febre, tosse, fadiga, dor de garganta, congestão nasal, cefaleia e perda de olfato e paladar. Conforme a infecção progride, o vírus pode disseminar-se para o trato respiratório inferior, atingindo bronquíolos e pneumócitos, podendo causar pneumonia, síndrome respiratória aguda grave (SRAG) e insuficiência respiratória, especialmente em indivíduos com maior risco de evolução para formas severas da doença (HARRISON; LIN; WANG, 2020; KANIMOZHI et al., 2021). Em casos graves de COVID-19, observa-se intensa produção de citocinas pró-inflamatórias e recrutamento exacerbado de células inflamatórias, contribuindo para dano alveolar difuso, edema pulmonar e comprometimento das trocas gasosas (MERAD; MARTIN, 2020).

Diferentes fatores do hospedeiro influenciam a gravidade da doença. Idosos e indivíduos com comorbidades, como hipertensão, diabetes, obesidade, doenças cardiovasculares, doenças pulmonares crônicas e imunossupressão, apresentam maior risco de hospitalização e desenvolvimento de formas graves da COVID-19 (CEVIK et al., 2021; KANIMOZHI et al., 2021).

A transmissão do SARS-CoV-2 ocorre principalmente por meio de gotículas respiratórias e aerossóis liberados durante fala, tosse, espirro ou respiração. A disseminação viral é favorecida em ambientes fechados, com pouca ventilação e aglomeração de pessoas (GREENHALGH et al., 2021).

#### 2.5.4.3 Diagnóstico e Tratamento

Os métodos utilizados na detecção da COVID-19 incluem testes moleculares, testes rápidos de detecção de antígenos e testes sorológicos. Entre os métodos diagnósticos, a Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-qPCR) é considerada padrão-ouro devido à sua alta sensibilidade e especificidade para detecção do RNA viral, principalmente durante a fase aguda da infecção. Os testes rápidos de antígeno também foram muito utilizados durante a pandemia devido à rapidez na obtenção dos resultados, embora apresentem menor sensibilidade quando comparados aos métodos moleculares (UDUGAMA et al., 2020; V'KOVSKI et al., 2021).

O tratamento da infecção varia de acordo com a gravidade da doença. A maioria dos casos leves apresenta resolução espontânea, sendo recomendado repouso, hidratação e manejo sintomático. Em pacientes com formas moderadas ou graves, pode ser necessária hospitalização, oxigenoterapia e ventilação mecânica. Além disso, diferentes antivirais e terapias imunomoduladoras foram avaliadas ao longo da

pandemia com o objetivo de reduzir a replicação viral e controlar respostas inflamatórias associadas aos casos graves da doença (RANDO et al., 2021; BEIGEL et al., 2020).

Atualmente, alguns antivirais foram autorizados pela FDA para o tratamento da COVID-19 em grupos específicos de pacientes. Entre eles, destacam-se o Remdesivir (Veklury®), primeiro antiviral aprovado pela FDA para tratamento da infecção, atuando como análogo de nucleotídeo capaz de inibir a RNA polimerase viral. Outro antiviral amplamente utilizado é o Nirmatrelvir associado ao Ritonavir (Paxlovid®), autorizado para pacientes com maior risco de desenvolver formas graves da doença, atuando na inibição da protease viral Mpro. Esses antivirais demonstraram maior eficácia quando administrados nos estágios iniciais da infecção, reduzindo o risco de progressão para formas graves da COVID-19 (BEIGEL et al., 2020; HAMMOND et al., 2022).

Diferentes anticorpos monoclonais também foram desenvolvidos para profilaxia e tratamento da COVID-19, atuando principalmente pelo bloqueio da interação entre a proteína S e o receptor ACE2 (CHAI et al., 2021). Entretanto, o surgimento de novas variantes virais impactou a eficácia de alguns desses anticorpos, limitando sua utilização ao longo da pandemia (SHAH; WOO, 2022).

A vacinação tornou-se a principal estratégia para prevenção da COVID-19 e redução da gravidade da doença. Diferentes vacinas foram desenvolvidas ao longo da pandemia, incluindo vacinas de mRNA, vetor viral, vírus inativado e subunidades proteicas. Entre as principais vacinas aprovadas pela FDA e utilizadas globalmente destacam-se Comirnaty® (BNT162b2), Spikevax® (mRNA-1273), Vaxzevria® (ChAdOx1 nCoV-19) e Novavax COVID-19 Vaccine, todas associadas à redução de hospitalizações, casos graves e mortalidade relacionados à COVID-19 (KYRIAKIDIS et al., 2021; HEIDARY et al., 2022; KRAMMER, 2020). No Brasil, a CoronaVac, vacina de vírus inativado desenvolvida pela Sinovac Biotech, também foi amplamente utilizada durante a campanha de vacinação, demonstrando eficácia na redução de hospitalizações e óbitos associados à COVID-19 (CERQUEIRA-SILVA et al., 2022).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade antiviral da pectina quimicamente sulfatada derivada da casca dos frutos de *Passiflora edulis* na infecção por SARS-CoV-2 e RSV, *in vitro*.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Realizar a caracterização química de PecMS2.4;
- Avaliar a citotoxicidade de PecMS2.4 em células Vero e HEP-2 e determinar a concentração citotóxica de 50% (CC<sub>50</sub>);
- Realizar a triagem antiviral de PecMS2.4 contra SARS-CoV-2 e RSV e determinar a concentração inibitória de 50% (IC<sub>50</sub>) do composto;
- Determinar o índice de seletividade (IS) de PecMS2.4;
- Investigar o possível mecanismo de ação antiviral de PecMS2.4 nas etapas iniciais da infecção;
- Inferir a relação estrutura versus atividade biológica de PecMS2.4 como potencial antiviral de amplo espectro viral.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Caracterização Química

#### 4.1.1 Espectroscopia Vibracional de Absorção na Região do Infravermelho (FT-IR)

As medidas dos espectros vibracionais de absorção na região do infravermelho da amostra de pectina sulfatada foram obtidas através do espectrofotômetro FT-IR Bruker – Vertex 70, equipado com acessório ATR com cristal Ge 45°, no intervalo de 4000-400 cm<sup>-1</sup>, com resolução de 4 cm<sup>-1</sup>, utilizando pastilhas de KBr.

#### 4.1.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN de <sup>1</sup>H foram realizados em Espectrômetro Bruker Mod. Avance III operando a 400 MHz para <sup>1</sup>H (Laboratório de Espectroscopia da UEL). A pectina sulfatada foi dissolvida com D<sub>2</sub>O (0,5 mL) a temperatura ambiente, congelada e liofilizada. Este passo foi repetido 3 vezes. Os espectros foram registrados à temperatura ambiente (25 °C) e interpretados no programa MestreNova (MestreLab Research).

#### 4.1.3 Quantificação dos grupos sulfato

Para avaliação do grau de sulfatação (DS) foi utilizado a metodologia A do teste de quantificação de grupos sulfato, conforme descrito por Dodgson e Price (1962). A porcentagem de enxofre em massa (S%) (1) e o grau de substituição do polissacarídeo (DS) (2) foram obtidos através das equações a seguir, em que SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> corresponde à massa dos grupos sulfato e m à massa da amostra analisada. (DODGSON; PRICE, 1962).

$$S\% = SO_4^{2-}(\mu g) \frac{0,1374 \times 100}{m} \quad (1)$$

$$DS = \frac{162,14 \times S\%}{3200 - (102 \times S\%)} \quad (2)$$

## 4.2 Cultural Celular

Células HEp-2 (ATCC® CCL-23™) e células Vero (ATCC® CCL-81™) foram utilizadas para infecção de RSV e SARS-CoV-2, respectivamente. As células foram cultivadas em frascos para cultura de células, utilizando meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), 2 mM de glutamina, 2,5 µg/mL de anfotericina B, 100 µg/mL de estreptomicina e 100 UI/mL de penicilina. Os frascos foram mantidos em estufa à 37°C e atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>. O subcultivo celular foi realizado periodicamente quando a monocamada atingia confluência superior a 90%, utilizando solução de tripsina/EDTA 0,25% (INLAB) para promover a desagregação celular.

## 4.3 Estoque viral

RSV cepa *Long A* e SARS-CoV-2 cepa Wuhan (SARS-CoV-2/human/BRA/SP02cc/2020) foram inoculadas, respectivamente em células HEp-2 e em células Vero. Previamente, as células foram semeadas em frascos de cultivo celular e incubadas nas condições descritas anteriormente até atingirem aproximadamente 85–90% de confluência. Após remoção do meio de cultivo e lavagem da monocamada celular com solução de tampão fosfato salino (PBS), as células foram infectadas com 10% do volume do inóculo com suspensão viral, permanecendo em adsorção por 1 hora. Em seguida, o inóculo viral foi removido e adicionados 5 mL (90%) de DMEM sem soro fetal bovino (DMEM-SF). Os frascos foram novamente incubados nas mesmas condições até observação de extenso ECP (48-96 horas). Posteriormente, os frascos foram submetidos a ciclos de congelamento e descongelamento, seguido de centrifugação a 4 °C e 292 g (SIGMA 2-16PK). Por fim, o sobrenadante foi coletado, aliquotado e armazenado a -80°C até utilização (GROSZ et al., 2014; GUPTA, 1996). Para RSV, após observação de ECP satisfatório, foram adicionados 5 mL de solução de sacarose 50%, obtendo-se concentração final de aproximada 25% de sacarose para manutenção do estoque. Todos os experimentos envolvendo SARS-CoV-2 foram conduzidos em laboratório NB3, em colaboração com ICB-USP, enquanto os experimentos com RSV foram conduzidos em Laboratório de Nível de Biossegurança 2 (NB2) na UEL.

#### 4.4 Titulação Viral

A diluição necessária da suspensão viral para observação de 50% de ECP foi determinada pelo método *Median Tissue Culture Infectious Dose* (TCID<sub>50</sub>), sendo calculada através do método estipulado por Reed e Munch (REED; MUENCH, 1938). Para isso, células ( $2,5 \times 10^4$  células/poço) foram cultivadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 horas nas condições descritas anteriormente. Em seguida, uma alíquota do estoque viral foi diluída em DMEM de forma seriada (1:10), até a diluição de  $10^{-12}$  em relação à suspensão viral original. As diluições e um controle celular (CC) contendo apenas DMEM foram inoculados em seis replicatas nas monocamadas celulares. As placas foram incubadas em estufa e as monocamadas celulares examinadas em microscópio óptico para registrar a presença de ECP.

#### 4.5 *Passiflora edulis*

A pectina sulfatada extraída da casca do fruto de *P. edulis* f. *flavicarpa* (PecMS2.4) foi cedida pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nágila Maria Pontes Silva Ricardo, Professora Titular do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE. A extração da pectina a partir das cascas dos frutos e sua posterior modificação química por sulfatação foram realizadas conforme metodologia descrita por Barboza et al. (2024). O composto liofilizado foi solubilizado com 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) e 90% de DMEM-SF, a concentração foi ajustada para 5 mg/mL e as alíquotas armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.6 Avaliação de Citotoxicidade

células HEp-2 ( $2,5 \times 10^4$  células/poço) ou células Vero ( $1,5 \times 10^4$  células/poço) foram cultivadas em placas de 96 poços e incubadas nas condições de cultivo, descritas anteriormente, por 24 horas. Após esse período, o meio de cultivo foi substituído por diluições seriadas (1:2) do composto PecMS2.4, partindo de 250 até 15,6  $\mu\text{g/mL}$ , preparados em DMEM-SF, além de CC contendo apenas DMEM-SF. O efeito citotóxico de PecMS2.4 foi avaliado através de ensaios respectivos para cada linhagem celular, descritos a seguir.

O efeito citotóxico em Hep-2 foi realizado pelo ensaio de redução do tetrazólio [(3-4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina] (MTT) (Life

Technologies/Invitrogen), em cristais insolúveis de formazana pelas células metabolicamente viáveis (RECHENCHOSKI et al., 2020). Os compostos foram incubados por 72h em contato com a monocamada celular, e após, o conteúdo dos poços foi removido, as células foram lavadas com PBS, sendo adicionado solução de MTT (0,5mg/mL). As placas foram novamente incubadas em estufa por 2 horas, a solução de MTT removida e adicionado solução solubilizante (isopropanol acidificado com HCl 0,01 M e 0,36% de Triton-X). Os cristais de formazana foram solubilizados por agitação durante 15 minutos e a leitura da absorbância medida por espectrofotometria (Agilent BIOTEK) no comprimento de onda de 570nm. Foi realizada uma leitura adicional a 690nm para retirada de ruídos da placa. Os dados de absorbância foram convertidos em porcentagem de viabilidade celular pela equação  $[DO_T(570) - DO_T(690)] / [DO_{cc}(570) - DO_{cc}(690)] \times 100$ , na qual  $DO_T$  e  $DO_{cc}$  representam a densidade óptica do grupo tratado e do grupo controle, respectivamente (BARBOZA et al., 2024).

A citotoxicidade em células Vero, realizadas em laboratório NB-3 foi determinada por meio do ensaio luminescente CellTiter-Glo® Cell Viability Assay (Promega) (SRINIVASAN et al., 2022; REINKE et al., 2023). O sinal luminescente foi registrado utilizando leitor multimodo de microplacas CLARIOstar (BMG Labtech, Germany), e a porcentagem de células viáveis foi calculada utilizando a fórmula  $[(\text{células tratadas} - \text{branco}) / (\text{controle veículo} - \text{branco})] \times 100$ , sendo o controle veículo correspondente a até 0,5% de DMSO.

Os resultados de viabilidade celular foram utilizados para determinar a concentração necessária para reduzir a viabilidade celular em 50% ( $CC_{50}$ ) através de regressão linear. Os dados foram obtidos a partir de quatro réplicas técnicas em dois experimentos independentes. Os gráficos foram gerados utilizando o software GraphPad Prism versão 9.0 (La Jolla, CA, EUA).

#### 4.7 Avaliação da Atividade Antiviral

##### 4.7.1 Triagem antiviral contra RSV

A triagem de atividade antiviral foi realizada pelo ensaio de redução do MTT, descrito anteriormente. Células HEP-2 ( $2,5 \times 10^4$  células/poço) foram cultivadas em placas de 96 poços e incubadas nas condições descritas anteriormente por 24 horas. Após esse período, o meio de cultivo foi removido e as células foram pré-tratadas com diluições seriadas (1:2) do composto PecMS2.4, partindo de 250 até 1,95 ug/mL, preparado em DMEM-SF. Após 1 hora de incubação, o tratamento foi removido e as

células foram infectadas com RSV diluído em DMEM-SF (MOI 1), permanecendo em adsorção viral por 1 hora. Em seguida, o inóculo viral foi removido, as células foram lavadas com PBS e as respectivas diluições do composto adicionadas novamente na monocamada, permanecendo em incubação por 72h (SRINIVASAN et al., 2022; REINKE et al., 2023). Poços contendo apenas DMEM-SF e DMEM-SF com inóculo viral (MOI 1) foram utilizados como CC e controle viral (CV), respectivamente. Após o período de incubação, a obtenção dos resultados em absorbância pelo ensaio de MTT foi realizada como descrito anteriormente. Os valores de densidade óptica foram convertidos em porcentagem de inibição viral (%IV) pela equação  $(DO_T - DO_{CV}) / (DO_{CC} - DO_{CV}) \times 100$ , sendo  $DO_T$  a densidade óptica do grupo tratado,  $DO_{CV}$  a densidade óptica do grupo controle viral e  $DO_{CC}$  a densidade óptica do grupo controle celular (WATANABE et al., 1994). A concentração responsável por inibir em 50% a infectividade viral ( $IC_{50}$ ) foi determinada pela equação da reta, através de regressão linear. Este dado foi necessário para o cálculo do índice de seletividade (IS:  $CC_{50} / IC_{50}$ ). Os dados foram obtidos a partir de quatro réplicas técnicas em dois experimentos independentes. Amostras consideradas falhas técnicas ou outliers extremos foram removidas.

#### 4.7.2 Triagem antiviral contra SARS-CoV-2

Células Vero ( $1,5 \times 10^4$  células/poço) foram semeadas em placas de 96 poços nas mesmas condições descritas anteriormente. Após 24 horas, o meio de cultivo foi removido e as células foram pré-tratadas com diluições seriadas (1:2) do composto PecMS2.4, partindo de 250 até 1,95  $\mu\text{g/mL}$ , preparado em DMEM suplementado com 2% de SFB. Após 1 hora de incubação, o tratamento foi retirado, e as células foram infectadas com a cepa Wuhan de SARS-CoV-2 diluída em DMEM contendo 2% de SFB, com multiplicidade de infecção (MOI) de 0,02, permanecendo em adsorção viral por 1 hora. Em seguida, o inóculo viral foi removido, as células foram lavadas com PBS e adicionou-se novamente as respectivas diluições do composto. As células foram incubadas por 48 horas para posterior avaliação do ECP (SRINIVASAN et al., 2022; REINKE et al., 2023).

A inibição de ECP dos compostos foi determinada utilizando o ensaio luminescente CellTiter-Glo® (CTG) (Promega), conforme previamente descrito (SRINIVASAN et al., 2022; REINKE et al., 2023). O sinal luminescente foi registrado utilizando leitor multimodo de microplacas CLARIOstar (BMG Labtech, Germany), e a porcentagem de inibição do ECP foi calculada utilizando a fórmula  $[(\text{composto teste} - \text{controle viral}) / (\text{controle celular} - \text{controle viral})] \times 100$ . Os valores de  $IC_{50}$  foram

determinados por ajuste de curva utilizando o software GraphPad Prism versão 9.0 (La Jolla, CA, EUA). Os dados foram obtidos a partir de três réplicas técnicas em dois experimentos independentes. Amostras consideradas falhas técnicas ou outliers extremos foram removidas.

#### 4.8 Mecanismo Antiviral nas etapas iniciais da infecção

A investigação do possível mecanismo de ação de PecMS2.4 na replicação inicial de RSV e SARS-CoV-2 foi realizada por meio dos ensaios de simultaneidade, atividade virucida e inibição de adsorção viral. A atividade antiviral foi avaliada por determinação do título viral em  $TCID_{50}$  pelo método de Reed-Muench (REED; MUENCH, 1938) e quantificação do RNA viral por RT-qPCR. Para os experimentos com RSV, a inibição viral também foi avaliada por meio do ensaio de MTT, e os valores de densidade óptica convertidos em %IV como descrito anteriormente. Para determinação do  $TCID_{50}$ , a leitura do ECP de RSV foi realizada visualmente, enquanto nos ensaios com SARS-CoV-2 as placas foram reveladas utilizando solução Naphthol Blue Black (Sigma-Aldrich) (0.1% naphthol blue, 5.4% de ácido acético e 0.7% de acetato de sódio), seguida da determinação dos poços positivos e negativos.

Os valores de  $TCID_{50}$  obtidos nos experimentos foram convertidos em %IV utilizando a equação  $\%IV = \left[ 1 - \left( \frac{TCID_{50} \text{ tratado}}{TCID_{50} \text{ controle}} \right) \right] \times 100$ , onde  $TCID_{50}$  tratado corresponde ao título viral das amostras tratadas e  $TCID_{50}$  controle ao título viral do controle infectado não tratado (NISHIMURA; TOKU; FUKUYASU, 1977).

##### 4.8.1 Ensaio Simultâneo

###### 4.8.1.1 RSV

Células HEp-2 ( $2,5 \times 10^4$  células/poço) foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 horas nas condições anteriormente descritas. Após esse período, diluições seriadas (1:2) de PecMS2.4 nas concentrações de 250, 125 e 62,5 µg/mL foram preparadas em DMEM-SF simultaneamente ao inóculo de RSV, para infecção com MOI 1. O meio de cultivo foi removido, as monocamadas celulares lavadas com PBS e as diferentes concentrações do composto contendo o inóculo viral foram adicionadas aos poços, seguidas de incubação até visualização de ECP. Poços contendo apenas DMEM-SF foram utilizados como CC, enquanto poços contendo

DMEM-SF e inóculo viral (MOI 1) foram utilizados como CV. Após o período de incubação e observação do ECP, os sobrenadantes foram coletados para titulação viral e RT-qPCR.

Para determinação do título viral, células HEp-2 ( $2,5 \times 10^4$  células/poço) foram novamente semeadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 horas nas condições anteriormente descritas. Os sobrenadantes coletados das diferentes concentrações e do CV foram submetidos a diluições seriadas de  $10^{-1}$  a  $10^{-6}$  em DMEM-SF e adicionados sobre as monocamadas celulares em quadruplicata. Poços contendo apenas DMEM-SF foram utilizados como CC. As placas permaneceram incubadas e a observação de ECP foi realizada a cada 24 horas. O título viral foi determinado pelo método de Reed-Muench, descrito anteriormente. Além disso, a %IV também foi avaliada por meio do ensaio de MTT descrito anteriormente.

#### 4.8.1.2 SARS-CoV-2

Células Vero foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 horas nas condições anteriormente descritas. Após esse período, diluições seriadas (1:2) de PecMS2.4, variando de 250 a 1,95  $\mu\text{g/mL}$ , foram preparadas em meio DMEM contendo 2% de SFB simultaneamente ao inóculo de SARS-CoV-2, para infecção com MOI 0,02. O meio de cultivo foi removido, as monocamadas celulares lavadas com PBS e as diferentes concentrações do composto contendo o inóculo viral foram adicionadas aos poços, seguidas de incubação por 48 horas. Poços contendo apenas meio de cultivo foram utilizados como CC, enquanto poços contendo meio de cultivo e inóculo viral foram utilizados como CV. Após o período de incubação, os sobrenadantes foram coletados para titulação viral e RT-qPCR.

Para determinação do título viral, células Vero foram novamente cultivadas em placas de 96 poços nas condições anteriormente descritas. Os sobrenadantes coletados das diferentes concentrações e do CV foram submetidos a diluições seriadas de  $10^{-1}$  a  $10^{-12}$  em meio de cultivo e adicionados sobre as monocamadas celulares em quadruplicata. Poços contendo apenas meio de cultivo foram utilizados como CC. As placas permaneceram incubadas por 48 horas e, posteriormente, foram reveladas utilizando solução de naphthol blue black para visualização do ECP e determinação do título viral, posteriormente calculado pelo método de Reed-Muench, descrito anteriormente.

#### 4.8.2 Inibição de Adsorção

##### 4.8.2.1 RSV

Células HEp-2 ( $2,5 \times 10^4$  células/poço) foram semeadas nas condições anteriormente descritas. Após 24h, as placas foram previamente incubadas a 4 °C por 30 minutos. Diluições seriadas (1:2) de PecMS2.4 nas concentrações de 250, 125 e 62,5 µg/mL foram preparadas em DMEM-SF e adicionadas juntamente ao inóculo de RSV (MOI 1). Poços contendo apenas DMEM-SF foram utilizados como CC, enquanto poços contendo DMEM-SF e inóculo viral (MOI 1) foram utilizados como CV. Após a pré-incubação a 4 °C, as misturas contendo RSV e PecMS2.4 foram adicionadas às monocamadas celulares e mantidas a 4 °C por 60 minutos para permitir a adsorção viral. Em seguida, os inóculos foram removidos, as monocamadas lavadas com PBS e DMEM-SF adicionado aos poços. As placas foram então incubadas até visualização de ECP nas condições anteriormente descritas. Após observação do ECP, os sobrenadantes foram coletados para titulação viral e RT-qPCR. A determinação do título viral pelo método de TCID<sub>50</sub> e a avaliação da %IV por MTT foram realizadas conforme descrito anteriormente.

##### 4.8.2.2 SARS-CoV-2

Células Vero foram semeadas em placas de 96 poços nas condições anteriormente descritas. Após 24 horas, as placas foram previamente incubadas a 4 °C por 30 minutos. Diluições seriadas (1:2) de PecMS2.4, variando de 250 a 1,95 µg/mL, foram preparadas em DMEM contendo 2% de SFB e adicionadas juntamente ao inóculo de SARS-CoV-2 (MOI 0,02). Poços contendo apenas meio de cultivo foram utilizados como CC, enquanto poços contendo meio de cultivo e inóculo viral foram utilizados como CV. Após a pré-incubação a 4 °C, as misturas contendo SARS e PecMS2.4 foram adicionadas às monocamadas celulares e mantidas a 4 °C por 60 minutos para permitir a adsorção viral. Em seguida, os inóculos foram removidos, as monocamadas lavadas com PBS e meio DMEM contendo 2% de SFB adicionado aos poços. As placas foram então incubadas por 48 horas nas condições anteriormente descritas. Após esse período, os sobrenadantes foram coletados para titulação viral e RT-qPCR. A determinação do título viral pelo método de TCID<sub>50</sub> foi realizada conforme descrito anteriormente.

### 4.8.3 Virucida

#### 4.8.3.1 RSV

Células HEp-2 ( $2,5 \times 10^4$  células/poço) foram semeadas nas condições anteriormente descritas. Após 24 horas, diluições seriadas (1:2) de PecMS2.4, nas concentrações de 250, 125 e 62,5 µg/mL, foram preparadas em DMEM-SF e incubadas juntamente ao RSV pelo período de 1 hora. Em seguida, a suspensão contendo vírus e as concentrações variadas do composto foram diluídas de  $10^{-1}$  a  $10^{-6}$  em DMEM-SF e inoculadas sobre as monocamadas em quadruplicata. Como CV, uma alíquota de RSV foi submetida ao mesmo processo de diluição dos tratamentos, enquanto poços contendo apenas meio de cultivo foram utilizados como CC. As placas foram então incubadas e o ECP foi registrado a cada 24 horas. A determinação do título viral pelo método de TCID<sub>50</sub> foi realizada conforme descrito anteriormente e os sobrenadantes foram coletados para RT-qPCR.

#### 4.8.3.2 SARS-CoV-2

Células Vero foram semeadas em placas de 96 poços nas condições anteriormente descritas. Após 24 horas, diluições seriadas (1:2) de PecMS2.4, variando de 250 a 1,95 µg/mL, foram preparadas em DMEM contendo 2% de SFB e incubadas juntamente ao SARS-CoV-2 pelo período de 1 hora. Em seguida, as suspensões contendo vírus e as concentrações do composto foram diluídas (1:100) em meio de cultivo e inoculadas sobre as monocamadas. Como CV, uma alíquota de SARS-CoV-2 foi submetida ao mesmo processo de diluição utilizado nos tratamentos, enquanto poços contendo apenas meio de cultivo foram utilizados como CC. As placas foram então incubadas por 48 horas nas condições anteriormente descritas. Após esse período, os sobrenadantes foram coletados para titulação viral e RT-qPCR. A determinação do título viral pelo método de TCID<sub>50</sub> foi realizada conforme descrito anteriormente.

### 4.9 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-qPCR)

#### 4.9.1 RT-qPCR para RSV

O RNA viral foi extraído utilizando um Kit comercial (*QIAamp Viral RNA* -

QIAGEN, Hilden, Germany) de acordo com as instruções do fabricante, e teve sua massa quantificada por espectrofotometria (Nanodrop - Thermo Fisher Scientific), estocado a -80°C. Para a quantificação absoluta do número de cópias do genoma viral por  $\mu\text{L}$ , uma curva padrão foi construída utilizando o plasmídeo pUC57-Amp\_N (FastBio), carreando um amplicon do gene N de RSV. A síntese do cDNA e a amplificação foram realizadas em duplicata, em reação *one-step*, utilizando um kit comercial (*QuantiNova SYBR Green RT-PCR* - QIAGEN, Hilden, Germany), de acordo com as instruções do fabricante. As sequências dos iniciadores utilizados, bem como a sequência do amplicon correspondente ao gene N do RSV (cepa *Long A*), estão apresentadas na Tabela 2. As reações foram conduzidas em termociclador Rotor-Gene Q (QIAGEN, Hilden, Germany) nas seguintes condições: transcrição reversa a 50 °C por 10 min, desnaturação inicial e ativação da DNA polimerase a 95 °C por 2 min, seguida de 40 ciclos de 95 °C por 5 s e 60 °C por 10 s. O controle negativo constituiu-se de água ultrapura. Os valores de Cq e a quantificação foram determinados pelo software do termociclador Rotor-Gene Q (QIAGEN, Hilden, Germany).

**Tabela 2** - Sequências dos iniciadores e do amplicon utilizados para amplificação do gene N do RSV (cepa Long A).

| Oligonucleotídeos     | Sequência 5'→3'                                                                                                                                      |
|-----------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Primer forward</b> | GAGGTGGCAGTAGAGTTGAAG                                                                                                                                |
| <b>Primer reverse</b> | CACTAGCGTGTCTAGCATAAT                                                                                                                                |
| <b>Amplicon</b>       | GAGGTGGCAGTAGAGTTGAAG<br>GGATTTTTGCTGGATTGTTTAT<br>GAATGCCTATGGTGCAGGGCA<br>AGTGATGTTACGGTGGGGGT<br>CTTAGCAAAATCAGTTAAAAAT<br>ATTATGCTAGGACACGCTAGTG |

#### 4.9.2 RT-qPCR para SARS-CoV-2

O RNA viral foi extraído utilizando o kit MagMAX™ Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific) e a plataforma semiautomatizada NucliSENS® easyMag® (bioMérieux, Lyon, France), seguindo as instruções do fabricante. A detecção do RNA viral foi realizada em sistema QuantStudio™ 3 Real-Time PCR utilizando o kit AgPath-ID™ One-Step RT-PCR (Thermo Fisher Scientific) e sequência de primers e sonda para o gene E, apresentadas na Tabela 3. As condições de

amplificação consistiram em 10 minutos a 55 °C para a transcrição reversa, seguidos de 3 minutos a 95 °C para ativação da DNA polimerase e desnaturação inicial, e 45 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 58 °C por 30 segundos (CORMAN et al., 2020).

Os títulos virais foram calculados utilizando uma curva padrão gerada a partir de diluições seriadas de um molde de concentração conhecida e expressos em dose infectante em cultura de células (TCID<sub>50</sub>)/mL. Os valores de IC<sub>50</sub> foram calculados por ajuste dos dados utilizando o software GraphPad Prism versão 9.0 (La Jolla, CA, EUA). Os dados foram obtidos a partir de três réplicas técnicas em dois experimentos independentes. Amostras consideradas falhas técnicas ou outliers extremos foram removidas.

**Tabela 3** - Sequências dos iniciadores e da sonda utilizados para amplificação do gene E do SARS-CoV-2.

| Oligonucleotídeos     | Sequência 5'→3'                    |
|-----------------------|------------------------------------|
| <b>Primer forward</b> | ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT         |
| <b>Primer reverse</b> | ATATTGCAGCAGTACGCACACA             |
| <b>Sonda</b>          | FAM-ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG-BBQ |

**Fonte:** Adaptado de CORMAN et al. (2020)

#### 4.10 Análise Estatística

As curvas dose-resposta foram obtidas por regressão não linear para determinação dos valores de CC<sub>50</sub>, IC<sub>50</sub> e índice de seletividade (IS). A análise estatística dos dados foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA) *one-way*, seguida do teste de comparações múltiplas de Dunnett para comparação entre os grupos tratados e o CV. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software *GraphPad Prism*.

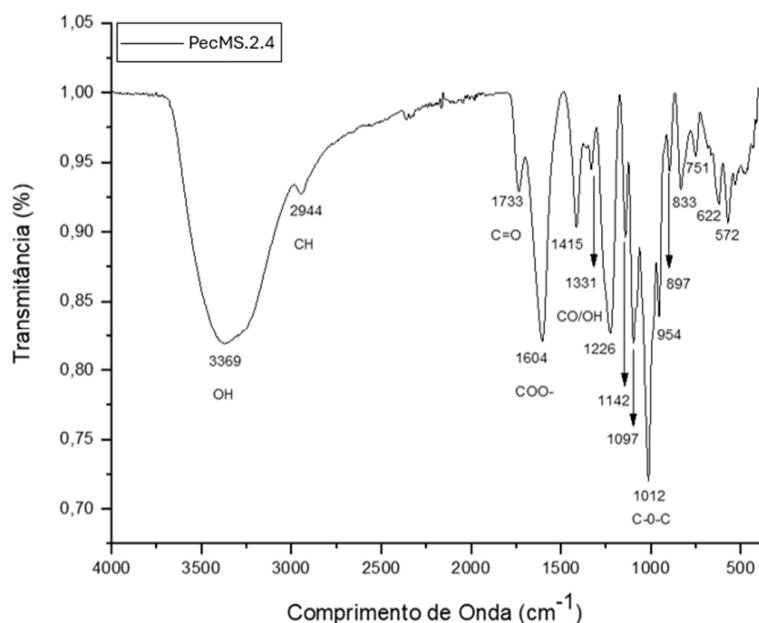
## 5. RESULTADOS

### 5.1 Caracterização Química

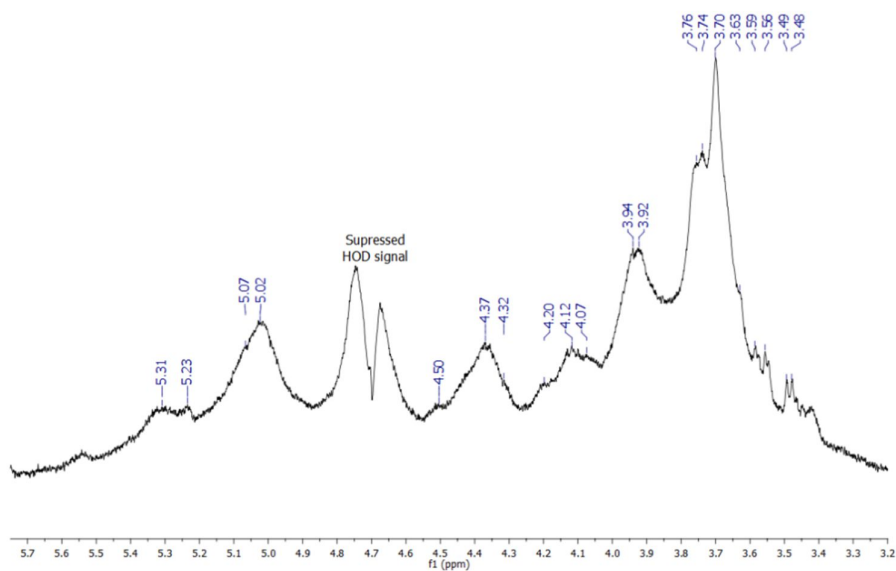
A caracterização da amostra de pectina sulfatada (PecMS2.4) foi realizada por espectroscopia vibracional de absorção na região do infravermelho (FT-IR), determinação do grau de sulfatação (DS) e espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de  $^1\text{H}$ ).

O espectro de FT-IR da amostra apresentou banda de absorção em  $3369\text{ cm}^{-1}$ , atribuída ao estiramento das ligações OH, característico das ligações de hidrogênio intra e intermoleculares da cadeia principal do ácido galacturônico (FREITAS et al., 2020; LIANG et al., 2022; ZHANG et al., 2022; PIMISA et al., 2024). O sinal em  $2944\text{ cm}^{-1}$  corresponde às ligações CH (incluindo  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$ ) (HUANG et al., 2020; LIANG et al., 2022; PIMISA et al., 2024). A banda em  $1733\text{ cm}^{-1}$  indica a presença de grupos  $\text{COOCH}_3$ , atribuída ao grupo carbonila. As bandas de estiramento assimétrico em  $1604\text{ cm}^{-1}$  e simétrico em  $1415\text{ cm}^{-1}$  são específicas do grupo carboxila ( $-\text{COOH}$ ). As bandas em  $1012$  e  $1142\text{ cm}^{-1}$  são referentes às vibrações das ligações C-O e C-C que constituem o anel de glicose (ZHANG et al., 2022). Além disso, as bandas entre  $1012$  e  $1097\text{ cm}^{-1}$  podem ser associadas a amostras de pectinas contendo anéis de furanose,  $\alpha$ -piranose e  $\beta$ -piranose (LIANG et al., 2022). Foram observadas também bandas em  $1226\text{ cm}^{-1}$ , atribuída ao estiramento assimétrico da ligação S=O, e em  $833\text{ cm}^{-1}$ , correspondente ao estiramento simétrico do grupo C-O-SO<sub>3</sub>, características da presença de grupos sulfato na molécula (CAPUTO; STRAUB; GRINSTAFF, 2019; FAN et al., 2012; HU et al., 2015) (Gráfico 1).

A determinação do grau de sulfatação (DS) resultou em um valor de 0.41 para a amostra de pectina sulfatada PecMS2.4.

**Gráfico 1** - Espectro de FT-IR da amostra PecMS2.4.

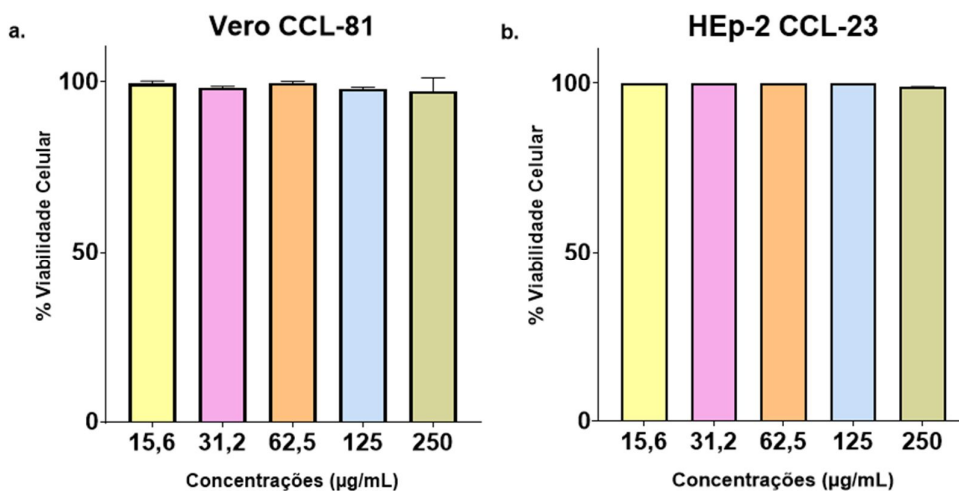
O espectro de RMN de <sup>1</sup>H da amostra PecMS2.4 apresentou sinais de hidrogênios em 5,07; 5,02\*; 4,50\*; 4,37; 4,32\*; 4,20\*; 4,07\*; 3,92; 3,76\*; 3,74; 3,70\* e 3,63 ppm, referentes a unidades sacarídicas sulfatadas (marcados com \*) ou não derivatizadas (Gráfico 2).

**Gráfico 2** - Espectro de RMN de <sup>1</sup>H da amostra PecMS2.4 (em D<sub>2</sub>O, com supressão do sinal da água).

## 5.2 Citotoxicidade

O composto PecMS2.4 não apresentou citotoxicidade até a maior concentração avaliada para células Vero e HEp-2, impossibilitando a determinação precisa do  $CC_{50}$  ( $CC_{50} > 250 \mu\text{g/mL}$ ) (Gráfico 3).

**Gráfico 3** - Citotoxicidade do composto PecMS2.4 em células Vero CCL-81 e HEp-2 CCL-23.



Citotoxicidade do composto PecMS2.4 em células (a) Vero CCL-81 e (b) HEp-2 CCL-23. Os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão de dois experimentos independentes. O valor de  $CC_{50}$  foi superior a  $250 \mu\text{g/mL}$  para ambas as linhagens.

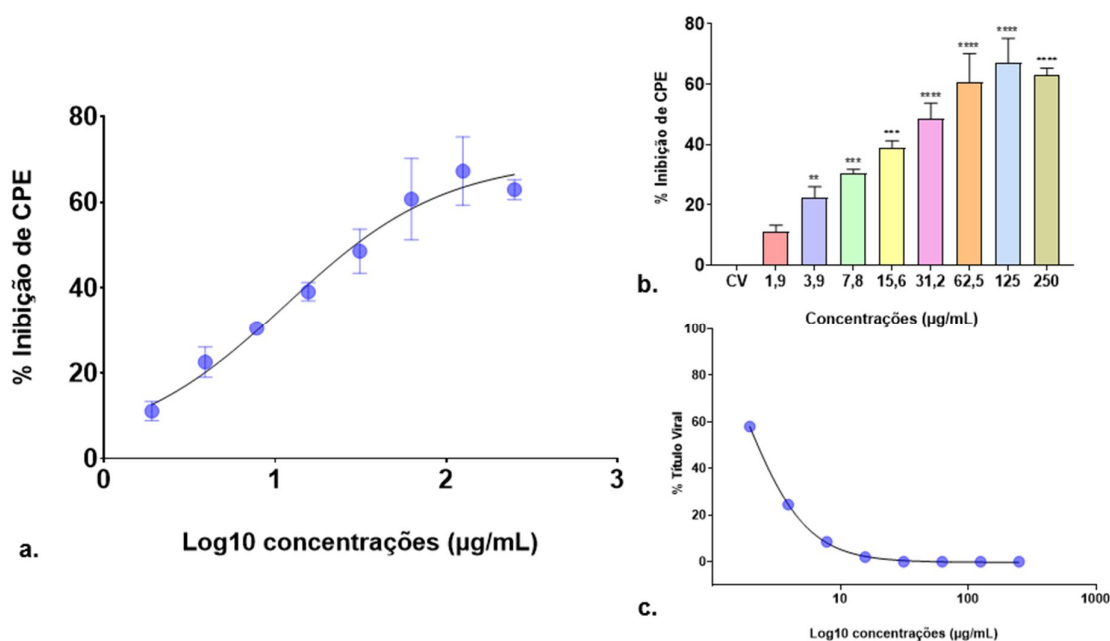
## 5.3 SARS-CoV-2

### 5.3.1 Triagem de Atividade Antiviral

O composto PecMS2.4 demonstrou atividade antiviral dose-dependente, com aumento progressivo da porcentagem de inibição de CPE conforme o aumento da concentração testada, com valores de inibição de 11%; 22,5%; 30,4%; 39,1%; 48,5%; 60,7%, 67,2% e 62,9%, nas concentrações de 1,9; 3,9; 7,8; 15,6; 31,2; 62,5; 125 e  $250 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente, apresentando um  $IC_{50}$  de  $40,7 \mu\text{g/mL}$ , calculado através de regressão linear ( $R^2 = 0,9891$ ). A análise por RT-qPCR demonstrou elevada redução da carga viral, corroborando os resultados observados no ensaio de CPE. (Gráfico 4). Os

valores de  $IC_{50}$  e  $CC_{50}$  possibilitaram o cálculo do IS, sendo determinado  $IS > 6,14$  (Tabela 4).

**Gráfico 4** - Triagem antiviral de PecMS2.4 contra SARS-CoV-2.



Atividade antiviral de PecMS2.4 contra SARS-CoV-2. (a) Curva dose-resposta da porcentagem de inibição de CPE em diferentes concentrações do composto. (b) % de inibição do CPE determinada pelo ensaio CellTiter-Glo®. (c) Redução da carga viral avaliada por RT-qPCR. Os dados representam média  $\pm$  desvio padrão de dois experimentos independentes. A significância estatística foi determinada por ANOVA *one-way* seguida do teste de Dunnett, comparando cada grupo tratado ao controle viral (CV) (\*\* representa  $p < 0,01$ ; \*\*\* representa  $p < 0,001$  e \*\*\*\* representa  $p < 0,0001$ ).

**Tabela 4** - Atividade citotóxica em células Vero e atividade antiviral de PecMS2.4 contra SARS-CoV-2.

| Composto | $CC_{50}$   | $IC_{50}$  | IS        |
|----------|-------------|------------|-----------|
| PecMS2.4 | > 250 µg/mL | 40,7 µg/mL | IS > 6,14 |

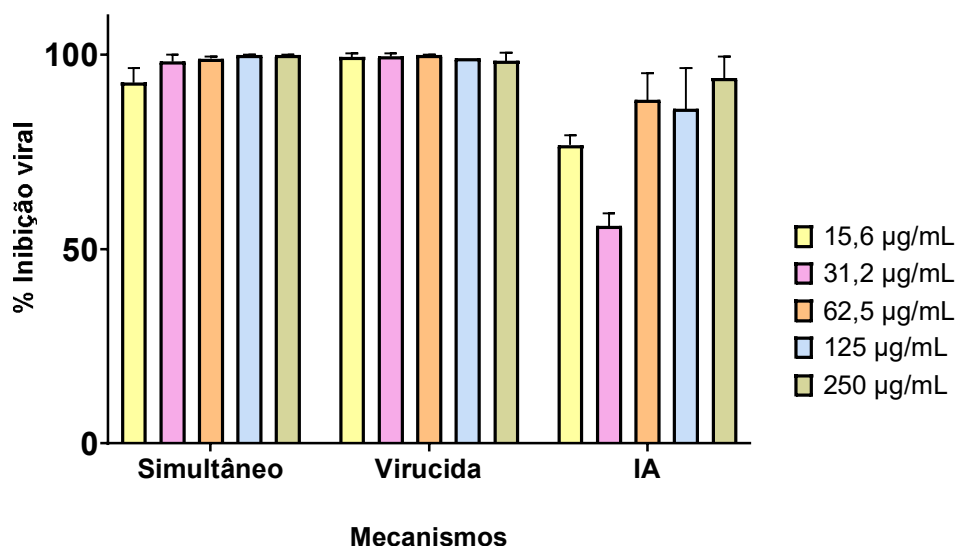
$CC_{50}$ : concentração citotóxica de 50%;  $IC_{50}$ : concentração inibitória de 50%; IS: índice de seletividade.

### 5.3.2 Mecanismo Antiviral

A investigação do mecanismo de ação de PecMS2.4 na replicação do SARS-CoV-2 foi realizada por meio dos ensaios simultâneo, virucida e inibição de adsorção viral.

O ensaio simultâneo (0h) demonstrou elevada atividade antiviral de PecMS2.4 contra SARS-CoV-2, com redução significativa da infecção viral e valores de inibição superiores a 90% em todas as concentrações testadas quando comparadas ao CV (ANOVA *one-way* seguida do teste de Dunnett;  $p < 0,0001$ ). Através do ensaio virucida, PecMS2.4 demonstrou atividade direta sobre a partícula viral, promovendo redução significativa da infecção, com inibição próxima a 100% em todas as concentrações avaliadas em comparação ao CV (ANOVA *one-way* seguida do teste de Dunnett;  $p < 0,0001$ ). Já no ensaio de inibição de adsorção, PecMS2.4 interferiu significativamente na adsorção do SARS-CoV-2 às células Vero, com inibição de 76,7%, 55,9%, 88,3%, 85,9% e 93,9%, respectivamente, nas concentrações de 15,6; 31,2; 62,5; 125 e 250 µg/mL. A diferença em relação ao CV foi significativa para todas as concentrações, sendo observados valores de  $p < 0,0001$  para 15,6; 62,5; 125 e 250 µg/mL e  $p < 0,001$  para 31,2 µg/mL (ANOVA *one-way* seguida do teste de Dunnett) (Gráfico 5).

**Gráfico 5** - Mecanismo de ação de PecMS2.4 na replicação do SARS-CoV-2, avaliado por TCID<sub>50</sub>.

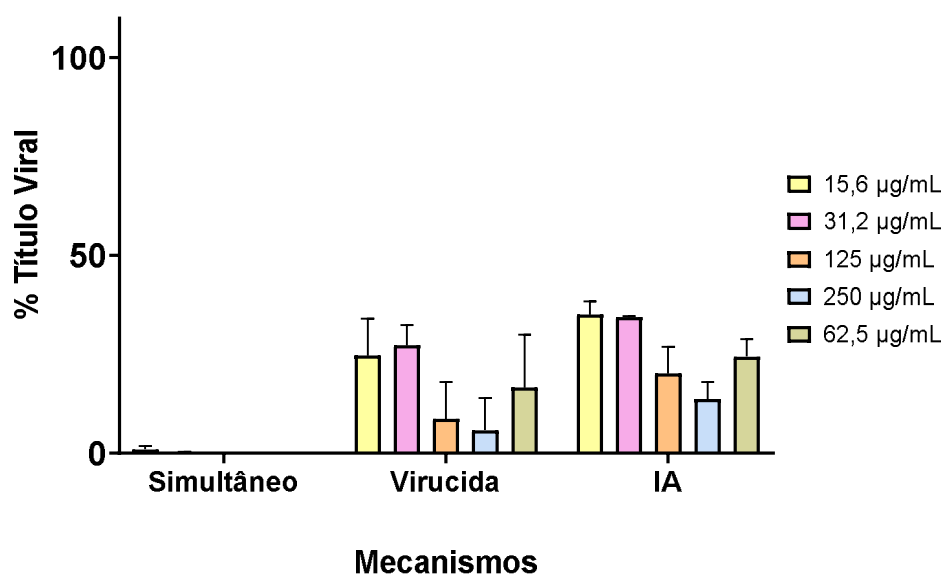


Atividade antiviral de PecMS2.4 no ensaio simultâneo (0h), Virucida e inibição de Adsorção (IA), avaliados por TCID<sub>50</sub>. As barras representam a média ± desvio padrão de dois experimentos

independentes. A significância estatística foi determinada por ANOVA *one-way* seguida do teste de comparações múltiplas de Dunnett, comparando cada concentração com o respectivo CV.

Os resultados obtidos por RT-qPCR confirmam os resultados encontrados nos ensaios anteriores, demonstrando redução significativa do título viral de SARS-CoV-2 nos três mecanismos de ação avaliados quando comparados ao CV. O tratamento simultâneo promoveu a maior redução do título viral em todas as concentrações testadas (ANOVA *one-way* seguida do teste de Dunnett;  $p < 0,0001$ ), seguido pelos ensaios de efeito virucida (ANOVA *one-way* seguida do teste de Dunnett;  $p < 0,001$ ) e de inibição da adsorção (ANOVA *one-way* seguida do teste de Dunnett;  $p < 0,0001$ ). No ensaio simultâneo, o título viral foi reduzido para valores inferiores a 2% do controle em todas as concentrações. No ensaio virucida, os títulos virais variaram aproximadamente entre 2% e 31% do CV, enquanto, no ensaio de inibição da adsorção, variaram entre aproximadamente 11% e 37% (Gráfico 6).

**Gráfico 6** - Mecanismo de ação de PecMS2.4 na replicação do SARS-CoV-2, avaliado por RT-qPCR.



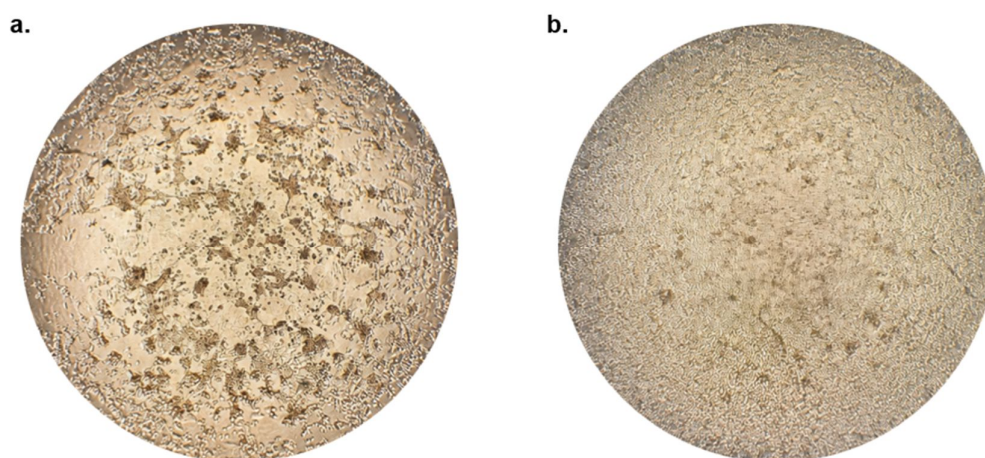
Atividade antiviral de PecMS2.4 no ensaio simultâneo (0h), Virucida e inibição de Adsorção (IA), avaliados por RT-qPCR. As barras representam a média  $\pm$  desvio padrão das réplicas experimentais. A significância estatística foi determinada por ANOVA *one-way* seguida do teste de comparações múltiplas de Dunnett, comparando cada concentração com o respectivo CV.

## 5.4 RSV

### 5.4.1 Triagem de Atividade Antiviral

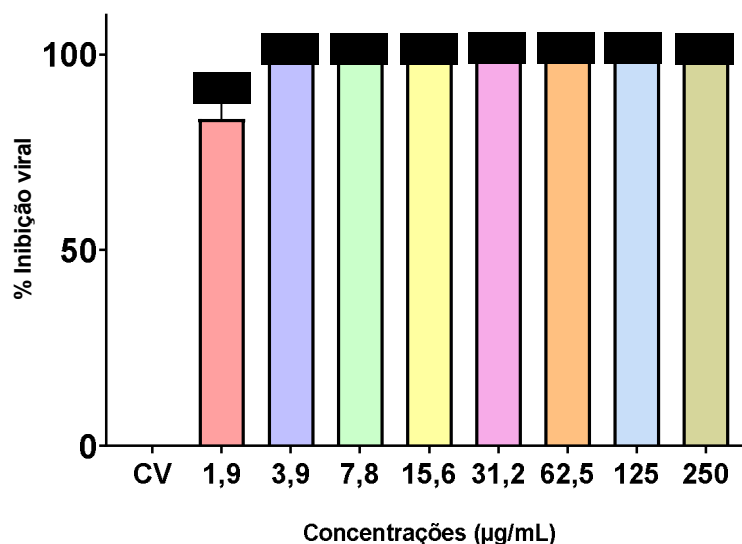
O composto PecMS2.4 apresentou elevada e significativa atividade antiviral contra RSV (ANOVA *one-way* seguida do teste de Dunnett;  $p < 0,0001$ ), reduzindo o ECP induzido pelo vírus em todas as concentrações testadas quando comparado ao CV (Figura 8). Foram observadas porcentagens de inibição de 100% nas concentrações entre 3,9 e 250  $\mu\text{g/mL}$  e superiores a 80% na menor concentração testada (1,9  $\mu\text{g/mL}$ ) (Gráfico 7).

**Figura 8** - Efeito antiviral da PecMS2.4 sobre o ECP induzido pelo RSV em células HEp-2.



(a) Controle viral (CV), evidenciando intenso ECP caracterizado pela formação de sincícios. (b) Células tratadas com PecMS2.4 (250  $\mu\text{g/mL}$ ), demonstrando inibição do ECP e preservação da monocamada celular.

**Fonte:** Autoria própria.

**Gráfico 7** - Triagem antiviral de PecMS2.4 contra RSV.

Atividade antiviral do composto PecMS2.4 contra RSV determinada pelo ensaio de MTT. O composto apresentou  $IC_{50} < 1,9 \mu\text{g/mL}$ . Os dados representam média  $\pm$  desvio padrão de dois experimentos independentes. A significância estatística foi determinada por ANOVA *one-way* seguida do teste de Dunnett, comparando cada grupo tratado ao controle viral (CV) (\*\*\*\* representa  $p < 0,0001$ ).

O composto apresentou  $IC_{50}$  inferior à menor concentração avaliada ( $IC_{50} < 1,9 \mu\text{g/mL}$ ), indicando forte potencial antiviral contra RSV. Os valores de  $IC_{50}$  e  $CC_{50}$  permitiram o cálculo do IS, sendo determinado  $IS > 131$  (Tabela 5).

**Tabela 5** - Atividade citotóxica em células HEp-2 e atividade antiviral de PecMS2.4 contra RSV.

| Composto        | $CC_{50}$              | $IC_{50}$              | IS           |
|-----------------|------------------------|------------------------|--------------|
| <b>PecMS2.4</b> | $> 250 \mu\text{g/mL}$ | $< 1,9 \mu\text{g/mL}$ | $IS > 131,6$ |

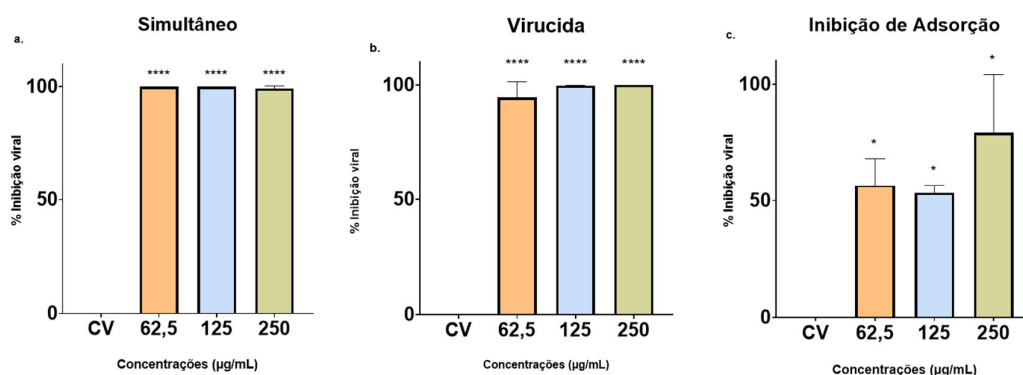
$CC_{50}$ : concentração citotóxica de 50%;  $IC_{50}$ : concentração inibitória de 50%; IS: índice de seletividade.

#### 5.4.2 Mecanismo Antiviral

A investigação do mecanismo de ação da PecMS2.4 na replicação do RSV foi realizada por meio dos ensaios simultâneo (0 h), virucida e de inibição da adsorção viral.

Através do ensaio simultâneo (0h) foi observada elevada e significativa atividade antiviral do composto PecMS2.4 em todas as concentrações testadas, com porcentagens de inibição viral superiores a 98%, quando comparadas ao CV (ANOVA *one-way* seguida do teste de Dunnett;  $p < 0,0001$ ). No ensaio virucida, o composto também demonstrou elevada e significativa atividade antiviral, com porcentagens de inibição variando entre aproximadamente 90% e 100% nas concentrações avaliadas, quando comparadas ao CV (ANOVA *one-way* seguida do teste de Dunnett;  $p < 0,0001$ ). Já no ensaio de inibição da adsorção, PecMS2.4 foi capaz de interferir na etapa inicial da infecção pelo RSV, apresentando porcentagens de inibição acima de 50% em todas as concentrações testadas, quando comparadas ao CV (ANOVA *one-way* seguida do teste de Dunnett;  $p < 0,05$ ) (Gráfico 8).

**Gráfico 8** - Mecanismo de ação de PecMS2.4 na replicação do RSV, avaliado por TCID<sub>50</sub> e MTT.

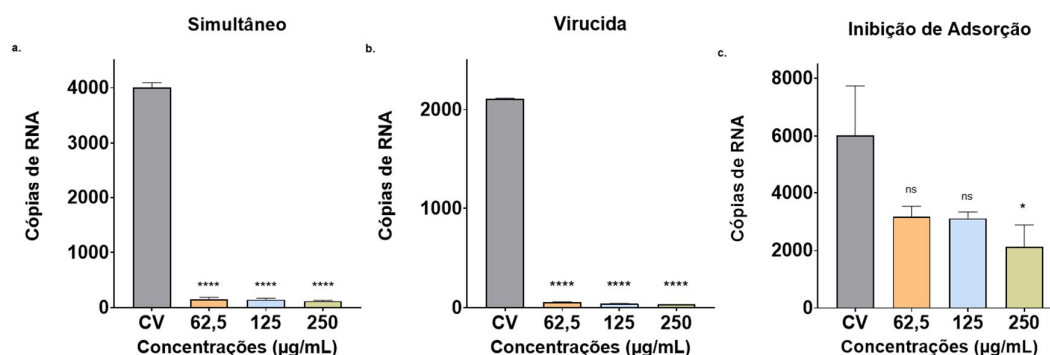


Atividade antiviral da PecMS2.4 nos ensaios (a) simultâneo, (b) virucida e (c) inibição da adsorção (IA), avaliadas por TCID<sub>50</sub> e MTT. As barras representam a média ± desvio-padrão das réplicas experimentais. A significância estatística foi determinada por ANOVA *one-way* seguida do teste de comparações múltiplas de Dunnett, comparando cada concentração com o respectivo CV. \* $p < 0,05$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

Os resultados obtidos por RT-qPCR corroboraram os achados nos ensaios anteriores, demonstrando redução da carga viral do RSV após o tratamento com PecMS2.4 (Gráfico 9). No ensaio simultâneo, foi observada redução significativa da carga viral em todas as concentrações avaliadas quando comparadas ao controle viral (ANOVA *one-way* seguida do teste de Dunnett;  $p < 0,0001$ ). De forma semelhante, no ensaio virucida, todas as concentrações testadas promoveram redução significativa da carga viral em relação ao controle viral (ANOVA *one-way* seguida do teste de Dunnett;  $p < 0,0001$ ). No ensaio de inibição da adsorção, também foi observada redução da carga

viral em todas as concentrações avaliadas, entretanto, apenas a concentração de 250 µg/mL apresentou diferença estatisticamente significativa em comparação ao controle viral (ANOVA *one-way* seguida do teste de Dunnett;  $p < 0,05$ ).

**Gráfico 9** - Mecanismo de ação de PecMS2.4 na replicação do RSV, avaliado por RT-qPCR.



Quantificação da carga viral por meio do número de cópias de RNA viral nos ensaios (a) simultâneo, (b) virucida e (c) inibição da adsorção. As barras representam a média  $\pm$  desvio-padrão das réplicas experimentais. A análise estatística foi realizada por ANOVA *one-way* seguida do teste de Dunnett, utilizando o controle viral (CV) como grupo de comparação. \* $p < 0,05$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

## 6. DISCUSSÃO

A constante emergência de patógenos virais de impacto global, como observado recentemente com a pandemia de SARS-CoV-2, somada à morbidade associada à infecção por RSV em populações vulneráveis, evidencia a necessidade de investigação e desenvolvimento de intervenções terapêuticas seguras, acessíveis e de amplo espectro (DE CLERCQ; LI, 2016; HU et al., 2021). Nesse contexto, a utilização de produtos naturais para fins medicinais possui um extenso histórico mundial. Dentre as diferentes fontes naturais disponíveis, as fontes vegetais destacam-se como potenciais para a descoberta de novos agentes terapêuticos, devido à grande diversidade química e estrutural que apresentam (THOMAS et al., 2021; EKIERT; SZOPA, 2020). Com isso, a bioprospecção de produtos naturais tem se consolidado como uma importante estratégia na busca por novos antivirais, com destaque para os polissacarídeos sulfatados devido ao seu potencial antiviral de amplo espectro (KWON et al., 2020).

Nesse cenário, o presente trabalho investigou a citotoxicidade e o potencial antiviral de uma pectina quimicamente sulfatada extraída da casca do fruto de *P. edulis* em células Vero e HEp-2 contra a infecção por SARS-CoV-2 e RSV, respectivamente. Os resultados obtidos demonstraram elevada atividade antiviral *in vitro*, associada à baixa citotoxicidade nas linhagens celulares avaliadas. Além disso, a investigação preliminar do mecanismo de ação sugere que a PecMS2.4 atua nas etapas iniciais da infecção viral *in vitro*, corroborando com o principal mecanismo de ação antiviral proposto pelos polissacarídeos sulfatados.

A avaliação da toxicidade celular é uma etapa limitante e indispensável na identificação e investigação de novos agentes antivirais, garantindo que a inibição viral observada não seja uma consequência da toxicidade celular inespecífica ou do comprometimento da célula hospedeira (COS et al., 2006). Estudos com polissacarídeos sulfatados obtidos de espécies da Caatinga (*Adenanthera pavonina*, *Dimorphandra gardneriana* e *Caesalpinia ferrea*) não apresentaram citotoxicidade nas concentrações testadas (25, 50 e 100 µg/mL) em células Vero (MARQUES et al., 2015). Além disso, extratos de *Passiflora edulis* também demonstraram baixa toxicidade em células Vero, com valores de CC<sub>50</sub> de 400 e 500 µg/mL para os extratos aquoso e etanólico, respectivamente (JABAREEN; HULEIHIL; HULEIHEL, 2013). Em células HEp-2, uma pectina natural isolada de frutos de *Inga* spp. apresentou CC<sub>50</sub> de 870 µg/mL (DE GODOI et al., 2019), enquanto uma pectina sulfatada extraída da casca de *Mangifera indica* não apresentou citotoxicidade em concentrações de até 2000 µg/mL (BARBOZA et al., 2024). Dessa forma, os resultados obtidos para PecMS2.4, com CC<sub>50</sub> superior a 250 µg/mL nas linhagens Vero e HEp-2, demonstram baixa toxicidade celular,

reforçando o perfil já descrito para polissacarídeos naturais e derivados sulfatados, incluindo pectinas, que são heteropolissacarídeos complexos, indicando que a atividade antiviral observada não está associada à toxicidade celular.

Os polissacarídeos naturais derivados de animais, plantas, algas, fungos e microrganismos são amplamente reconhecidos por suas múltiplas atividades biológicas, incluindo atividades anticoagulante, antidiabética, antioxidante, antitumoral, imunomoduladora, anti-inflamatória e, especialmente, antiviral (CLAUS-DESBONNET et al., 2022). Polissacarídeos sulfatados naturalmente encontrados em organismos, especialmente em algas marinhas, vêm sendo amplamente descritos na literatura por apresentarem atividade antiviral contra um amplo espectro de vírus (WEI et al., 2022). Estudos demonstraram que iota-carragenana e lambda-carragenana, ambos polissacarídeos sulfatados derivados de alga marinha vermelha, apresentaram efetiva atividade antiviral contra SARS-CoV-2, apresentando  $IC_{50} = 0.046 \mu\text{g/mL}$  e  $IC_{50} = 0.9 \pm 1.1 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente (MOROKUTTI-KURZ et al., 2021; JANG et al., 2021). Fucanas extraídas de alga marinha marrom (*Cystoseira indica*) também demonstraram atividade antiviral contra RSV, com  $IC_{50} < 0,75 \mu\text{g/mL}$  (JANA et al., 2024).

Em contrapartida, polissacarídeos naturalmente sulfatados com propriedades antivirais são incomuns em plantas terrestres. Dessa forma, a modificação química de compostos naturais, como a adição de grupos sulfato, representa uma alternativa valiosa no desenvolvimento de agentes terapêuticos antivirais (PEREIRA et al., 2025). O presente trabalho avaliou o efeito de uma pectina sulfatada como uma alternativa particularmente promissora devido à sua origem vegetal, elevada biocompatibilidade, baixa toxicidade e ampla disponibilidade a partir de fontes renováveis. A sulfatação de pectinas naturais permite modular a densidade de cargas negativas e, conseqüentemente, otimizar a interação com proteínas virais e receptores celulares envolvidos nos estágios iniciais da infecção. A presença de grupos sulfato e regiões ricas em ácido galacturônico confere às pectinas sulfatadas a capacidade de interagir eletrostaticamente com glicoproteínas virais e proteoglicanos de superfície celular, impedindo a entrada dos vírus nas células (efeito virucida, ligação a receptores celulares e inibição da adsorção). Essa característica de inibição em mais de uma etapa da infecção favorece a obtenção de compostos com amplo espectro antiviral, especialmente contra vírus envelopados (PEREIRA et al., 2025).

Barboza et al. (2024) reportaram que uma pectina natural de *M. indica* não apresentou atividade contra RSV, entretanto, seu derivado sulfatado foi capaz de inibir efetivamente a infecção viral, até mesmo em baixas concentrações testadas, apresentando  $IC_{50} = 0.77 \pm 0.11 \mu\text{g/mL}$ . Os autores sugerem que o mecanismo de ação do composto sulfatado está associado principalmente à inibição das etapas iniciais da

infecção viral, apresentando elevada eficácia nos ensaios de tratamento simultâneo e de IA, indicando sua capacidade de bloquear a interação entre o vírus e os receptores celulares. Além disso, foi observada potente atividade virucida, decorrente da interação direta com partículas virais, levando à sua inativação. Resultados semelhantes foram observados no presente estudo, no qual o derivado sulfatado PecMS2.4 apresentou elevada atividade antiviral contra RSV, com  $IC_{50}$  inferior a 1,9  $\mu\text{g/mL}$ , além de eficácia nos ensaios simultâneo, virucida e de inibição da adsorção. Embora comparações diretas entre os valores de  $IC_{50}$  obtidos em diferentes estudos devam ser interpretadas com cautela, devido às diferenças nas metodologias empregadas, como ensaios de tratamento simultâneo ou de tratamento contínuo durante o ciclo replicativo viral, os resultados obtidos no presente estudo demonstram a elevada atividade antiviral da PecMS2.4, corroborando o potencial dos polissacarídeos sulfatados como agentes antivirais descrito na literatura.

Com relação à atividade antiviral contra SARS-CoV-2, embora a literatura apresente diversas referências quanto ao estudo de polissacarídeos sulfatados de origem marinha, assim como de origem animal, como heparina e derivados (KWON et al., 2020), há uma escassez de estudos avaliando a eficácia de moléculas de plantas quimicamente sulfatadas, especialmente pectinas frente a esse patógeno. Portanto, a demonstração da atividade inibitória do PecMS2.4 contra o SARS-CoV-2 constitui um importante achado.

A eficácia e a segurança de potenciais agentes antivirais são frequentemente expressas pelo Índice de Seletividade (IS), que reflete a relação entre a toxicidade celular e a atividade inibitória (COS et al., 2006). Pal et al. (2026) avaliaram galactanas sulfatadas derivadas de *Gracilaria corticata*, demonstrando IS variando de > 16,26 a > 185,18 para HSV-1, e 4,78 a > 27,73 para RSV. Krylova et al. (2025) avaliaram carragenanas e derivados com atividade antiviral contra SARS-CoV-2 em diferentes etapas da infecção, obtendo valores de IS variando de 1,5 até 77. Adicionalmente, De Godoi et al. (2019) reportaram um IS de 4,86 para pectina natural contra HSV-1 e de 15,0 para poliovírus (PV). Os resultados obtidos no presente estudo corroboram esses dados da literatura. Para RSV, o composto apresentou elevado IS (> 131,6), indicando forte atividade antiviral associada à baixa citotoxicidade celular. Em contrapartida, frente ao SARS-CoV-2, foi observado IS > 6,14, sugerindo seletividade moderada do composto para esse vírus. Entretanto, é importante destacar que o valor de  $CC_{50}$  obtido foi superior à maior concentração testada (> 250  $\mu\text{g/mL}$ ), indicando que o IS calculado representa um valor mínimo estimado. Dessa forma, o IS real do composto pode ser superior ao observado experimentalmente. Com isso, mesmo apresentando menor seletividade frente ao SARS-CoV-2 em comparação ao RSV, PecMS2.4 foi capaz de

promover redução significativa do efeito citopático e da carga viral, demonstrando potencial antiviral relevante.

Os polissacarídeos sulfatados vêm sendo amplamente descritos na literatura por atuarem em diferentes etapas do ciclo viral, especialmente nas etapas iniciais da infecção (RAY et al., 2022). O mecanismo antiviral desses compostos está frequentemente associado ao seu caráter polianiónico, devido a presença de grupos sulfato carregados negativamente, capazes de promover interações eletrostáticas com glicoproteínas presentes no envelope viral (LU et al., 2021). Estudos indicam que essas interações podem bloquear a ligação do vírus à célula hospedeira por meio do mimetismo de receptores celulares, como heparan sulfato (HS) (JABEEN et al., 2021; RAY et al., 2022). Em vírus respiratórios, como SARS-CoV-2 e RSV, proteínas de superfície viral utilizam os HS como pontos iniciais de ancoragem na célula hospedeira. Dessa forma, as moléculas sulfatadas presentes no ambiente extracelular atuam como análogos competitivos, funcionando como “iscas moleculares” que se ligam às partículas virais livres (CLAUS-DESBONNET et al., 2022; KWON et al., 2020). Além do bloqueio físico direto, essa interação com o vírion pode exercer um potente efeito virucida. Ao saturar e envelopar as glicoproteínas de superfície viral, mascarando suas cargas positivas, os polissacarídeos sulfatados podem induzir também alterações conformacionais irreversíveis na partícula viral, inativando-a permanentemente antes mesmo que ocorra qualquer contato com a membrana da célula hospedeira (JABEEN et al., 2021).

Corroborando os mecanismos descritos na literatura, os ensaios realizados com o PecMS2.4 demonstraram uma elevada eficácia para ambos os vírus. No ensaio simultâneo (0h), o composto apresentou elevada atividade antiviral contra SARS-CoV-2 e RSV, com inibição acima de 90% para SARS-CoV-2 e valores próximos ou atingindo 100% de inibição para RSV, em todas as concentrações testadas. Adicionalmente, os ensaios de IA indicaram que PecMS2.4 interfere na etapa inicial da infecção por ambos os vírus, com inibição acima de 50% em todas as concentrações testadas para SARS-CoV-2 e RSV. A eficiente inibição frente ambos os vírus foi ainda confirmada pelo ensaio virucida, em que PecMS2.4 demonstrou atividade direta sobre as partículas virais, promovendo uma inativação praticamente total dos vírions em todas as concentrações testadas para SARS-CoV-2, e inibição variando entre 90% e 100% nas concentrações testadas para RSV.

Resultados semelhantes aos encontrados no presente estudo vêm sendo descritos para diferentes polissacarídeos sulfatados com atividade antiviral contra diversos vírus envelopados. Pastilhas contendo iota-carragenana derivado de alga vermelha demonstraram capacidade de inibir a atividade viral do coronavírus humano

hCoV-OC43, sendo que a eficácia desse polissacarídeo foi atribuída ao seu caráter polianiônico, inibindo a adsorção viral (MOROKUTTI-KURZ; GRAF; PRIESCHL-GRASSAUER, 2017). Kwon et al. (2020) demonstraram que frações de fucoídano de alga marrom *Saccharina japonica* inibiram eficientemente a entrada do SARS-CoV-2 em células Vero devido a interações multivalentes entre o polissacarídeo e as partículas virais. Carragenanas de *Gigartina atropurpurea* e fucoídanos sulfatados de *Undaria pinnatifida* e *Splachnidium rugosum*, foram capazes de inativar diretamente HSV-2, indicando atividade virucida (HARDEN et al., 2009). Jang et al. (2021) identificaram uma lambda-carragenana com potente inibição contra SARS-CoV-2 e Influenza A e B, impedindo a ligação viral aos receptores celulares. Fucoídanos sulfatados provenientes de *Laminaria japonica* já demonstraram atividade antiviral contra adenovírus devido ao caráter polianiônico da molécula, capaz de mascarar o vírus ou regiões positivamente carregadas da superfície celular (SUN et al., 2018). Dessa forma, os dados obtidos para PecMS2.4 demonstram comportamento compatível com o perfil antiviral já estabelecido na literatura para polissacarídeos sulfatados, especialmente aqueles que atuam por bloqueio das etapas iniciais do ciclo replicativo viral.

A atividade dos polissacarídeos sulfatados depende de parâmetros como grau de sulfatação, massa molecular e características conformacionais, sendo estes fatores-chave para a eficácia da atividade antiviral (JABEEN et al., 2021). Nesse contexto, a caracterização estrutural realizada no presente estudo confirmou a obtenção de um derivado sulfatado de pectina. Os espectros de FT-IR obtidos para a amostra PecMS2.4 apresentaram perfil compatível com o descrito para pectinas sulfatadas na literatura (CAPUTO; STRAUB; GRINSTAFF, 2019; FAN et al., 2012; HU et al., 2015; LIANG et al., 2022; ZHANG et al., 2022). Além dos sinais característicos que identificam o polissacarídeo pectina conforme descritos anteriormente, ao fazer a comparação da região espectral característica de polissacarídeos entre 800-1300  $\text{cm}^{-1}$  (LIANG et al., 2022) do espectro da amostra de PecMS2.4 do presente estudo com espectros da pectina extraída de maracujá presentes na literatura, notam-se que existem dois sinais mais intensos presentes no espectro da amostra de PecMS2.4, não observados nos espectros comparados da literatura. Sendo assim, destaca-se no espectro de IV de PecMS2.4 o sinal em 1226  $\text{cm}^{-1}$  indicativo de ligação do tipo S=O (assimétrica) e o sinal em 833  $\text{cm}^{-1}$  indicativo do sistema do tipo C-O-SO<sub>3</sub> (simétrica) (CAPUTO; STRAUB; GRINSTAFF, 2019; FAN et al., 2012; HU et al., 2015).

Com relação ao grau de sulfatação (DS), segundo a literatura, é um indicativo de que os grupos sulfatos foram inseridos na molécula de polissacarídeo (CAPUTO; STRAUB; GRINSTAFF, 2019). Sendo assim, no presente estudo, utilizou-se da metodologia A do trabalho de Dodgson e Price (1962), obtendo-se por meio do teste

turbidimétrico ( $\text{BaCl}_2$ -Gelatina) um DS de 0.41 para a amostra de pectina sulfatada PecMS2.4. Os resultados de IV e DS apontam a inserção de grupos sulfato na molécula de pectina PecMS2.4. Já a análise por RMN de  $^1\text{H}$  apresentou espectro compatível com o descrito na literatura para pectina sulfatada (ZHANG et al., 2022), sendo observados sinais de hidrogênio em regiões características de unidades sacarídicas sulfatadas e não derivatizadas.

O valor de DS obtido para a PecMS2.4 encontra-se dentro da faixa descrita para outros derivados de pectina quimicamente sulfatados com atividade biológica, para os quais têm sido reportados na literatura valores entre aproximadamente 0.12 e 1.41, dependendo da origem da pectina e das metodologias empregadas na sulfatação (JIAO et al., 2023). Em estudo recente, Barboza et al. (2024) relataram para um derivado sulfatado de pectina de *M. indica* um DS de 0.5, valor próximo ao obtido no presente estudo, sendo ambos os derivados capazes de apresentar elevada atividade antiviral. Dessa forma, o valor de DS obtido para a PecMS2.4 é compatível com aqueles descritos para outros derivados sulfatados com atividade biológica reportados na literatura.

Do ponto de vista estrutural e biológico, a confirmação da presença de grupos sulfato na molécula de PecMS2.4 ajuda a explicar os expressivos resultados antivirais observados no presente estudo. Esses achados sugerem que PecMS2.4 pode atuar através de interações eletrostáticas entre seus grupos sulfatos negativamente carregados e regiões positivamente carregadas presentes nas glicoproteínas virais ou receptores celulares. Dessa forma, PecMS2.4 possivelmente atua mimetizando moléculas presentes na superfície celular, como heparan sulfato, funcionando como uma barreira molecular capaz de sequestrar partículas virais e impedir sua interação com receptores celulares essenciais para entrada viral. Além do bloqueio competitivo da adsorção viral, a interação direta do composto com partículas virais livres pode promover também a inativação do vírion, justificando a ação virucida observada e interferindo no ciclo replicativo logo em suas etapas iniciais mais críticas.

Embora os resultados obtidos sugiram que PecMS2.4 atue predominantemente nas etapas iniciais da infecção viral, estudos demonstram que polissacarídeos sulfatados também podem interferir em outras fases do ciclo replicativo, incluindo processos intracelulares relacionados à transcrição, replicação, montagem e liberação de partículas virais, além de apresentarem possível atividade imunomoduladora (LU et al., 2021). Barboza et al. (2024), ao avaliarem uma pectina sulfatada derivada de *M. indica*, observaram atividade antiviral não apenas nas etapas iniciais, mas também em fases intermediárias da infecção pelo RSV. Dessa forma, embora os resultados do presente estudo indiquem ação predominante de PecMS2.4 nas etapas iniciais da infecção, a possibilidade de atuação em outros mecanismos não pode ser descartada,

sendo necessários estudos futuros para melhor compreensão de seus alvos moleculares e mecanismos antivirais envolvidos.

## 7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que a pectina quimicamente sulfatada PecMS2.4 apresentou promissora atividade antiviral *in vitro* frente à infecção por RSV e SARS-CoV-2, associada à baixa citotoxicidade nas linhagens celulares avaliadas.

PecMS2.4 demonstrou elevada atividade antiviral seletiva para RSV e SARS-CoV-2 *in vitro*, atuando como virucida e inibindo a adsorção viral às células HEp-2 e Vero, respectivamente.

A caracterização estrutural evidenciou uma cadeia polissacarídica de ácido galacturônico, com presença de grupos funcionais típicos de pectinas, incluindo carbonilas, carboxilas e unidades de glicose em diferentes conformações (furanose,  $\alpha$ - e  $\beta$ -piranose). A sulfatação foi confirmada por espectroscopia, com indicação de ligações do tipo S=O e C–O–SO<sub>3</sub>, corroborando a modificação química da molécula.

Dessa forma, os achados reforçam o potencial biotecnológico de pectinas sulfatadas, derivados da casca do maracujá, espécie *Passiflora edulis*, nativa da América do Sul, como candidatas ao desenvolvimento de novos agentes antivirais para vírus respiratórios importantes na saúde pública.

Estudos complementares são necessários para avaliar novos mecanismos de ação, após a infecção viral, além de avaliar a eficácia de PecMS2.4 em modelos *in vivo*.

## REFERÊNCIAS

- ADEJUMO, Seun Adegboyega; CHUKWUMA, Henry; EKWEBENE, Onyeka Chukwudalu. SARS-CoV-2 subvariant xec: emerging challenges amidst the global decline of kp. 3.1. 1. **BMC Research Notes**, v. 18, n. 1, p. 322, 2025.
- ADHIKARI, Bikash et al. Potential roles of medicinal plants for the treatment of viral diseases focusing on COVID-19: A review. **Phytotherapy Research**, v. 35, n. 3, p. 1298-1312, 2021.
- ALVAREZ DE TOLEDO, María et al. Antiviral therapies for respiratory syncytial virus infection: current expectations. **Current Opinion in Infectious Diseases**, 2026.
- ANDERSON, Larry J. et al. Functional features of the respiratory syncytial virus G protein. **Viruses**, v. 13, n. 7, p. 1214, 2021.
- ARYA, Rimanshee et al. Structural insights into SARS-CoV-2 proteins. **Journal of molecular biology**, v. 433, n. 2, p. 166725, 2021.
- ASSERI, Ali Alsheel. Respiratory syncytial virus: a narrative review of updates and recent advances in epidemiology, pathogenesis, diagnosis, management and prevention. **Journal of Clinical Medicine**, v. 14, n. 11, p. 3880, 2025.
- BAI, Chongzhi; ZHONG, Qiming; GAO, George Fu. Overview of SARS-CoV-2 genome-encoded proteins. **Science China Life Sciences**, v. 65, n. 2, p. 280-294, 2022.
- BAI, Zhihua et al. The SARS-CoV-2 nucleocapsid protein and its role in viral structure, biological functions, and a potential target for drug or vaccine mitigation. **Viruses**, v. 13, n. 6, p. 1115, 2021.
- BARBOZA, Mario Gabriel Lopes et al. In vitro antiviral effect of sulfated pectin from *Mangifera indica* against the infection of the viral agent of childhood bronchiolitis (Respiratory Syncytial Virus-RSV). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 280, p. 135387, 2024.
- BATTLES, Michael B.; MCLELLAN, Jason S. Respiratory syncytial virus entry and how to block it. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 4, p. 233-245, 2019.
- BEIGEL, John H. et al. Remdesivir for the treatment of Covid-19. **New England Journal of Medicine**, v. 383, n. 19, p. 1813-1826, 2020.
- BENDER, Rose Grace et al. Global, regional, and national incidence and mortality burden of non-COVID-19 lower respiratory infections and aetiologies, 1990–2021: a systematic analysis from the Global Burden of Disease Study 2021. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 24, n. 9, p. 974-1002, 2024.
- BERGERON, Harrison C. et al. Respiratory syncytial virus (RSV) G protein vaccines with central conserved domain mutations induce CX3C-CX3CR1 blocking antibodies. **Viruses**, v. 13, n. 2, p. 352, 2021.

- BERNACCI, Luís Carlos et al. Passifloraceae. **Flora fanerogâmica do estado de São Paulo**, v. 3, p. 247-274, 2003.
- BLYTH, Christopher C. et al. Respiratory syncytial virus epidemiology and effectiveness of infant nirsevimab: 2024 results from the Australian Sentinel Hospital Network (FluCAN-PAEDS). **Eurosurveillance**, v. 31, n. 2, p. 2500275, 2026.
- BONCRISTIANI, H. F.; CRIADO, M. F.; ARRUDA, E. Respiratory viruses. **Encyclopedia of microbiology**, p. 500, 2009.
- BRANT, Ayslan Castro et al. SARS-CoV-2: from its discovery to genome structure, transcription, and replication. **Cell & bioscience**, v. 11, n. 1, p. 136, 2021.
- CAO, Dongdong; GAO, Yunrong; LIANG, Bo. Structural insights into the respiratory syncytial virus RNA synthesis complexes. **Viruses**, v. 13, n. 5, p. 834, 2021.
- CAPUTO, Hannah E.; STRAUB, John E.; GRINSTAFF, Mark W. Design, synthesis, and biomedical applications of synthetic sulphated polysaccharides. **Chemical Society Reviews**, v. 48, n. 8, p. 2338-2365, 2019.
- CARDONE, C. *et al.* A structural and dynamic analysis of the partially disordered polymerase-binding domain in rsv phosphoprotein. **Biomolecules**, [S. l.], v. 11, n. 8, p. 1225, 2021.
- CARVAJAL, Jonatan J. et al. Host components contributing to respiratory syncytial virus pathogenesis. **Frontiers in immunology**, v. 10, p. 2152, 2019.
- CERQUEIRA-SILVA, Thiago et al. Influence of age on the effectiveness and duration of protection of Vaxzevria and CoronaVac vaccines: A population-based study. **The Lancet Regional Health–Americas**, v. 6, 2022.
- CEVIK, Muge et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) transmission dynamics should inform policy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 73, n. Supplement\_2, p. S170-S176, 2021.
- CHAI, Khai Li et al. SARS-CoV-2-neutralising monoclonal antibodies for treatment of COVID-19. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 9, 2021.
- CHANOCK, R. *et al.* Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA): Epidemiologic aspects of infection in infants and young children. **American Journal of Epidemiology**, [S. l.], v. 66, n. 3, p. 281–290, 1957.
- CHEN, Ling; HUANG, Gangliang. The antiviral activity of polysaccharides and their derivatives. **International journal of biological macromolecules**, v. 115, p. 77-82, 2018.
- CHENG, X. *et al.* Overexpression of the M2-2 Protein of Respiratory Syncytial Virus Inhibits Viral Replication. **Journal of Virology**, [S. l.], v. 79, n. 22, p. 13943–13952, 2005.
- CHENG, X. *et al.* Overexpression of the M2-2 Protein of Respiratory Syncytial Virus Inhibits Viral Replication. **Journal of Virology**, [S. l.], v. 79, n. 22, p. 13943–13952, 2005.

- CLAUS-DESBONNET, Hadrien et al. Polysaccharides and their derivatives as potential antiviral molecules. **Viruses**, v. 14, n. 2, p. 426, 2022.
- COLLINS, Peter L.; GRAHAM, Barney S. Viral and host factors in human respiratory syncytial virus pathogenesis. **Journal of virology**, v. 82, n. 5, p. 2040-2055, 2008.
- COLLINS, Peter L.; KARRON, Ruth A. Respiratory syncytial virus and metapneumovirus. In: **Fields virology**. Wolters Kluwer Health, 2014. p. 1086-1123.
- CORMAN, Victor M. et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. **Eurosurveillance**, v. 25, n. 3, p. 2000045, 2020.
- CORRÊA, Rúbia CG et al. The past decade findings related with nutritional composition, bioactive molecules and biotechnological applications of *Passiflora* spp.(passion fruit). **Trends in Food Science & Technology**, v. 58, p. 79-95, 2016.
- COS, Paul et al. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. **Journal of ethnopharmacology**, v. 106, n. 3, p. 290-302, 2006.
- DE CLERCQ, Erik; LI, Guangdi. Approved antiviral drugs over the past 50 years. **Clinical microbiology reviews**, v. 29, n. 3, p. 695-747, 2016.
- DE GODOI, Ananda Marques et al. Structural characterization and antiviral activity of pectin isolated from *Inga* spp. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 139, p. 925-931, 2019.
- DE TOLEDO, María Alvarez et al. Antiviral therapies for respiratory syncytial virus infection: current expectations. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 39, n. 2, p. 153-159, 2026.
- DODGSON, K. S.; PRICE, R. G. A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. **Biochemical Journal**, v. 84, n. 1, p. 106, 1962.
- DU, Shaoqing et al. Antiviral drug discovery and development: challenges and future directions. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 11, n. 1, p. 69, 2026.
- DUART, Gerard et al. SARS-CoV-2 envelope protein topology in eukaryotic membranes. **Open biology**, v. 10, n. 9, 2020.
- EKIERT, H. M.; SZOPA, A. Biological Activities of Natural Products. **Molecules**, [S. l.], v. 25, n. 5769, p. 1–7, 2020.
- ELMAIDOMY, Abeer H. et al. Antiviral metabolites from *Passiflora edulis*: An in vitro, phytochemical, and computational studies. **Archiv der Pharmazie**, v. 358, n. 2, p. e2400853, 2025.
- ESSALMANI, Rachid et al. Distinctive roles of furin and TMPRSS2 in SARS-CoV-2 infectivity. **Journal of virology**, v. 96, n. 8, p. e00128-22, 2022.
- Experimental & molecular medicine**, v. 53, n. 4, p. 537-547, 2021.

- FAN, Lihong et al. Synthesis and anticoagulant activity of pectin sulfates. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 124, n. 3, p. 2171-2178, 2012.
- FENG, Yingying et al. Structural characteristics and immunomodulatory effects of sulfated polysaccharides derived from marine algae. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 63, n. 24, p. 7180-7196, 2023.
- FLINT, J. *et al.* **Principles of Virology**. 4. ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, 2015.
- FLY, J. Hunter; STULTZ, Jeremy S.; EILAND, Lea S. Advancements in Respiratory Syncytial Virus (RSV) Prevention and Treatment in Pediatrics. **The Journal of Pediatric Pharmacology and Therapeutics**, v. 1, n. aop, 2026.
- FREITAS, C. M. P. et al. Otimização da extração de pectina do maracujá (*Passiflora edulis flavicarpa*) usando o método de superfície de resposta. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 5, p. 25609-25625, 2020.
- GATT, D. *et al.* Prevention and Treatment Strategies for Respiratory Syncytial Virus (RSV). **Pathogens**, v. 12, n. 2, p. 154, 2023.
- GHOSH, Tuhin et al. Focus on antivirally active sulfated polysaccharides: from structure–activity analysis to clinical evaluation. **Glycobiology**, v. 19, n. 1, p. 2-15, 2009.
- GILLIM-ROSS, Laura; SUBBARAO, Kanta. Emerging respiratory viruses: challenges and vaccine strategies. **Clinical microbiology reviews**, v. 19, n. 4, p. 614-636, 2006.
- GILMAN, M. S. A. *et al.* Structure of the respiratory syncytial virus polymerase complex. **Cell**, [S. l.], v. 179, n. 1, p. 193–204, 2019.
- GORBALENYA, A. E. et al. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. **Nature Microbiology**, v. 5, n. 4, p. 536-544, 2020.
- GORKHALI, Ritesh et al. Structure and function of major SARS-CoV-2 and SARS-CoV proteins. **Bioinformatics and biology insights**, v. 15, p. 11779322211025876, 2021.
- GREENHALGH, Trisha et al. Ten scientific reasons in support of airborne transmission of SARS-CoV-2. **The lancet**, v. 397, n. 10285, p. 1603-1605, 2021.
- GRIFFITHS, C.; DREWS, S. J.; MARCHANT, D. J. Respiratory syncytial virus: Infection, detection, and new options for prevention and treatment. **Clinical Microbiology Reviews**, [S. l.], v. 30, n. 1, p. 277–319, 2017.
- GROSZ, D. D. *et al.* Sucrose stabilization of Respiratory Syncytial Virus (RSV) during nebulization and experimental infection. **BMC Research Notes**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 1-9, 2014.
- GRUDLEWSKA-BUDA, Katarzyna et al. Sars-cov-2—morphology, transmission and diagnosis during pandemic, review with element of meta-analysis. **Journal of Clinical Medicine**, v. 10, n. 9, p. 1962, 2021.

- GUPTA, C. K. *et al.* Stabilization of respiratory syncytial virus (RSV) against thermal inactivation.pdf. **Vaccine**, [S. l.], v. 14, n. 15, p. 1417–1420, 1996.
- GUPTA, Digant *et al.* Prevalence of Respiratory Syncytial Virus in Adult Patients with Respiratory Illnesses in Low to Middle-Income Countries: A Systematic Review and Meta-Analyses. **Infectious Diseases and Therapy**, v. 15, n. 2, p. 539-559, 2026.
- HAMMOND, Jennifer *et al.* Oral nirmatrelvir for high-risk, nonhospitalized adults with Covid-19. **New England Journal of Medicine**, v. 386, n. 15, p. 1397-1408, 2022.
- HANAGE, William P.; SCHAFFNER, William. Burden of acute respiratory infections caused by influenza virus, respiratory syncytial virus, and SARS-CoV-2 with consideration of older adults: A narrative review. **Infectious Diseases and Therapy**, v. 14, n. Suppl 1, p. 5-37, 2025.
- HARDEN, Emma A. *et al.* Virucidal activity of polysaccharide extracts from four algal species against herpes simplex virus. **Antiviral research**, v. 83, n. 3, p. 282-289, 2009.
- HARRISON, Alex G.; LIN, Tao; WANG, Penghua. Mechanisms of SARS-CoV-2 transmission and pathogenesis. **Trends in Immunology**, v. 41, n. 12, p. 1100-1115, 2020.
- HE, Xirui *et al.* Passiflora edulis: An insight into current researches on phytochemistry and pharmacology. **Frontiers in pharmacology**, v. 11, p. 530734, 2020.
- HEIDARY, Mohsen *et al.* A comprehensive review of the protein subunit vaccines against COVID-19. **Frontiers in microbiology**, v. 13, p. 927306, 2022.
- HIJANO, D. R. *et al.* Role of type I interferon (IFN) in the respiratory syncytial virus (RSV) immune response and disease severity. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 10, n. MAR, p. 1–14, 2019.
- HU, Ben *et al.* Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, p. 141-154, 2021.
- HU, Ben *et al.* Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nature reviews microbiology*, v. 19, n. 3, p. 141-154, 2021.
- HU, Yaqin *et al.* Sulfation of citrus pectin by pyridine-sulfurtrioxide complex and its anticoagulant activity. **LWT-Food Science and Technology**, v. 60, n. 2, p. 1162-1167, 2015.
- HUANG, Rong *et al.* Physicochemical characterization and immunomodulatory activity of sulfated Chinese yam polysaccharide. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 165, p. 635-644, 2020.
- HUONG, Tra Nguyen *et al.* The respiratory syncytial virus SH protein is incorporated into infectious virus particles that form on virus-infected cells. **Virology**, v. 580, p. 28-40, 2023.

- JABAREEN, A.; HULEIHIL, M.; HULEIHEL, M. Effect of extracts of passiflora edulis leaves on herpes viruses infection. **J Virol Antivir Res**, v. 2, n. 2, p. 2, 2013.
- JABEEN, Mehwish et al. Seaweed sulfated polysaccharides against respiratory viral infections. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 5, p. 733, 2021.
- JACKSON, Cody B. et al. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 23, n. 1, p. 3-20, 2022.
- JANA, Subrata et al. Anti-respiratory syncytial virus and anti-herpes simplex virus activity of chemically engineered sulfated fucans from *Cystoseira indica*. **Carbohydrate Polymers**, v. 337, p. 122157, 2024.
- JANG, Yejin et al. Antiviral activity of lambda-carrageenan against influenza viruses and severe acute respiratory syndrome coronavirus 2. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 821, 2021.
- JEGADESHWARI, B.; RAJARAM, R. A critical review on pharmacological properties of sulfated polysaccharides from marine macroalgae. **Carbohydrate Polymers**, v. 344, p. 122488, 2024.
- JIAO, Xu et al. The preparation and potential bioactivities of modified pectins: A review. **Foods**, v. 12, n. 5, p. 1016, 2023.
- JIN, Xuting et al. Global burden of upper respiratory infections in 204 countries and territories, from 1990 to 2019. **EClinicalMedicine**, v. 37, 2021.
- JORQUERA, P. A.; ANDERSON, L.; TRIPP, R. A. Human respiratory syncytial virus: an introduction. **Human Respiratory Syncytial Virus: Methods and Protocols**. [S. l.], v. 1442, p. 1–12, 2016.
- KAKAVANDI, Sareh et al. Structural and non-structural proteins in SARS-CoV-2: potential aspects to COVID-19 treatment or prevention of progression of related diseases. **Cell Communication and Signaling**, v. 21, n. 1, p. 110, 2023.
- KALER, Jasdeep et al. Respiratory syncytial virus: a comprehensive review of transmission, pathophysiology, and manifestation. **Cureus**, v. 15, n. 3, 2023.
- KANEKO, Masatoki; MURAOA, Junsuke. Effectiveness of Maternal Respiratory Syncytial Virus Vaccination in Conferring Infant Immunity: Review and Future Perspectives. **Vaccines**, v. 14, n. 3, p. 232, 2026.
- KANIMOZHI, G. et al. SARS-CoV-2: Pathogenesis, molecular targets and experimental models. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, p. 638334, 2021.
- KHADE, Shankar M.; YABAJI, Shivraj M.; SRIVASTAVA, Jyoti. An update on COVID-19: SARS-CoV-2 life cycle, immunopathology, and BCG vaccination. **Preparative biochemistry & biotechnology**, v. 51, n. 7, p. 650-658, 2021.
- KHALIL, Omar Arafat Kdudsi; DA SILVA KHALIL, Sara. SARS-CoV-2: taxonomia, origem e constituição. **Revista de Medicina**, v. 99, n. 5, p. 473-479, 2020.

- KRAMMER, Florian. SARS-CoV-2 vaccines in development. **Nature**, v. 586, n. 7830, p. 516-527, 2020.
- KRYLOVA, Natalya V. et al. Carrageenans and the carrageenan-echinochrome complex as anti-SARS-CoV-2 agents. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 26, n. 13, p. 6175, 2025.
- KWON, Paul S. et al. Sulfated polysaccharides effectively inhibit SARS-CoV-2 in vitro. *Cell discovery*, v. 6, n. 1, p. 50, 2020.
- KYRIAKIDIS, Nikolaos C. et al. SARS-CoV-2 vaccines strategies: a comprehensive review of phase 3 candidates. **npj Vaccines**, v. 6, n. 1, p. 28, 2021.
- LARA-ESPINOZA, Claudia et al. Pectin and pectin-based composite materials: Beyond food texture. **Molecules**, v. 23, n. 4, p. 942, 2018.
- LEUNG, Nancy HL. Transmissibility and transmission of respiratory viruses. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 8, p. 528-545, 2021.
- LIANG, Yonglun et al. Extraction of pectin from passion fruit peel: Composition, structural characterization and emulsion stability. **Foods**, v. 11, n. 24, p. 3995, 2022.
- LIU, Hanxiang; ZHONG, Hui; LIU, Hanmin. Respiratory syncytial virus (RSV) antibody and small-molecule drugs: current status of clinical translation and challenges. **Frontiers in Microbiology**, v. 17, p. 1745808, 2026.
- LOPES, Nayara et al. Sulfated polysaccharide of *Caesalpinia ferrea* inhibits herpes simplex virus and poliovirus. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 60, p. 93-99, 2013.
- LU, Wenjing et al. Recent advances in antiviral activities and potential mechanisms of sulfated polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 272, p. 118526, 2021.
- MACEDO-DA-SILVA, Janaina et al. Protein arginylation is regulated during SARS-CoV-2 infection. **Viruses**, v. 15, n. 2, p. 290, 2023.
- MANDALA, Venkata S. et al. Structure and drug binding of the SARS-CoV-2 envelope protein transmembrane domain in lipid bilayers. **Nature structural & molecular biology**, v. 27, n. 12, p. 1202-1208, 2020.
- MARQUES, Márcia Maria Mendes et al. Antiviral and antioxidant activities of sulfated galactomannans from plants of Caatinga Biome. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, n. 1, p. 591214, 2015.
- MASLOV, D. E. et al. Respiratory syncytial virus: biology, genetic diversity, and perspective control preparations. **Molecular Genetics, Microbiology and Virology**, v. 39, n. 1, p. 14-30, 2024.
- MAZUR, Natalie I. et al. Respiratory syncytial virus prevention within reach: the vaccine and monoclonal antibody landscape. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 23, n. 1, p. e2-e21, 2023.

- MCFARLAND, E. J. *et al.* Live-Attenuated Respiratory Syncytial Virus Vaccine with M2-2 Deletion and with Small Hydrophobic Noncoding Region Is Highly Immunogenic in Children. **The Journal of Infectious Diseases**, [S. l.], v. 221, n. 12, p. 2050–2059, 2020.
- MCLELLAN, Jason S.; RAY, William C.; PEEPLES, Mark E. Structure and function of respiratory syncytial virus surface glycoproteins. **Challenges and opportunities for respiratory syncytial virus vaccines**, p. 83-104, 2013.
- MELETTI, L. M. M.; BRUCKNER, C. H. Melhoramento genético. **Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado. Porto Alegre: Cinco Continentes**, p. 345-385, 2001.
- MERAD, Miriam; MARTIN, Jerome C. Pathological inflammation in patients with COVID-19: a key role for monocytes and macrophages. **Nature reviews immunology**, v. 20, n. 6, p. 355-362, 2020.
- MERRITT, Trudy N.; PEI, Jingjing; LEUNG, Daisy W. Pathogenicity and virulence of human respiratory syncytial virus: Multifunctional nonstructural proteins NS1 and NS2. **Virulence**, v. 15, n. 1, p. 2283897, 2024.
- MITRA, R. *et al.* The human respiratory syncytial virus matrix protein is required for maturation of viral filaments. **Journal of virology**, [S. l.], v. 86, n. 8, p. 4432-4443, 2012.
- MIYASHITA, Aki *et al.* Impact of Health care-associated Respiratory Virus Infections in Children. **Infection Prevention in Practice**, p. 100517, 2026.
- MOHNEN, Debra. Pectin structure and biosynthesis. **Current opinion in plant biology**, v. 11, n. 3, p. 266-277, 2008.
- MOROKUTTI-KURZ, Martina *et al.* Iota-carrageenan neutralizes SARS-CoV-2 and inhibits viral replication in vitro. **PloS one**, v. 16, n. 2, p. e0237480, 2021.
- MOROKUTTI-KURZ, Martina; GRAF, Christine; PRIESCHL-GRASSAUER, Eva. Amylmetacresol/2, 4-dichlorobenzyl alcohol, hexylresorcinol, or carrageenan lozenges as active treatments for sore throat. **International Journal of General Medicine**, p. 53-60, 2017.
- MORRIS, J. A.; BLOUNT, R. E.; SAVAGE, R. E. Recovery of Cytopathogenic Agent from Chimpanzees with Goryza. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, [S. l.], v. 92, n. 3, p. 544–549, 1956.
- NAM, H. H.; ISON, M. G. Respiratory syncytial virus infection in adults. **The BMJ**, [S. l.], v. 366, 2019.
- NIKOLOVA, Krastena *et al.* Chemical compositions, pharmacological properties and medicinal effects of genus *Passiflora* L.: a review. **Plants**, v. 13, n. 2, p. 228, 2024.

- NISHIMURA, T.; TOKU, H.; FUKUYASU, H. Antiviral compounds. XII. Antiviral activity of amidinohydrazones of alkoxyphenyl-substituted carbonyl compounds against influenza virus in eggs and in mice. 1977.
- NIU, Xiaoshuang et al. Respiratory Syncytial Virus (RSV) Prophylaxis: Clesrovimab and Beyond. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 69, n. 1, p. 4-9, 2026.
- NUTTENS, Charles et al. Differences between RSV A and RSV B subgroups and implications for pharmaceutical preventive measures. **Infectious Diseases and Therapy**, v. 13, n. 8, p. 1725-1742, 2024.
- ONWUCHEKWA, Chukwuemeka et al. Pediatric respiratory syncytial virus diagnostic testing performance: a systematic review and meta-analysis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 228, n. 11, p. 1516-1527, 2023.
- OUIZOGUN-TOUBARI, Mohamed *et al.* A Druggable Pocket at the Nucleocapsid/Phosphoprotein Interaction Site of Human Respiratory Syncytial Virus. **Journal of Virology**, [S. l.], v. 89, n. 21, p. 11129–11143, 2015.
- PAL, Saikat et al. Targeting viral entry: Chemically engineered Gracilaria corticata galactan sulfates as multifunctional antivirals against respiratory syncytial and herpes simplex viruses. **International Journal of Biological Macromolecules**, p. 150041, 2026.
- PALUCK, A. *et al.* Role of ARP2/3 Complex-Driven Actin Polymerization in RSV Infection. **Pathogens**, [S. l.], v. 11, n. 26, p. 1–12, 2022.
- PANGESTI, Krisna NA et al. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus. **Reviews in Medical Virology**, v. 28, n. 2, p. e1968, 2018.
- PEREIRA, Cláudia SGP et al. Antiviral activity of natural and modified hydrocolloids: main sources, susceptible viruses, structure-activity relationship and mechanisms of action. **Frontiers in Nutrition**, v. 12, p. 1696022, 2025.
- PEREIRA, Cláudia SGP et al. Antiviral activity of natural and modified hydrocolloids: main sources, susceptible viruses, structure-activity relationship and mechanisms of action. **Frontiers in Nutrition**, v. 12, p. 1696022, 2025.
- PHILLIPS, Bradley; JACKSON, Christopher; PHILLIPS, Jordan. Clesrovimab for the prevention of respiratory syncytial virus lower respiratory tract disease in infants. **Journal of Pharmacy Technology**, v. 42, n. 2, p. 98-104, 2026.
- PIMISA, Rattanaoporn et al. Extraction and characterization of pectin from passion fruit peel, and its application in synbiotic ice cream: A study from Phetchabun, Thailand. **Future Foods**, v. 10, p. 100510, 2024.
- RAHIMI, Azadeh; MIRZAZADEH, Azin; TAVAKOLPOUR, Soheil. Genetics and genomics of SARS-CoV-2: A review of the literature with the special focus on genetic

- diversity and SARS-CoV-2 genome detection. **Genomics**, v. 113, n. 1, p. 1221-1232, 2021.
- RANDO, Halie M. et al. Identification and development of therapeutics for COVID-19. **Msystems**, v. 6, n. 6, p. e00233-21, 2021.
- RECHENCHOSKI, D. Z. *et al.* Mangiferin: A promising natural xanthone from *Mangifera indica* for the control of acyclovir – resistant herpes simplex virus 1 infection. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 28, n. 4, 2020
- REDONDO, Natalia et al. SARS-CoV-2 accessory proteins in viral pathogenesis: knowns and unknowns. **Frontiers in immunology**, v. 12, p. 708264, 2021.
- REED, L. J.; MUENCH, H. A Simple Method of Estimating Fifty Per Cent Endpoints. **The American Journal of Hygiene**, [S. l.], v. 27, n. 3, p. 493–497, 1938.
- REINKE, Patrick YA et al. Calpeptin is a potent cathepsin inhibitor and drug candidate for SARS-CoV-2 infections. **Communications Biology**, v. 6, n. 1, p. 1058, 2023.
- RIOS GUZMAN, Estefany; HULTQUIST, Judd F. Clinical and biological consequences of respiratory syncytial virus genetic diversity. **Therapeutic Advances in Infectious Disease**, v. 9, p. 20499361221128091, 2022.
- ROMANO, Maria et al. A structural view of SARS-CoV-2 RNA replication machinery: RNA synthesis, proofreading and final capping. **Cells**, v. 9, n. 5, p. 1267, 2020.
- ROSA-FERNANDES, Livia et al. SARS-CoV-2 activates ER stress and Unfolded protein response. **BioRxiv**, p. 2021.06. 21.449284, 2021.
- SHAH, Masaud; WOO, Hyun Goo. Omicron: a heavily mutated SARS-CoV-2 variant exhibits stronger binding to ACE2 and potentially escapes approved COVID-19 therapeutic antibodies. **Frontiers in immunology**, v. 12, p. 830527, 2022.
- SHAHRIARI, S.; WEI, K. J.; GHILDYAL, R. Respiratory syncytial virus matrix (M) protein interacts with actin *in vitro* and in cell culture. **Viruses**, [S. l.], v. 10, n. 535, p. 7–12, 2018.
- SILVA, Draulio C. et al. Pectin from *Passiflora edulis* shows anti-inflammatory action as well as hypoglycemic and hypotriglyceridemic properties in diabetic rats. **Journal of medicinal food**, v. 14, n. 10, p. 1118-1126, 2011.
- SILVA, Renan O. et al. Polysaccharide fraction isolated from *Passiflora edulis* inhibits the inflammatory response and the oxidative stress in mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 67, n. 7, p. 1017-1027, 2015.
- SINGH, Devika; YI, Soojin V. On the origin and evolution of SARS-CoV-2. **Experimental & molecular medicine**, v. 53, n. 4, p. 537-547, 2021.
- SRINIVASAN, Vasundara et al. Antiviral activity of natural phenolic compounds in complex at an allosteric site of SARS-CoV-2 papain-like protease. **Communications biology**, v. 5, n. 1, p. 805, 2022.

- STEINER, Silvio et al. SARS-CoV-2 biology and host interactions. **Nature Reviews Microbiology**, v. 22, n. 4, p. 206-225, 2024.
- STRAUB, C. P. *et al.* Mutation of the elongin C binding domain of human respiratory syncytial virus non-structural protein 1 (NS1) results in degradation of NS1 and attenuation of the virus. **Virology Journal**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 1–12, 2011.
- SUN, Taohua et al. Studies on antiviral and immuno-regulation activity of low molecular weight fucoidan from *Laminaria japonica*. **Journal of Ocean University of China**, v. 17, n. 3, p. 705-711, 2018.
- SUN, Zhiwu et al. Respiratory syncytial virus entry inhibitors targeting the F protein. **Viruses**, v. 5, n. 1, p. 211-225, 2013.
- SWEENEY, Daniel Anthony; WITTEBOLE, Xavier; KALIL, Andre Celestino. The Respiratory Triple Pandemic in the Intensive Care Unit: Epidemiology, Clinical Features and Management of COVID-19, Influenza and Respiratory Syncytial Virus. **Critical Care Clinics**, 2026.
- TAM, Donald et al. Targeting SARS-CoV-2 non-structural proteins. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 16, p. 13002, 2023.
- TANG, Julian W.; LOH, Tze Ping. Correlations between climate factors and incidence—a contributor to RSV seasonality. **Reviews in medical virology**, v. 24, n. 1, p. 15-34, 2014.
- THOMAS, E. *et al.* Plant-based natural products and extracts: Potential source to develop new antiviral drug candidates. **Molecules**, v. 26, n. 20, p. 1-56, 2021.
- THORNHILL, E. M.; VERHOEVEN, D.. Respiratory Syncytial Virus's Non-structural Proteins: Masters of Interference. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [S. l.], v. 10, n. May, p. 1–9, 2020.
- UDUGAMA, Buddhisha et al. Diagnosing COVID-19: the disease and tools for detection. **ACS nano**, v. 14, n. 4, p. 3822-3835, 2020.
- V'KOVSKI, Petr et al. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, p. 155-170, 2021.
- WATANABE, W. *et al.* MTT colorimetric assay system for the screening of anti-orthomyxo-and anti-paramyxoviral agents. **Journal of virological methods**, [S. l.], v. 48, n. 2-3, p. 257-265, 1994.
- WATKISS, Ellen R. et al. Pathogenesis of respiratory syncytial virus. **Current opinion in virology**, v. 2, n. 3, p. 300-305, 2012.
- WEI, Qiang et al. Advances in research on antiviral activities of sulfated polysaccharides from seaweeds. **Pharmaceuticals**, v. 15, n. 5, p. 581, 2022.
- WESTON, Stuart; FRIEMAN, Matthew B. Respiratory viruses. **Encyclopedia of microbiology**, p. 85, 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global health estimates: Leading causes of death**. Genebra: World Health Organization, 2024. Disponível em: <https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates/ghe-leading-causes-of-death>. Acesso em: 1 jun. 2026.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Tracking SARS-CoV-2 variants**. Genebra: WHO, 2024. Disponível em: <https://www.who.int/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants>. Acesso em: 18 mai. 2026.

XU, X. *et al* Respiratory syncytial virus NS1 protein degrades STAT2 by inducing SOCS1 expression. **Intervirology**, [S. l.], v. 57, n. 2, p. 65–73, 2014.

YADAV, Rohitash *et al*. Role of structural and non-structural proteins and therapeutic targets of SARS-CoV-2 for COVID-19. **Cells**, v. 10, n. 4, p. 821, 2021.

ZERAIK, Maria Luiza *et al*. Passion fruit: a functional food. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 3, p. 459-471, 2010.

ZHANG, Juan *et al*. Phytochemistry, nutritional composition, health benefits and future prospects of Passiflora: A review. **Food Chemistry**, v. 428, p. 136825, 2023.

ZHANG, Jun *et al*. Structure of SARS-CoV-2 spike protein. **Current opinion in virology**, v. 50, p. 173-182, 2021.

ZHANG, Y. *et al* Respiratory syncytial virus non-structural protein 1 facilitates virus replication through miR-29a-mediated inhibition of interferon- $\alpha$  receptor. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [S. l.], v. 478, n. 3, p. 1436–1441, 2016.

ZHANG, Yu *et al*. Homogalacturonan from squash: Characterization and tau-binding pattern of a sulfated derivative. **Carbohydrate polymers**, v. 285, p. 119250, 2022.

ZHAO, Chanjuan *et al*. Research progress of natural polysaccharides against respiratory viruses. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 78, n. 1, p. rgaf083, 2026.

ZHU, Na *et al*. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. **New England journal of medicine**, v. 382, n. 8, p. 727-733, 2020.