



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

JAQUELINE CORREIA SANTOS

**Infecção Placentária pelo Zika Vírus: investigação da ação de produtos naturais com
atividade antiviral**

**MACEIÓ
2022**

JAQUELINE CORREIA SANTOS

Infecção Placentária pelo Zika Vírus: investigação da ação de produtos naturais com atividade antiviral

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Urban Borbely

Coorientadora: Profa. Dra. Karen Steponavicius Cruz Borbely

MACEIÓ
2022

Catálogo na Fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

S237i Santos, Jaqueline Correia.
Infecção placentária pelo Zika Vírus : investigação da ação der produtos naturais com atividade antiviral / Jaqueline Correia Santos. – 2022.
81 f. : il., graf., tabs. color.

Orientador: Alexandre Urban Borbely.

Co-orientadora: Karen Steponavicius Cruz Borbely.

Dissertação (mestrado em ciências da saúde) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Maceió, 2022.

Bibliografia: f. 68-81.

1. Produtos biológicos. 2. Zika virus. 3. *Passiflora*. 4. *Anacardiaceae*. I. Título.

CDU: 615.32:582.765

Dedico à minha inspiração diária, Isabela.

AGRADECIMENTOS

A minha filha, Isabela Correia Cardoso, por ser minha fonte de inspiração diária.

Ao meu marido, David Pinto Cardoso, por todo amor, pelo apoio incondicional, companheirismo. Você deixou esse caminho mais suave, te amo.

A minha tia Maria Lúcia Alves dos Santos, por todo apoio e por sempre acreditar em mim.

Aos meus pais, Maria Helena Alves dos Santos Correia e Antônio Correia dos Santos, e meus irmãos, Jaciara Correia, Alexsandro Correia e Marcos Antônio Correia, por todo amor e apoio em todas as etapas da minha vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Alexandre Urban Borbely, pela oportunidade, pelo apoio, por todo conhecimento compartilhado, e principalmente por ser um exemplo de profissional. A minha coorientadora a Dr^a. Karen Steponavicius Cruz Borbely, pela amizade e toda contribuição para o desenvolvimento desse trabalho.

Às integrantes do Grupo de Pesquisa da Saúde da Mulher e Gestação, Ana Lúcia Mendes, Ashelley Souza, Camilla Mendes, Eloiza Lopes de Lira Tanabe, Iasmim Danielle, Lays Xavier, Keyla Silva Nobre Pires, Maria Juliana Ramalho, Rayane Martins Botelho e Séfora Fragozo por serem tão companheiras, pela amizade, por todo apoio quando precisei estar ausente e por serem a melhor equipe de trabalho.

À banca de qualificação deste trabalho, Prof. Dr^a Jadriane de Almeida Xavier e Prof. Dr^a Jamylle Nunes de Souza Ferro, pelo valoroso auxílio na finalização deste trabalho.

Aos professores pela contribuição ao desenvolvimento desse trabalho, Dr. Ênio Bassi, Dr.^a Alessandra Borges, Dr^a Jadriane de Almeida Xavier, Dr^a Marília Oliveira de Fonseca de Goulart (UFAL), a Dr. Juliano Bordignon (FIOCRUZ-PR); Dr^a. Estela Bevilacqua da Universidade de São Paulo (USP).

A todos os meus colegas do Laboratório de Biologia Celular por todo conhecimento compartilhado e pelo excelente convívio, em especial, à técnica Juliane Pereira da Silva, por toda auxílio e por todo o cuidado em facilitar o trabalho de todos.

À todas as mulheres que doaram um pedacinho da placenta, foi uma valorosa colaboração para o desenvolvimento deste trabalho.

A todos meus professores, por proporcionarem o conhecimento não apenas sistemático, mas a manifestação do caráter no processo de formação profissional. Por toda dedicação, por não

somente por terem me ensinado, mas por terem me feito aprender. A todos, aos quais sem nominar terão os meus eternos agradecimentos.

A todos que não foram aqui citados, mas de alguma maneira me incentivaram, me influenciaram ou de alguma maneira participam ou participaram da minha jornada, meus sinceros agradecimentos.

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.”

(Leonardo da Vinci)

RESUMO

Introdução: O vírus do zika (ZIKV) é um arbovírus emergente, que se espalhou rapidamente nos últimos anos e causou grandes surtos. É originário da África e se espalhou para a Ásia, Oceania e Américas, tendo como principal transmissor o mosquito do gênero *Aedes*. Em 2015, diante de um surto no Brasil, chamou a atenção das autoridades de saúde, onde se começou a fazer a associação da infecção do vírus com complicações neurológicas fetais, sendo apoiado por estudos realizados durante os surtos de ZIKV no Brasil e na Polinésia Francesa. Apesar da atividade do ZIKV ter diminuído significativamente nos últimos anos, o potencial para a introdução do ZIKV e a transmissão em novas áreas é alta e imprevisível. Assim, o desenvolvimento de vacinas e medicamentos contra o ZIKV continua sendo uma prioridade de pesquisa, sendo os produtos naturais importantes fontes na descoberta de compostos com atividade antiviral. **Objetivo:** Caracterizar o efeito antiviral dos extratos etanólicos obtidos das espécies *Passiflora edulis*, *Schinus terebinthifolius* Raddi, *Moringa oleífera* e *Cocos lucífera*, sobre a resposta de células da placenta exposta ao ZIKV. **Métodos:** Células HTR-8/SVneo derivadas do primeiro trimestre de gestação e explantes placentários a termo foram expostas aos extratos e avaliado a viabilidade celular. Os extratos que se mostraram viáveis foram expostos a infecção pelas cepas do ZIKV nas células trofoblásticas e analisado o potencial antiviral por qRT-PCR e citometria de fluxo. Diante da infecção e os tratamentos dos extratos foram analisados o ciclo celular e produção de várias citocinas. **Resultados:** Nenhum dos extratos testados diminuiu a viabilidade dos explantes placentários, em contrapartida apenas os extratos da semente da *Passiflora edulis*, fruta da *Schinus terebinthifolius* Raddi e casca da *Schinus terebinthifolius* Raddi não diminuíram a viabilidade das células HTR-8SV/neo, por isso sendo os únicos utilizados nas etapas subsequentes. Na análise de atividade antiviral, todos os extratos testados foram efetivos para redução da carga viral tanto nas células HTR-8SV/neo como nos explantes placentários, com resultados mais promissores com o extrato da semente *Passiflora edulis*. Na produção de citocinas, nenhum dos extratos interferiu na modulação dos interferons. Já a IL-8 foi reduzida pelo extrato da casca da *Schinus terebinthifolius* Raddi, enquanto a IL-10 foi aumentada diante do extrato da fruta da *Schinus terebinthifolius* Raddi. O TNF- α foi reduzido na presença dos tratamentos com *Schinus terebinthifolius* Raddi e *Passiflora edulis*. **Conclusão:** Os extratos testados são fontes promissoras de compostos com ação antiviral contra o ZIKV, em especial o extrato etanólico da semente da *Passiflora edulis*.

Palavras-chave: Produtos naturais, ZIKV, *Passiflora edulis*, *Schinus terebinthifolius* Radd

ABSTRACT

Introduction: The Zika virus (ZIKV) is an emerging arbovirus, which has spread rapidly in recent years and has caused large outbreaks. It originates in Africa and has spread to Asia, Oceania and the Americas, having as its main transmitter the mosquito of the genus *Aedes*. In 2015, faced with an outbreak in Brazil, it drew the attention of health authorities, where the association of the virus infection with fetal neurological complications began, being supported by studies carried out during the ZIKV outbreaks in Brazil and French Polynesia. . Although ZIKV activity has declined significantly in recent years, the potential for ZIKV introduction and transmission in new areas is high and unpredictable. Thus, the development of vaccines and drugs against ZIKV remains a research priority, with natural products being important sources in the discovery of compounds with antiviral activity. **Objective:** To characterize the antiviral effect of ethanol extracts obtained from the species *Passiflora edulis*, *Schinus terebinthifolius* Raddi, *Moringa oleífera* and *Cocos lucífera*, on the response of placental cells exposed to ZIKV. **Methods:** HTR-8/SVneo cells derived from the first trimester of pregnancy and term placental explants were exposed to the extracts and cell viability was evaluated. The extracts that proved to be viable were exposed to infection by the ZIKV strains in the trophoblast cells and the antiviral potential was analyzed by qRT-PCR and flow cytometry. Faced with the infection and the treatments of the extracts, the cell cycle and production of various cytokines were analyzed. **Results:** None of the extracts tested decreased the viability of placental explants, on the other hand, only extracts from the seed of *Passiflora edulis*, fruit of *Schinus terebinthifolius* Raddi and bark of *Schinus terebinthifolius* Raddi did not decrease the viability of HTR-8SV/neo cells, therefore being the only ones used in subsequent steps. In the analysis of antiviral activity, all extracts tested were effective in reducing viral load both in HTR-8SV/neo cells and in placental explants, with more promising results with the extract of *Passiflora edulis* seed. In the production of cytokines, none of the extracts interfered in the modulation of interferons. IL-8 was reduced by the *Schinus terebinthifolius* Raddi bark extract, while IL-10 was increased by the *Schinus terebinthifolius* Raddi fruit extract. TNF- α was reduced in the presence of treatments with *Schinus terebinthifolius* Raddi and *Passiflora edulis*. **Conclusion:** The tested extracts are promising sources of compounds with antiviral action against ZIKV, especially the ethanolic extract of *Passiflora edulis* seed.

Keywords: Natural products, ZIKV, *Passiflora edulis*, *Schinus terebinthifolius* Raddi.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Anatomia da placenta humana.....	19
Figura 2: Diferenças histológicas entre vilosidades coriônicas de diferentes estágios da gestação.....	20
Figura 3: Células que compõe a placenta.....	22
Figura 4: Constituição dos vírus do gênero flavivirus.....	25
Figura 5: Ciclo de infecção do Flavivirus: um modelo para replicação do ZIKV.....	26
Figura 6: Espécie <i>Passiflora edulis</i>	34
Figura 7: Espécie <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi.....	36
Figura 8: Espécie <i>Moringa oleífera</i>	37
Figura 9: Espécie <i>Cocos nucífera</i>	38
Figura 10: Análise da viabilidade celular com os extratos em explante de vilosidade coriônica.....	49
Figura 11: Análise da viabilidade celular com os extratos na linhagem HTR-8SV/neo.....	50
Figura 12. Análise da viabilidade celular com cloroquina em células trofoblásticas.....	51
Figura 13. Análise da expressão de ZIKV NS1 em células trofoblásticas tratadas com o extrato da semente da <i>Passiflora edulis</i>	52
Figura 14. Análise da expressão de ZIKV NS1 em células trofoblásticas tratadas com o extrato da fruta e casca da <i>S. terebinthifolius</i> Raddi.....	52
Figura 15. Análise da expressão de ZIKV NS1 no sobrenadante de células trofoblásticas tratadas com o extrato da semente da <i>Passiflora edulis</i>	53
Figura 16. Análise da expressão de ZIKV NS1 no sobrenadante de células trofoblásticas tratadas com o extrato da fruta e casca da <i>S. terebinthifolius</i> Raddi.....	54
Figura 17. Análise do ciclo celular em células trofoblásticas com os extratos diante da infecção com o ZIKV.....	55
Figura 18. Análise da produção de INF pelo extrato da semente da <i>Passiflora edulis</i> diante da infecção por ZIKV em explante de vilosidade coriônica.....	56
Figura 19. Análise da produção de INF pelos extratos diante da infecção por ZIKV na linhagem HTR8-SV/neo.....	57
Figura 20: Avaliação da produção de citocinas inflamatórias em explantes de vilosidades coriônicas após infecção e tratamento com os extratos.....	58
Figura 21. Avaliação da produção de citocinas inflamatórias em células HTR-8SV/neo após infecção e tratamento com os extratos.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ae. - *Aedes*

AmEpCs- Células Epiteliais Amnióticas

CMC- Carboximetilcelulose

CTEV- Citotrofoblasto Extraviloso

CXCL8- Interleucina 8

DAPI- Dihidrocloreto de 4',6-diamidino-2-fenilindole

DENV- Vírus da dengue

DMEM- Dulbecco modification of. Minimum Essential Media

DMSO- Dimetilsulfóxido

ECSTR- Extrato da casca da *Schinus terebinthifolius* Raddi.

EFSTR- Extrato da fruta da *Schinus terebinthifolius* Raddi.

EGF- Fator de Crescimentos Epidérmico

ESPE- Extrato da semente da *Passiflora edulis*

FcR- Receptor de fração Fc

FGF-básico- Fator de Crescimento de fibroastos

HBSS- Solução salina balanceada de Hank

HPLC- Cromatografia Líquida de Alto Desempenho

HUPAA- Hospital Universitário Professor Alberto Antunes

IFN- Interferons

IFN- γ - Interferon- γ

IFNAR1- Cadeia Alfa do Receptor de Interferon-Alfa/Beta

IFNAR2- Cadeia Beta do Receptor de Interferon-Alfa/Beta

IFN- α 2- Interferon-alfa 2

IFN- β - Interferon- β

IFN- λ 1- Interferon Lambda 1

IFN- λ 2/3- Interferon lambda 2/3

IgG- Imunoglobulina G

IL-6- Interleucinas 6

JAK1- Proteína Tirosina Quinase

MOI- Multiplicidade de Infecção

mRNA- Ácido Ribonucleíco mensageiro

MTT- Brometo de 3-4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5 digeniltetrazolium

NPCs- Células Progenitoras Neurais

OMS- Organização Mundial da Saúde

OPAS- Organização Pan-americana de Saúde

PBS- Solução fosfato salina

PFA- Paraformolaldeído

PFU- Unidades Formadoras de Placas

PIGF- Fator de Crescimento Placentário

PSA- Penicillin/Streptomycin Antibiotic

qRT-qPCR- Reação em Cadeia da Polimerase Via Transcriptase Reversa

RNA- Ácido Ribonucléico

RT-qPCR- Reação em Cadeia da Polimerase Via Transcriptase Reversa

SA-PE- Estreptavidina-Ficoeritrina

SBF- Soro Bovino Fetal

SCZ- Síndrome Congênita do Zika Vírus

SGB- Síndrome de Guillain-Barré

SIRT- Silent Mating Type Information Regulation 2 homolog

STAT-2- Transdutor de Sinal e Ativador da transcrição 2

STB- Sinciciotrofoblasto

TBPCs- Células Progenitoras Trofoblásticas

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral

USP- Universidade de São Paulo

VEGF- Fator de Crescimento Endotelial Vascular

ZIKV- Vírus da Zika

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 A placenta.....	18
2.1.1 Desenvolvimento da placenta.....	18
2.1.2 Células que compõe a placenta.....	21
2.2 O ZIKV.....	22
2.2.1 Epidemiologia do ZIKV.....	22
2.2.2 Formas de transmissão do ZIKV.....	24
2.2.3 Fisiopatologia e tropismo do ZIKV.....	24
2.2.4 Manifestações clínicas e diagnósticas da infecção por ZIKV.....	29
2.3 O ZIKV na placenta.....	30
2.3.1 Transmissão placentária do ZIKV.....	30
2.3.2 Alterações placentárias causadas pelo ZIKV.....	31
2.4 O uso de medicação antivirais na gestação.....	31
2.5 Produtos naturais.....	33
2.5.1 <i>Passiflora edulis</i>	34
2.5.2 <i>Schinus terebinthifolius Raddi</i>	35
2.5.3 <i>Moringa oleífera</i>	37
2.5.4 <i>Cocos nucífera</i>	38
3 OBJETIVOS.....	40
3.1 Objetivo geral.....	40
3.2 Objetivos específicos.....	40
4 METODOLOGIA.....	41
4.1 Obtenção de material vegetal.....	41
4.1.1 Extrato etanólico de semente de <i>Passiflora edulis</i> e extrato etanólico da folha da <i>Moringa oleífera</i>	41
4.1.2 Extrato etanólico da <i>Schinus terebinthifolius Raddi</i>	41
4.1.3 Extrato etanólico da fibra da casca de <i>Cocos nucífera</i>	41
4.2 Propagação viral em células C6/36 e estoque viral.....	42
4.3 Títulação viral por PFU (Unidade Formadora de Placas)	42

4.4 Cultura celular (linhagem HTR-8 / SVneo)	43
4.5 Cultura de Explantes de Vilosidades Coriônicas.....	43
4.6 Avaliação da viabilidade celular com os extratos pelo ensaio de Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 digeniltetrazolium (MTT)	44
4.6.1 Linhagem HTR-8SV/neo.....	44
4.6.2 Explante de vilosidades coriônicas.....	44
4.7 Tratamento com os extratos e infecção por ZIKV.....	44
4.8 Ensaio de citometria de fluxo.....	45
4.9 Extração de RNA e qRT-PCR.....	45
4.10 Ensaio de proliferação e ciclo celular por marcação de Ki-67.....	46
4.11 Detecção de citocinas por ensaio de citometria por beads.....	46
4.12 Análise Estatística.....	47
5 RESULTADOS.....	48
5.1 Ensaio de viabilidade celular.....	48
5.2 Ensaio para avaliar a efetividade dos extratos diante a infecção do ZIKV por citometria de fluxo.....	51
5.3 Ensaio para avaliar a efetividade dos extratos diante a infecção do ZIKV por qRT-PCR.....	52
5.4 Efeito dos extratos na proliferação e no ciclo celular das células.....	54
5.5 Efeito na modulação de citocinas pelos extratos diante da infecção por ZIKV.....	55
5.5.1 Efeito na produção de Interferons (INF)	55
5.5.2 Efeito na produção de citocinas inflamatórias.....	57
6 DISCUSSÃO.....	60
7 CONCLUSÃO.....	66
REFERÊNCIAS.....	67

1 INTRODUÇÃO

O ZIKV é um arbovírus emergente, pertencente ao gênero *Flavivirus*, da família *Falviviridae*, que se espalhou rapidamente nos últimos anos e causou grandes surtos que, pela primeira vez, revelou uma ligação etiológica com graves complicações neurológicas, incluindo a Síndrome de Guillain-Barré (SGB) e a Síndrome Congênita do Zika Vírus (SCZ) (PIELNA et al., 2020). O primeiro relato de infecção por ZIKV em humanos foi em 1962 na Uganda, e o vírus desde então se expandiu lentamente pela África, Ásia, Oceania e Américas. Até 2007 menos de 20 casos em humanos foram relatados, e todos tiveram manifestações clínicas leves e autolimitadas (MUSSO; GUBLER, 2016; HEANG et al., 2012).

Recentemente, o ZIKV chamou a atenção das autoridades de saúde, quando se começou a associar a infecção com complicações neurológicas fetais (OEHLER et al., 2014; SCHULER-FACCINI et al., 2016; ARAÚJO et al., 2016), e o Brasil foi o país que registrou substancialmente o crescimento de casos de más formações fetais, tendo seu ápice em 2016 (BRASIL, 2017). Depois de vários estudos publicados associando a infecção viral com os problemas neurológicos fetais, surgiu o termo de Síndrome Congênita do ZIKV, um conjunto de anomalias congênitas que podem incluir alterações visuais, auditivas e neuropsicomotoras que ocorre após a exposição ao ZIKV da mulher gestante (MOORE et al., 2017).

Os principais responsáveis pela disseminação do ZIKV são os mosquitos do gênero *Aedes spp*, mas também pode ocorrer por transfusão de hemoderivados infectados, transmissão sexual e transmissão materno-fetal (PETERSEN et al., 2016). Dentre as pessoas que entram em contato com o ZIKV, cerca de 80%, são assintomáticos ou apresentam doença clínica leve (HAYES, 2009; DUFFY et al., 2009). As principais alterações que preocupam as autoridades de saúde são as que afetam os recém-nascidos, onde só no Brasil, entre os anos de 2015 até 2018, ocorreram 16.900 casos suspeitos de mudanças no crescimento e no desenvolvimento de recém-nascidos, possivelmente relacionados à infecção pelo ZIKV, tendo 22.168 casos confirmados de gestantes infectadas (BRASIL, 2018a; BRASIL, 2018b). No entanto, é importante levar em consideração as dificuldades de diagnóstico da doença, pois facilmente se confunde com outras arboviroses em relação aos seus aspectos clínicos e as dificuldades de acesso da população a exames laboratoriais específicos no tempo correto, o que podem ter contribuído para uma grande subnotificação dos casos (MOCHIDA, 2020; GALANG et al., 2020).

Apesar da atividade do ZIKV ter diminuído significativamente nos últimos anos, o potencial para introdução do ZIKV e a transmissão em novas áreas é alta e imprevisível (POLAND et al., 2018). Assim, o desenvolvimento de vacinas e medicamentos contra o ZIKV

continua sendo uma prioridade de pesquisa, principalmente após a declaração da Organização Mundial da Saúde (OMS) sobre o ZIKV ainda ser uma emergência de saúde pública de interesse internacional com a necessidade de intensas pesquisas para o desenvolvimento de vacinas e medicamentos (BERNATCHEZ et al., 2019; MOTTIN; BORBA; BRAGA, 2018). Vale ressaltar que não existe medicação antiviral aprovada para o ZIKV, principalmente com aplicabilidade em gestantes.

O desenvolvimento de medicamentos para gestantes é um processo delicado, geralmente os estudos randomizados de uma nova medicação excluem as gestantes ou as deixam para segundo plano por requerer mais recursos financeiros e pela dificuldade de quantitativo de participantes (SCHAEFER, 2011). E quando se trata de uma doença em que o principal prejuízo é causado principalmente durante a gestação, aí o quadro se complica, como é no caso do ZIKV que enfrenta dificuldades na busca por novos compostos, um deles é a dificuldade no avanço da fase clínica por estarmos em um momento de baixo números de casos (MASMEJAN et al., 2018; SOUZA et al., 2020).

Nesse contexto de busca de novos compostos com atividade antiviral, os produtos naturais sempre tiveram um papel crucial, com um grande número de compostos fitoterápicos e seus derivados demonstrando atividade contra diversos vírus (LIN; HSU; LIN, 2014). Como exemplo, cita-se, o cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) que demonstrou atividade contra o vírus do herpes, o adenovírus e o poliovírus (PARHAM et al., 2020; AKTHAR; DEGAGA; AZAM, e 2014). Outro exemplo, é a portulaca (*Portulaca oleracea*) uma erva tradicional da Ásia e já demonstrou uma potente atividade antibacteriana, antiviral e antifúngica (AKTHAR; DEGAGA; AZAM e 2014).

Assim, para esse trabalho, foram selecionadas algumas espécies que são encontradas facilmente na região do Nordeste e são ricas em flavonoides, uma classe que já possui atividades antivirais descritas de amplo espectro (KUMAR, PANDEY, 2013; OLIVEIRA et al., 2017;), para serem avaliadas diante da infecção do ZIKV e com um possível uso durante a gestação, as espécies foram: *Passiflora edulis*, *Schinus terebinthifolia* Raddi, *Moringa oleífera*, e *Cocos nucífera*.

A espécie *Passiflora edulis*, também é conhecida como maracujá amarelo, pertence à família Passifloraceae que é uma planta bem explorada quando se trata da casca, polpa, flores e folhas (CAUZ-SANTOS et al. 2017). Já a semente é menos explorada, boa parte da sua composição é descartada, e essa fração jogada fora pela indústria é possível fazer a retirada de um extrato etanólico (HE et al., 2020; XAVIER ET al., 2020). Esse extrato etanólico utilizado nesse trabalho, contém várias substâncias com atividades biológicas interessantes, destacamos

o piacetanol, por ser um composto majoritário das sementes e por já ter demonstrado um papel importante diante de doenças metabólicas (LAVU et al., 2008; KITADA et al., 2017), e a Naringenina-7-O-glicosídeo, por já ter demonstrado atividade contra flavivírus (FRABASILE et al., 2017).

A *Schinus terebinthifolius* Raddi, pertencente à família Anacardiaceae, popularmente conhecida como aroeira, pimenta-rosa, pimenta brasileira. A sua casca, fruta e folhas já possuem um destaque na medicina popular e na indústria (PAGANI et al., 2014 BRANDÃO et al., 2006). Dessa espécie foi extraído: o extrato etanólico da fruta e o extrato etanólico da casca da fruta, e pela técnica de HPLC (Cromatografia Líquida de Alto Desempenho), foram encontrados alguns compostos fenólicos que na literatura já demonstraram algum tipo de atividade antiviral, são eles: o ácido gálico e ácido p-cumárico, catequina, epicatequina e resveratrol (ROCHA et al., 2019; LIMA et al., 2017).

A árvore *Moringa oleífera* pertence à família Moringaceae, o uso das suas sementes, folhas, cascas, flores e raízes se expandiu para o mundo na década de 90, e hoje são amplamente explorados (MUTHEESWARAN et al., 2011; MAHMOOD; MUGAL; HAQ, 2010). A análise quantitativa realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) do extrato da folha da *Moringa oleífera*, mostra como principais componentes ativos o ácido clorogênico e a isoquercetina (VONGSAK et al., 2013). E essa fração já demonstrou atividade antiviral contra o vírus da hepatite B (BAGHERI et al., 2020).

Outra espécie utilizada foi *Cocos nucífera*, é uma árvore com finalidades bem variadas, tendo todas as partes do fruto aproveitadas pela indústria (LIMA et al., 2015; ROSA et al., 2001). Utilizamos o extrato etanólico da fibra da casca do *Cocos nucífera*, que na literatura já foi descrito por apresentar atividade contra infecções fúngicas dérmicas (KHALID et al., 2016) e atividade inibitória contra vírus herpes simples tipo I (HSV-1-ACVr) (ESQUENAZI et al., 2002).

Assim, o objetivo do trabalho foi testar as espécies descritas acima diante da infecção viral pelo ZIKV, usando células de placenta visando uma possível aplicação futura para gestantes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A Placenta

É um órgão altamente especializado no corpo humano que desempenha um papel essencial no desenvolvimento e manutenção da gravidez, ele é temporário, tem formato discoide e é hemocorial (pelo qual o sangue materno entra em contato direto com células trofoblásticas) (GUDE et al., 2004; BENIRSCHKE, BURTON, BAERGEN, 2012). Macroscopicamente possui a superfície fetal, voltada para a cavidade amniótica o que dá um aspecto brilhante e onde fica a inserção do cordão umbilical, e a superfície materna, que possui um aspecto opaco e é subdividida em lóbulos placentários (BENIRSCHKE, BURTON, BAERGEN, 2012).

Dentre as inúmeras funções desempenhadas por esse órgão pode-se destacar o transporte de nutrientes e gases respiratórios (WOODING; BURTON, 2016; BURTON; FOWDEN; THORNBURG, 2016). Também é importante a secreção de hormônios, pois uma grande variedade de hormônios é secretada pela placenta, com grandes impactos na saúde materna, variando desde a supressão dos ciclos reprodutivos à mobilização de recursos nutricionais (BURTON; FOWDEN; THORNBURG, 2016). A placenta também cria uma barreira seletiva que procura proteger o feto de toxinas, patógenos, e outras substâncias prejudiciais, e assim, proporcionar o ambiente mais adequado para seu desenvolvimento (JAVAM et al., 2014; BURTON; FOWDEN; THORNBURG, 2016).

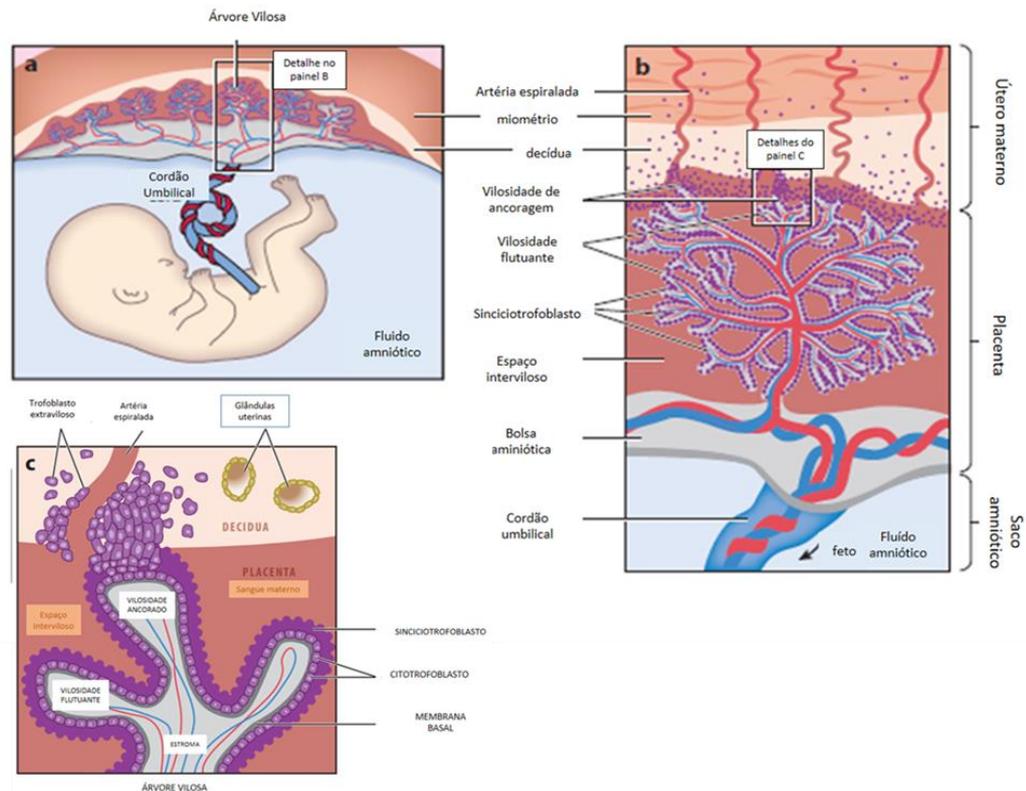
2.1.1 Desenvolvimento da placenta

A placenta começa a se formar logo após a implantação embrionária, a partir da diferenciação de células trofoblásticas para o citotrofoblasto, este por sua vez, sofrerá o processo de sincicialização (diante da sua alta taxa de proliferação, suas membranas se fundem e formam uma massa multinucleada), formando o sinciotrofoblasto (FISHER, 2015). Nas primeiras semanas de gestação, o sinciotrofoblasto possui o protagonismo de invadir uma parte do endométrio materno, a decídua basal, e invade glândulas maternas e os vasos venosos para suprimento dos elementos essenciais para o desenvolvimento do conceito (HUPPERTZ, 2019).

Outro processo importante na formação da placenta é a formação das vilosidades coriônicas, estruturas fundamentais para a sua funcionalidade. De início elas são chamadas de vilosidades coriônicas primárias, que são compostas externamente por uma camada de sinciotrofoblasto e logo abaixo uma camada citotrofoblasto, as vilosidades coriônicas se

projetam no chamado espaço interviloso, e esse espaço fica repleto de sangue materno derivado de vênulas e veias uterinas (HUSTIN, SCHAAPS, 1987). Com a gastrulação embrionária, o mesoderma se expande para estruturas extra-embrionárias, como as vilosidades coriônicas que, devido à presença de tecido mesenquimal, passam a ser denominadas vilosidades coriônicas secundárias (BENIRSCHKE; BURTON; BAERGEN, 2012). Logo em seguida, os vasos sanguíneos embrionários são formados por vasculogênese e expandem por angiogênese para todas as estruturas mesenquimais, inclusive as vilosidades coriônicas, agora denominadas de terciárias, composta por uma camada externa de sinciciotrofoblasto, adjacente tem uma camada de citotrofoblasto e preenchida por tecido mesenquimal e vasos sanguíneos fetais. Assim ao final do primeiro trimestre de gestação as vilosidades coriônicas terciárias já estão formadas (WANG e ZHAO, 2010).

Com a maturação da placenta o sinciciotrofoblasto perde sua atividade invasiva, enquanto o citotrofoblasto que está presente nas vilosidades coriônicas continua proliferando e extravasando os limites das vilosidades, formando colunas de células citotrofoblásticas, e quando se desprendem da vilosidade coriônica se diferenciam nas células do citotrofoblasto extraviloso (CTEV) (KNÖFLER e POLLHEIMER, 2010) (Fig.1). Essas células são responsáveis por invadir mais profundamente a decídua basal até o primeiro terço do miométrio, além de invadir também remodelam as artérias espiraladas uterinas, facilitando o fluxo de sangue arterial para os espaços intervilosos (FISHER, 2015).

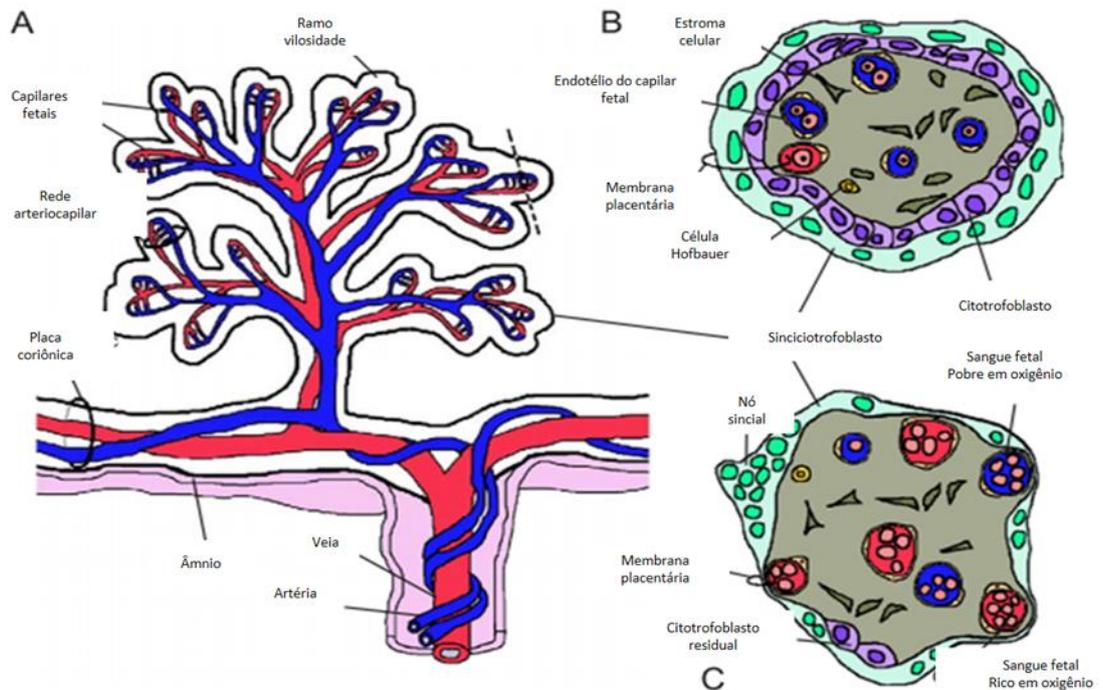
Figura 1: Anatomia da placenta humana

Legenda: A- visão macroscópica do conceito e da placenta. B- Detalhes de uma árvore vilosa. C-Detalhes de uma vilosidade de ancoragem. Fonte: Adaptado de DELORME-AXFORD, SADOVSKY, COYNE, 2014.

No estroma das vilosidades terciárias são encontrados ainda fibroblastos, células de Hofbauer (macrófagos embrionários-fetais) e os capilares fetais, e essa composição das vilosidades coriônicas terciárias permanecem na maior parte do primeiro trimestre e segundo trimestre de gestação. Assim durante esse período a barreira hematoplacentária é feita pelo sinciotrofoblasto, citotrofoblasto viloso, lâmina basal e célula endotelial dos capilares fetais (Fig.2) (WANG e ZHAO, 2010).

No terceiro trimestre, com o amadurecimento da placenta e a não necessidade de invasão placentária, as células CTEV começam a reduzir seu número, da mesma forma que as células do citotrofoblasto, assim as paredes dos capilares fetais se fusionam com o sinciotrofoblasto, formando a membrana vasculosincicial e dessa forma, a barreira hematoplacentária fica reduzida apenas a essa membrana ou ao sinciotrofoblasto livre (Fig.2) (COYNE e LAZEAR, 2016). Ou seja, a barreira hematoplacentária muda conforme o período gestacional devido a essas diferenças nos estágios da placenta, os mecanismos de transmissão vertical dos patógenos devem ser diferentes de acordo com a idade gestacional (COYNE e LAZEAR, 2016).

Figura 2: Diferenças histológicas entre vilosidades coriônicas de diferentes estágios da gestação.



Legenda: A- Visão da rede arteriocapilar de uma vilosidade coriônica. B- Corte transversal de uma vilosidade coriônica terciária do primeiro trimestre. C- Corte transversal de uma vilosidade coriônica terciária do final da gestação. Fonte: Adaptado de GUDE et al., 2004.

2.1.2 Células que compõe a placenta

As células trofoblásticas são os principais componentes da placenta, elas desempenham a maior parte das funções placentárias e existe uma variedade de subtipos de trofoblasto entre eles o citotrofoblasto viloso (CTV), o sinciotrofoblasto (SCT), o sinciotrofoblasto extraviloso e o citotrofoblasto extraviloso (CTEV) (PIJNENBORG et al., 1980; TURCO; MOFFETT, 2019).

O SCT compõe a vilosidade coriônica externamente, e está em contato direto com o sangue materno do espaço interviloso, é o principal local de trocas materno-fetal (Fig. 3) (ROBINSON et al., 2009). Essas células têm uma grande importância endócrina na produção de hormônios na circulação materna afim de criar as condições fisiológicas e metabólicas para a gestação (MOFFETT; LOKE, 2006). Além disso, o SCT também funciona como um papel importante na barreira placentária, seja pela barreira física ou com produção e expressão de proteínas para ativação do sistema imunológico local (ROOPENIAN; AKILESH, 2007).

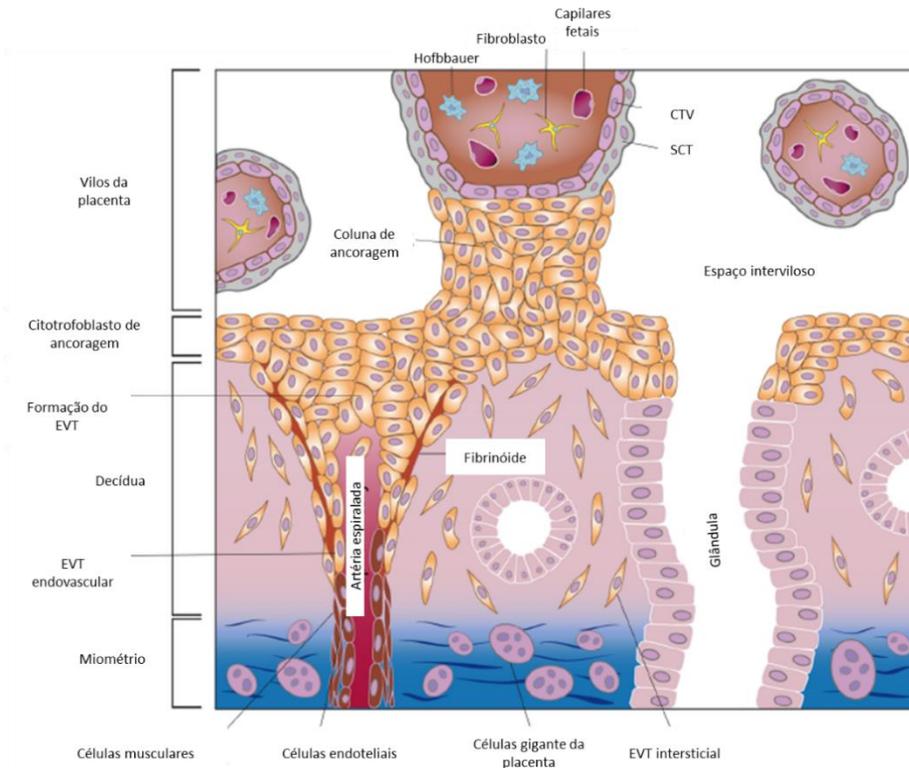
Já o sinciotrofoblasto extraviloso, são “restos” de sinciotrofoblastos, localizados principalmente na região intervilosa. No início da gestação as partes não vilosas da placenta (córion, placa coriônica primária) são compostas principalmente pelo sinciotrofoblasto e sua

quantidade diminui com a maturação da placenta. São placas sinciciais que cobrem pequenos espaços da placa coriônica, placa basal, e as vezes das colunas de ancoragem (BENIRSCHKE, BURTON, BAERGEN, 2012).

O CTV fica logo abaixo do SCT na vilosidade coriônica (Fig 3), são células altamente proliferativas (SIMPSON; MAYHEW; BARNES, 1992), e no início da gestação elas formam uma camada de células continua e à medida que a placenta vai amadurecendo essa capacidade proliferativa vai diminuindo e o seu quantitativo reduz em torno de 75% nas vilosidades coriônicas do final da gestação (PIJNENBORG et al., 1980).

Todos os CTV fora da vilosidade coriônica recebe o nome de CTEV, que podem ter um fenótipo proliferativo ou intersticial (Fig.3) (POLLHEIMER et al., 2018). Células com perfil proliferativo formam as colunas de ancoragem das vilosidades coriônicas, que se ancoram na decídua basal, dando aderência da placenta ao tecido materno (BENIRSCHKE; BURTON; BAERGEN, 2016). As que apresentam um perfil intersticial se desprendem das colunas de ancoragem e migram pelo estroma da decídua basal, com funções de remodelações das artérias espiraladas e invasão do tecido materno até o terço médio do miométrio (LOREGGER; POLLHEIMER; KNÖFLER, 2003).

Além das células trofoblásticas, a placenta contém uma gama de células presentes no centro do estroma das vilosidades, incluindo as que formam os vasos sanguíneos fetais, células mesenquimais e os macrófagos de origem fetal ou células de Hofbauer (BOYD; HAMILTON, 1970; JONES et al., 2008). E na decídua basal encontramos as células decíduais, células *natural killer* uterinas, macrófagos, células dendríticas, além de diferentes populações linfocitárias e componentes do sistema vascular arterial e venoso, que são de origem materna. (BENIRSCHKE; BURTON; BAERGEN, 2016; POLLHEIMER et al., 2018).

Figura 3: Células que compõe a placenta

Fonte: Adaptado de TURCO; MOFFETT, 2019.

2.2 O ZIKV

2.2.1 Epidemiologia do ZIKV

O ZIKV é um arbovírus pertencente à família Flaviviridae e ao gênero Flavivirus. O genoma do vírus é composto de ácido ribonucleico (RNA) de fita simples e a análise filogenética mostra que existem duas cepas: a asiática e a africana (PLOURDE; BLOCH, 2016), sendo que a linhagem africana pode ser dividida ainda em linhagens do Leste e do Oeste da África (LANCIOTTI et al., 2007).

Em 1947, durante estudos epidemiológicos sobre febre amarela na floresta de Zika, em Uganda, pesquisadores isolaram pela primeira vez o ZIKV do sangue de macacos *Rhesus* (DICK, COZINHA, HADDOW, 1952). E o primeiro isolamento de ZIKV em seres humanos foi confirmado em 1962, em Uganda (WIKAN; SMITH, 2016). Já no ano de 1969, o ZIKV foi identificado, pela primeira vez, fora do continente africano, na Malásia, sendo transmitido pelo mosquito *Aedes Aegypti* (MARCHETTE; GARCIA; RUDNICK, 1969).

Por muitos anos o ZIKV permaneceu relativamente desconhecido, causando infecções esporádicas na África e na Ásia, até o primeiro surto epidêmico nas Ilhas Yap, pertencentes aos Estados Federados da Micronésia, em 2007. Inicialmente, esse surto foi atribuído ao vírus da

dengue (DENV), mas posteriormente por meio de análises de biologia molecular confirmaram o surto de ZIKV, onde cerca de 70% da população foi afetada (CAO-LORMEAU et al., 2014). Entre 2013 e 2014 novos surtos ocorreram na Polinésia Francesa, na Ilha de Páscoa, nas Ilhas de Cook e em Nova Caledônia (KINDHAUSER et al., 2016).

A disseminação pelas Américas ocorreu em 2015, causando epidemias nas Américas Central e do Sul, nas ilhas do Caribe e na região Sul dos Estados Unidos da América (HENNESSEY; FISCHER; STAPLES, 2016). Embora pela análise filogenética acredita-se que a introdução do ZIKV no continente Americano tenha ocorrido em 2013 (FARIA et al., 2016). Segundo a OMS, existem evidências da transmissão do ZIKV em 72 países (OMS, 2015).

No Brasil, a transmissão autóctone, ou seja, ocorrida dentro do território nacional, foi confirmada em 2015 na região nordeste do país e se disseminou para outros estados em sequência (FERRARIS; YSSEL; MISSÉ, 2019). Naquele ano foram confirmados três óbitos relacionados à infecção por ZIKV. No entanto, o aumento exponencial do número de casos ocorreu em 2016, quando as notificações chegaram a 215.097 casos prováveis de febre por ZIKV, com incidência de 104,4/100 mil habitantes, resultando em oito óbitos. Os registros mostraram ainda 13.973 notificações de prováveis casos em gestantes, sendo 5.925 confirmados pelo critério clínico-epidemiológico ou laboratorial. Já em 2017, ocorreu uma redução drástica do número de casos para 17.105 casos prováveis de febre pelo ZIKV, desses 8.626 (50.4%) foram confirmados, com incidência de 8,3/100 mil habitantes. Em relação ao número de casos e gestantes, foram registrados 2.198 casos prováveis, sendo 933 confirmados por critérios clínico-epidemiológico ou laboratorial (BRASIL, 2017).

Um sintoma nunca antes relatado em outras arboviroses, apareceu ainda em 2015, quando o nascimento de crianças com microcefalia motivou uma missão de vigilância em saúde federal à Recife, acompanhada pela Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) (BRASIL, 2017). Com o sistema de vigilância epidemiológica sensibilizado, foi observado que o registro de crianças com microcefalia era superior ao habitual em diversas cidades do Nordeste, ocorrendo a associação com o surto de ZIKV, o qual foi recebido com ceticismo pelas autoridades em saúde na ocasião (BRASIL, 2017). No entanto à hipótese foi confirmada em 2016, com a publicação em periódico relatando a presença de ZIKV no líquido amniótico de pacientes grávidas em gestações que apresentam alterações nos desenvolvimentos fetais identificados pelos exames de ultrassonografias (MELO et al., 2016). Várias outras publicações foram realizadas subsequencialmente, confirmando a associação de alterações fetais com a infecção por ZIKV na gestação e uma possível transmissão vertical (MLAKAR et

al., 2016). Inclusive, foi relatado, em nova avaliação do surto de ZIKV na Polinésia Francesa que houve registros de transmissão vertical do ZIKV em 2014 (BESNARD et al., 2014).

2.2.2 Formas de Transmissão do ZIKV

A principal fonte de transmissão do ZIKV é vetorial, ou seja, realizada através da picada do mosquito do Gênero *Aedes* (*Ae.*), que popula amplamente as regiões tropicais e subtropicais (PLOURDE; BLOCH, 2016). Dentre eles estão, o *Ae. africanus*, o *Ae. apicoargenteus*, o *Ae. vitattus*, o *Ae. furcifer*, o *Ae. luteocephalus*, o *Ae. hensilli* e o *Ae. aegypti*. A espécie *Ae. hensilli* foi a principal transmissora na Ilha de Yap durante a epidemia de 2007 (DIALLO et al., 2014). Já nas Américas, o principal vetor foi, e continua sendo, o *Ae. aegypti* (GRARD et al., 2014; LEDDERMANN et al., 2014; MARCONDES; XIMENES, 2015). Adicionalmente já foram descritas outras formas de transmissão do ZIKV, como pela via sexual, visto que o ZIKV foi encontrado no sêmen de pacientes com infecção por ZIKV, sugerindo à replicação do vírus no trato genital e evidenciando a possibilidade de transmissão por essa via (PETERSEN et al., 2016). Foi descrito que o ZIKV foi localizado nos testículos, servindo como reservatório para novos ciclos de infecção (GORNET; BRACERO; SEGARS, 2016; MUSSO et al., 2015). Outra possível via de transmissão é pela transfusão sanguínea, visto que o ZIKV foi detectado pela técnica de reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-qPCR), em amostras de doadores assintomáticos (MUSSO et al., 2014).

Uns dos primeiros relatos de transmissão vertical ocorreu durante um surto na Polinésia Francesa, em 2013, onde duas mães com infecção por ZIKV confirmada por qRT-PCR, também tiveram a infecção confirmada do recém-nascido 4 dias após o nascimento, indicando a possível transmissão vertical (BESNARD et al., 2014). Durante epidemia no Brasil, foi constatado um aumento de adversidades em neonatos oriundos de gestantes acometidas pelo ZIKV, além da localização de RNA viral em líquido amniótico, na placenta e no sistema nervoso central dos recém-nascidos de mães que tiveram a infecção durante a gestação (NORONHA et al., 2016).

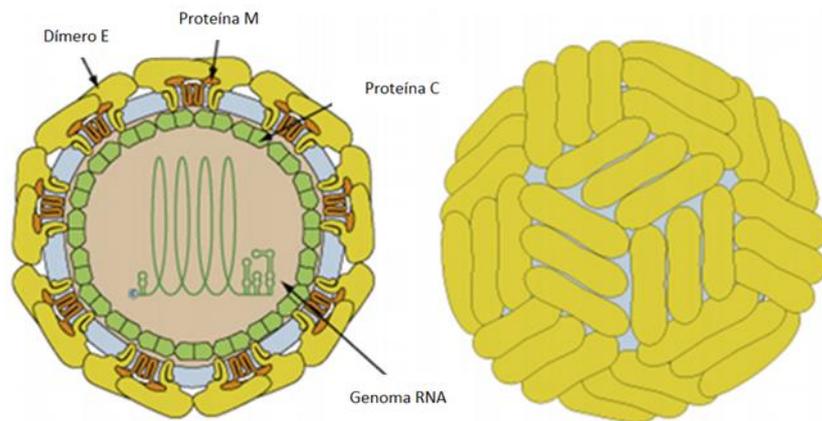
2.2.3 Fisiopatologia e tropismo do ZIKV

A estrutura do ZIKV é semelhante à de outros flavivirus, esse gênero é esférico e mede, em torno de 50 nm de diâmetro sendo envolto por uma bicamada lipídica. Os vírus possuem uma glicoproteína de membrana (M) e glicoproteína de envelope (E) (Fig. 4) (KAZMI et al., 2020). O genoma consiste em uma fita positiva de RNA de 11 kb e codifica três proteínas estruturais: proteína do capsídeo (C), precursor da glicoproteína de membrana (prM) e proteína

de envelope (E), além de sete não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) (SIROHI et al., 2016).

As proteínas não estruturais auxiliam na replicação e no empacotamento do genoma, bem como na subversão das vias do hospedeiro em favor do vírus (SIROHI; KUHN, 2017). A NS1 e a NS2A, exerce um papel essencial na replicação e montagem do vírus e é importante na evasão imune (HASAN et al., 2018). A NS2 e a NS3 são importantes durante a montagem do vírion (SAHOO; JENA; KUMAR, 2016), e além disso, NS3 junto com NS2B, funcionam como um complexo de protease e helicase (LEE; SHIN, 2019; KHAIBOULLINA et al., 2019). A proteína NS4 interfere na sinalização intracelular e tem sido associada à autofagia (LIANG et al., 2016); enquanto a NS5 contém um domínio RNA polimerase dependente de RNA, que é essencial para a replicação viral, e um domínio metiltransferase, que está envolvido na tradução e evasão da resposta imune do hospedeiro (SHI; GAO, 2017).

Figura 4: Constituição dos vírus do gênero favivirus

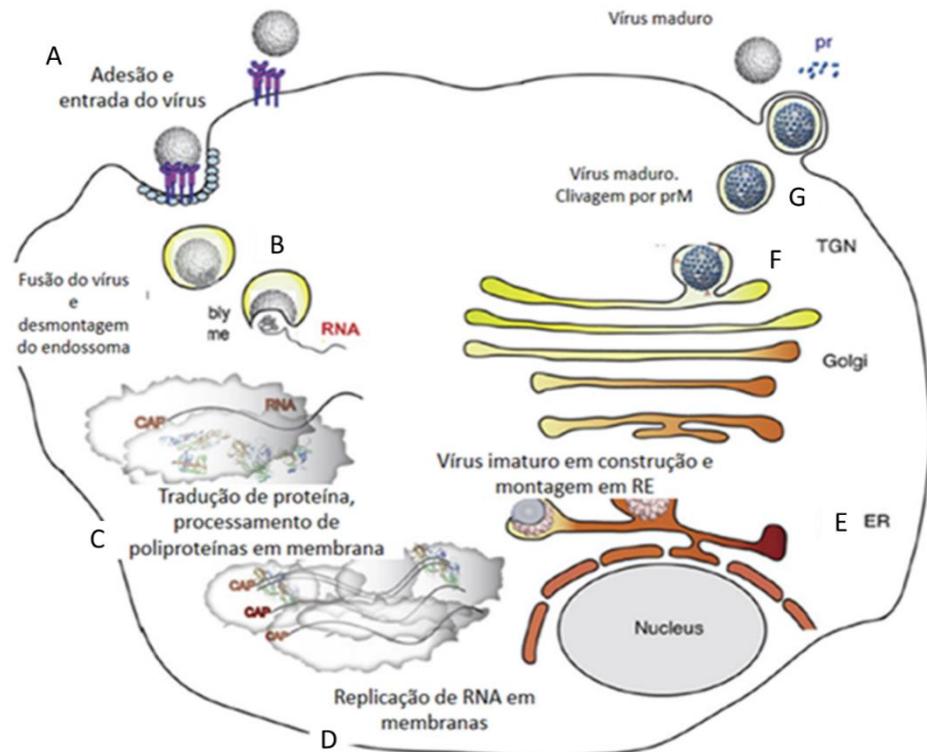


Fonte: Adaptado de RELICH e LOEFFELHOLZ, 2017

Sobre a fisiopatologia da febre de Zika, é conhecido que o mosquito de gênero *Aedes* deposita o ZIKV na pele do hospedeiro, onde se inicia o ciclo infeccioso com a fixação dos vírions na membrana plasmática de células suscetíveis, como os fibroblastos e os queratinócitos, ocorrendo uma rápida replicação viral pela interação entre a proteína E viral e um ou mais receptores de células hospedeiras (HAMEL et al., 2015; PERERA-LECOIN et al., 2013). Os vírions são internalizados por micropinocitose, logo o capsídeo viral se funde com a membrana endossômica e ocorre a liberação do genoma viral do endossomo no citoplasma, sendo traduzido por ribossomos para gerar as proteínas virais estruturais e não estruturais, seguindo para a montagem de novas partículas levando a maturação e a liberação de uma

população heterogênea e competente para a infecção (BUCKLEY; GOULD, 2001; HAMEL et al., 2015) (Fig. 5).

Figura 5: Ciclo de infecção do Flavivirus: um modelo para replicação do ZIKV



Legenda: Um vírion se liga à superfície de uma célula hospedeira suscetível e permissiva por meio de interações entre a proteína E viral e um ou mais receptores de superfície celular (A). O vírion é internalizado e em seguida por endocitose e, após acidificação do endossoma, a membrana viral e endossomal se fundem, liberando o genoma viral no citoplasma da célula hospedeira (B). Em seguida, ocorre a tradução da proteína viral, a replicação do RNA e a montagem de partículas virais (C, D e E), conduzindo para a maturação e liberação de partículas virais da célula (F e G). Fonte: Adaptado de RELICH e LOEFFELHOLZ, 2017.

Muito do que se sabe sobre os mecanismos da patogênese e toda a dinâmica do sistema imunológico diante do ZIKV é baseada em estudos *in vitro* e *in vivo*, e oriundos de alguns relatos de casos clínicos (BAILEY et al., 2018). Em modelos de primatas não-humanos, como os macacos *Rhesus*, o RNA do ZIKV foi detectado no plasma um dia após a inoculação subcutânea e em três semanas foi isolado do cérebro, líquido cefalorraquidiano, urina e saliva desses animais (DUDLEY et al., 2016). Osuna, 2016, também mostrou a permanência do vírus por três semanas na saliva e nos fluídos seminais após a eliminação do vírus em sangue periférico de macacos *Rhesus*. A infecção dos macacos pigtail durante a gravidez resultou no desenvolvimento de lesões cerebrais fetais com hipoplasia da substância cinzenta da prole (ADAMS et al., 2016). Em um estudo de inoculação periférica em camundongos

imunocompetentes, estes foram resistentes à infecção por ZIKV (LAZEAR et al., 2016; ROSSI et al., 2016).

Análises bioquímicas mostram que todos os flavivirus precisam superar a produção de interferons (IFN) para causar a doença, pois ele é capaz de invocar uma potente resposta antiviral nas células, com a ativação da cadeia alfa do receptor de interferon-alfa/beta (IFNAR1) e cadeia beta do receptor de interferon-alfa/beta (IFNAR2), que ativa a proteína tirosina quinase (JAK1), e o Transdutor de Sinal e Ativador da transcrição 2 (STAT-2), levando a regulação positiva de centenas de genes que vão ativar uma resposta antiviral (KUMAR et al., 2016). Em humanos foi descrita que a proteína viral NS5 age como um antagonista nessa cascata, causando a inibição da fosforilação e induzindo a degradação de STAT-2 (GRANT et al., 2016; KUMAR et al., 2016). Já em camundongos imunocompetentes não ocorreu a degradação de STAT-2, o que justificaria essas linhagens serem resistentes a infecção pelo ZIKV (GRANT et al., 2016). No entanto, camundongos imunocomprometidos, com deficiências genéticas na via de sinalização de IFN ou com o uso de bloqueadores monoclonais de IFN, mostraram-se mais suscetíveis a infecção e ao desenvolvimento da doença (ROSSI et al., 2016; LAZEAR et al., 2016).

Em linhagens de camundongos que desenvolvem a infecção do ZIKA, eles apresentam um severo quadro da infecção, incluindo tremores, ataxia e paralisia (ROSSI et al., 2016; ZMURKO et al., 2016; WEGER-LUCARELLI et al., 2016). Também foi relatado o desenvolvimento de conjuntivite, com localização de RNA viral na córnea, íris, nervo óptico e células glanglionares e bipolares da retina de camundongos (MINER et al., 2016). O vírus também foi detectado em várias células do aparelho reprodutor masculino em camundongos, incluindo espermatogônias, espermátócitos, espermatozoides maduros e células de Sertoli, e a infecção persistiu por semanas nos testículos e epidídimo (GOVERO et al., 2016).

A infecção de camundongos neonatais imunocompetentes mostrou o desenvolvimento da doença, apresentando alterações no sistema nervoso central e oculares, além de morte de parte dos camundongos (LAZER et al., 2016; MINER et al., 2016). Camundongos infectados com um dia de vida apresentaram letargia, ataxia e paralisia com sinais de infecção no cérebro (FERNANDES et al., 2016). A infecção pelo ZIKV de camundongos fêmeas prenhas imunocomprometidas levou a infecção placentária, lesão cerebral fetal com morte celular neuronal e morte fetal. Em camundongos prenhas onde o feto teria capacidade de resposta antiviral via IFN também foram observados restrição do crescimento intrauterino, infecção da placenta e do sistema nervoso central (MINER et al., 2016).

Com relação à placenta, já foi demonstrado em estudos com explantes placentários humanos que o ZIKV consegue infectar células e estruturas trofoblásticas de primeiro trimestre (citotrofoblasto, sinciciotrofoblasto e trofoblasto extraviloso) (TABATA et al., 2016). E em explante da decídua basal de primeiro trimestre de gestação, em humanos, também foi relatado a replicação e à amplificação do ZIKV nos macrófagos e nos fibroblastos. Já em explantes de vilosidades coriônicas de primeiro trimestre, as células mesenquimais e as células de Hofbauer também foram suscetíveis (EL COSTA et al., 2016). Bem como as células do cordão umbilical, de início de gestação, também se mostraram suscetíveis à infecção por ZIKV (EL COSTA et al., 2016; TABATA et al., 2016).

Na placenta a termo de humanos, foi demonstrado que o citotrofoblasto viloso e as células de Hofbauer são suscetíveis a infecção (QUICKE et al., 2016; JURADO et al., 2016). Foi identificado ainda que, houve detecção do vírus na região perinuclear de células do estroma das vilosidades coriônicas (MOLÁS et al., 2020). A replicação de RNA do ZIKV foi observada em placentas de primeiro e segundo trimestre, com carga viral maior nas de primeiro trimestre (BHATNAGAR et al., 2017). Bayer e colaboradores (2016) confirmaram a infecção do ZIKV em diversas linhagens celulares de placenta, porém não encontraram sinais de infecção em citotrofoblasto viloso de placenta a termo, sugerindo um mecanismo de imunidade antiviral envolvendo IFN-III.

Os estudos demonstram que as sequelas mais graves da infecção do ZIKV ocorrem devido ao tropismo desse vírus por infectar células progenitoras neurais (NPCs), resultando em graves danos neurológicos, além da microcefalia e da hidrocefalia. Os efeitos da infecção do ZIKV nas células-tronco neuronais que crescem como neuroesferas e organóides do cérebro, mostraram que o ZIKV tem como alvo essas células reduzindo sua viabilidade e seu crescimento (GARCEZ et al., 2016). Outros estudos mostram que a capacidade do ZIKV infectar esse tipo de células induz a alterações na expressão de proteínas do ciclo celular causando apoptose e o comprometimento da produção de novos neurônios (LI et al., 2016; SOUZA et al., 2016). A infecção direta de NPCs pode não ser o único fator que contribui para a microcefalia induzida por ZIKV. A infecção de células da crista neural cranial pode resultar na produção de citocinas inflamatórias que agem de forma parácrina causando a eliminação das NPCs ao promover o processo de apoptose (BAYLESS et al., 2016). Além disso, infecções virais com o ZIKV podem levar a uma exacerbada inflamação placentária causando lesões no tecido, resultando em sérias disfunções placentárias que podem comprometer o desenvolvimento fetal e a saúde materna (MOLÁS et al., 2020).

2.2.4 Manifestações clínicas e diagnóstico da infecção por ZIKV

Aproximadamente 20% das pessoas infectadas com ZIKV desenvolvem os sinais clínicos da doença (HAYES, 2009). E quando os sintomas estão presentes, a maioria dos casos ocorrem de forma leve e com cura espontânea em torno de sete dias após o início dos sintomas. Estudos apontam que o período de incubação em seres humanos é de três a seis dias (DUFFY et al., 2009). No entanto, existem relatos de que o ZIKV pode permanecer em determinados tecidos por meses (ROSENBERG, 2017). A principal sintomatologia da febre da Zika é o exantema maculopapular pruriginoso, febre intermitente (geralmente baixa), hiperemia conjuntival não purulenta e sem prurido, artralgia, mialgia, astenia e cefaleia (BRASIL, 2015). Como sintomas incomuns, podem surgir, dor retro-orbital, anorexia, vômitos, diarreia, dor abdominal e mucosite (BRASIL, 2016). Em alguns pacientes pode ocorrer também hematoespermia (BRASIL, 2015).

Por muito tempo a doença causada pelo ZIKV foi considerada sem consequências graves, até que depois do primeiro surto na Oceania foram relatados vários casos de associação entre a infecção do ZIKV com a Síndrome de Guillain-Barré (SGB), que afeta principalmente os neurônios motores (PRADHAN et al., 2017). Além disso, também foram descritas complicações neurológicas como encefalite, meningoencefalite, paraestesia, paralisia facial e mielite (PRADHAN et al., 2017; SOARES et al., 2016; LANDAIS et al., 2017). A vigilância epidemiológica da Polinésia Francesa mostrou que de 397 amostras positivas para o ZIKV, foram registrados 38 casos de síndrome de Guillain-Barré após a infecção por ZIKV, com 25 pacientes com complicações neurológicas e 7 com outras complicações (EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL, 2014).

Contudo, o quadro que mais despertou preocupação nas autoridades de saúde foram as sequelas apresentadas por recém-nascidos decorrentes de gestantes que contraíram a infecção pelo ZIKV (BRASIL, 2016). Um padrão típico de características clínicas e achados de imagens em crianças afetadas surgiu, originando a Síndrome Congênita do Zika vírus, que reúne aspectos clínicos resultantes do dano neurológico direto e da perda de volume intracraniano grave, tais como microcefalia; desproporção craniofacial e *cutis gyrata*; hipertonicidade e hiperreflexia; convulsões; irritabilidade; achados neurorradiológicos anormais; disfagia e outras dificuldades de alimentação; anormalidades oculares; e perda de audição sensorial (MOORE et al., 2017).

Como outras arboviroses relevantes também são transmitidas pelo mosquito do gênero *Aedes*, como a dengue, a chikungunya e a febre amarela, o diagnóstico diferencial é muito importante e ao mesmo tempo torna-se difícil, visto que, todas apresentam-se como infecções

febris de sintomatologia semelhante. Nesse contexto, o diagnóstico laboratorial específico baseia-se principalmente na detecção de RNA viral pela técnica de RT-qPCR. Suas limitações estão no período curto para coleta no material biológico e a detecção direta do vírus no sangue deve ser em até 4-7 dias após o início dos sintomas. A pesquisa por sorologia para titulação de anticorpos IgM/IgG usando os testes de ELISA e de imunofluorescência, deve ser realizada a partir do 5º dia após o início dos sintomas (BRASIL, 2016).

2.3 O ZIKV na Placenta

2.3.1 Transmissão placentária do ZIKV

Ainda não está claro o mecanismo que o ZIKV usa para infectar o feto e alguns trabalhos apresentaram hipóteses de quais seriam os caminhos para a ocorrência da infecção fetal pelo ZIKV. Tabata e colaboradores (2016) acreditam que a infecção poderia ter início através da decídua parietal, por onde o ZIKV se disseminaria dos vasos sanguíneos maternos para as células CTEV presentes no córion liso, propagando-se assim, para as células progenitoras trofoblásticas (TBPCs) e para as células epiteliais amnióticas (AmEpCs) na membrana amniocoriônica, passando ainda para o líquido amniótico e o embrião/feto em formação. O mesmo trabalho também teoriza que a infecção também poderia ocorrer pelo processo de transcitose mediada por um imunocomplexo via receptor de fração Fc (FcR).

Além disso, tem sido proposto que doenças maternas pré-existent produziram anticorpos reativos para ZIKV, mas com baixo poder neutralizante, e eles promoveriam a infecção de células portadoras FcR para a imunoglobulina G (IgG). O imunocomplexo ZIKV-IgG, passaria pelo sinciotrofoblasto, pelo processo de transcitose, que é o mecanismo de translocação através da membrana plasmática, e conseguiria infectar o citotrofoblasto viloso adjacente, e as células de Hofbauer que expressam os FcR (TABATA et al., 2016; LEE; SHIN, 2019; KHAIBOULLINA et al., 2019). Esse mecanismo já foi descrito para sugerir a infecção do vírus da dengue e do citomegalovírus (TABATA et al., 2016).

Outra possível rota para a infecção é através das células CTEV que estão presentes na decídua basal, por serem expostos ao sangue materno durante remodelação das artérias espiraladas ou pelo contato com células imunes maternas infectadas na capa citotrofoblástica (TABATA et al., 2016). Além disso, a infecção ascendente do ZIKV também é considerada, visto que já foi sugerida sua transmissão sexual (COYNE; LAZEAR, 2016).

Já a hipótese da transferência direta sugere que antes que seja estabelecida a circulação uteroplacentária, ainda no primeiro trimestre da gestação, o ZIKV chegaria à placenta através

das glândulas uterinas. Uma vez dentro das vilosidades coriônicas, o ZIKV infectaria células de Hofbauer e seria liberado para alcançar os vasos embrionários/fetais e disseminar pelo corpo. (ADIBI et al., 2016). No entanto, para infecções mais tardias, no terceiro trimestre e a termo, pouco se sabe sobre a forma como o ZIKV infectaria a placenta, pois a exposição das poucas células do citotrofoblasto viloso é muito reduzida e também há redução das células CTEV, mesmo assim as placentas são passíveis de serem infectadas (MOLÁS et al., 2020; RIBEIRO et al., 2018).

2.3.2 Alterações placentárias causadas pelo ZIKV

Os achados patológicos da placenta infectada por ZIKV são bem diversificados, e são variáveis de acordo com o paciente e a idade gestacional, esses achados em geral são leves e inespecíficos, semelhante a outras infecções placentárias (VENCESLAU, 2020). Em Noronha e colaboradores (2018) foram descritos os principais achados em uma placenta de primeiro trimestre positivas para ZIKV, que foram: inflamação inespecífica do tipo TORCHES (sigla corresponde as seguintes doenças: toxoplasmose, rubéola, citomegalovírus, hepatites, enterobactérias e sífilis), vilite, edema, lesão trofoblástica, aumento de células Hofbauer e infiltrado de linfócitos no estroma. Nas placentas a termo analisadas, as principais alterações foram vilosidades imaturas, persistência da camada do citotrofoblasto nas vilosidades coriônicas junto com o espessamento da lâmina basal trofoblástica, hipervascularização das vilosidades coriônicas, fibrose estromal e hiperplasia de células de Hofbauer. Também foi observado uma quantidade menor de alterações placentárias em pacientes infectadas pelo ZIKV no terceiro trimestre, o que pode indicar que o tempo de infecção é determinante para as alterações detectadas (NORONHA et al., 2018). No trabalho de Maykin e colaboradores (2018) as alterações persistentes foram imaturidade vilosa, deciduíte crônica, fibrose estromal e hiperplasia de células de Hofbauer. Já nas análises de Schwartz e colaboradores (2017), não foram encontradas nenhuma evidência de inflamação significativa nas placentas de fetos com infecção congênita pelo ZIKV, tanto de segundo como de terceiro trimestres de gestação. Foi relatado hiperplasia de células de Hofbauer nas vilosidades coriônicas. A imaturidade vilosa também foi um achado comum em seis placentas analisadas, entre outros achados diversificados (ESQUIVEL, 2018).

2.4 O uso de medicamentos antivirais na gestação

Desde que a Organização Mundial da Saúde (OMS) incluiu o ZIKV na lista do Plano de Pesquisa e Desenvolvimento de doenças com tratamentos negligenciados e com potencial

para causar emergência de saúde pública em 2018 (OMS, 2018), a busca por novas terapias e medicamentos que possam ser usados contra o ZIKV tornou-se constante. Até o momento não existe medicamento ou vacina aprovada contra o ZIKV, o tratamento da infecção se dá apenas de terapia sintomática (VALENTINE; MARQUEZ; PAMMI, 2016; MASMEJAN et al., 2018). Os candidatos à droga devem ter como característica fundamental, à segurança durante a gestação, visto que é o público que tem os maiores danos (MASMEJAN et al., 2018). Os medicamentos que já são liberados, os que apresentaram efeitos antivirais, ou já apresentam contraindicações para gestantes ou não possuem dados em gestantes, como exemplo: a quinacrina, o fluorouracil, a ribavirina (MASMEJAN et al., 2018; SOUZA et al., 2020).

Assim como acontece com todos os medicamentos, a variedade de medicação disponível é limitada quando se é tratamento de gestantes, como exemplo, a classe de antivirais dos análogos de nucleosídeos, que incluem o aciclovir, o valaciclovir, o famciclovir, o ganciclovir, o cidofovir e a ribavirina. Apenas, aciclovir e valaciclovir, podem ser usados durante a gestação, os demais agentes desta classe são raramente usados devido a dados limitados ou risco alto de teratogenicidade (COTTREAU, BAR, 2016). Assim, diante dessa realidade a vacinação acaba sendo uma estratégia importante na prevenção de danos maternos e fetais, mas muitas doenças não têm essa disponibilidade, como é o caso da infecção por ZIKV, tornando a profilaxia antiviral e tratamento necessários (GOH et al., 2020).

Em outros casos, o uso de antivirais durante a gestação depende de uma avaliação individual sobre o risco X benefício para a mãe e para o feto. Por exemplo, o citomegalovírus é conhecido por sua transmissão intrauterina que pode causar deficiências neurológicas e a perda permanente da visão e da audição; e o tratamento antiviral durante a gravidez não é recomendado visto que não há estudos que garantam a segurança e a melhora do resultado perinatal (American College of Obstetricians and Gynecologists, 2015; DAVIS et al., 2017). Já com relação ao vírus da hepatite C, aproximadamente 80% das crianças que adquirem o vírus por transmissão vertical evoluem para a infecção crônica, e o tratamento durante a gestação também não é recomendado devido à falta de informação de eficácia e segurança (FRERIKSEN et al., 2019). Contudo, a terapia retroviral contra o vírus do HIV, demonstra uma eficiência na redução de transmissão vertical do vírus sem aumentar o risco de defeitos às crianças expostas a esse tratamento (BAILEY et al., 2018).

Outrossim, observa-se a necessidade da descoberta de novos agentes antivirais, sobretudo, obtidos a partir de produtos naturais, os quais podem ser uma rica fonte de obtenção para a descoberta de ativos eficazes que possam principalmente ser usados durante a gestação (GOH et al., 2020)

2.5 Produtos Naturais

Os produtos naturais representam uma grande diversidade de fonte de obtenção compostos químicos com um amplo espectro de propriedades biológicas, destinados a usos diversos como na terapêutica humana e veterinária, na agricultura, cosméticas, nutricionais, entre outros (KATZ; BALTZ, 2016). Desde o surgimento da humanidade muitos dos medicamentos gerados foram a partir de produtos naturais ou dos seus derivados (KO, 1999; TYLER, 1996). Uma demonstração do potencial dos produtos naturais, foi que entre os anos de 1940 a 2014, pelo menos 49% de todas as moléculas aprovadas pela Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos, era derivado ou era obtido de um produto natural (KATZ; BALTZ, 2016).

Dentre as várias classes de medicamentos, os produtos naturais têm sido um vasto reservatório de substâncias utilizadas com atividade antiviral, que podem contribuir para o desenvolvimento de uma terapia antiviral segura e eficaz, muito necessária para tratamento da doença de Zika (KOEHN; CARTER, 2005; LI; VEREDAS, 2009). O desenvolvimento de compostos antivirais a partir de moléculas sintéticas tem um custo mais elevado e geralmente leva um tempo maior para ser projetado e validado, e de certa forma a descoberta de compostos antivirais pelos produtos naturais oferece uma alternativa mais econômica e simples, pela sua acessibilidade e disponibilidade (CLAIN et al., 2018; GOH, 2020). Pode ser citado os compostos polifenóis, que são encontrados em frutas, vegetais, vinho e chá, e chamam a atenção pela variedade das atividades biológicas descritos, como: antimicrobiano, antioxidante, anti-inflamatório, e anti-cancerígeno (VÁZQUEZ-CALVO et al., 2017). Dentro dos polifenóis, a classe dos flavonoides, possuem mais de 4000 mil compostos identificados, diante da complexidade das estruturas químicas que possuem podem apresentar potenciais atividades antivirais de amplo espectro que podem direcionar diferentes enzimas para interromper o ciclo de replicação viral (KUMAR, PANDEY, 2013; OLIVEIRA et al., 2017;).

Vale ressaltar que apesar de todos os benefícios possibilitados pelos produtos naturais, os medicamentos derivados deles não devem ser negligenciados quanto a possíveis riscos a saúde, como qualquer medicamento (CALITZ et al., 2014).

Assim, diante de todo potencial dos produtos naturais, buscamos avaliar algumas espécies diante da infecção do ZIKV, espécies essas que são facilmente encontradas na região e que já apresentaram algum efeito promissor quanto a outras infecções virais.

2.5.1 *Passiflora edulis*

A espécie *Passiflora edulis*, também é conhecida como maracujá amarelo, pertence à família Passifloraceae, trata-se de uma planta lenhosa, perene e trepadeira (Fig.6) (DHAWAN; DHAWAN; SHARMA, 2004). O maracujá amarelo é amplamente encontrado nas regiões tropicais e subtropicais em várias partes do mundo (ZHANG et al., 2016). Essa espécie possui, aproximadamente, de 6-12 cm de comprimento; sua casca é amarela brilhante, dura e espessa; e as sementes são pretas; a polpa é ácida e possui um sabor forte (NARIN et al., 2014; XE et al., 2020). Essa fruta possui grande importância econômica e medicinal, sendo muito usada no ramo cosmética, alimentício e farmacêutico (He et al., 2020). Popularmente é usado para preparos de chás e néctar, com as principais finalidades de sedativos e tranquilizantes (Cauz-Santos et al. 2017).

Figura 6: Espécie *Passiflora edulis*



Fonte: BERNACCI et al., 2008.

As diferentes partes da *Passiflora edulis*, como: casca, polpa, flor e as folhas tem sido descrita como possuidoras de variadas aplicabilidades: na produção de farinhas, suplementos, sucos, néctar, chás, medicamentos e até decorativa (CAUZ-SANTOS et al. 2017). Já a semente é a parte menos explorada, basicamente ela é usada para retirada de óleos essenciais e proteínas, e como sobra dessa exploração ficam resíduos que são basicamente descartados, mesmo esses resíduos sendo ricos em diversos compostos interessantes, dessa parte normalmente descartada pelo mercado é possível retirar um extrato etanólico (HE et al., 2020; XAVIER ET al., 2020), e nesse trabalho usamos exatamente esse extrato etanólico da semente de maracujá (ESM).

Através da análise separação cromatográfica e detecção por espectrômetria de massas, do extrato da semente da *Passiflora edulis* foram identificados os seguintes compostos: piceatanol, adstringina, acirpusina B, scirpusina A, isookanina-7-O-glicosídeo, naringenina-7-

O-glicosídeo, L-tirosina, L-fenilalanina, derivado I do quadrangulosídeo e derivado II do quadrangulosídeo (XAVIER et al., 2022).

Dentre eles um destaque para o piceatanol, uns dos compostos majoritários das sementes, é um fitoquímico estilbeno polifenólico conhecido por ser um análogo hidroxilado do resveratrol (KERSHAW e KIM, 2017; RODRÍGUEZ-CABO et. al., 2014; MATSUI et. al., 2010). Em ratos, foi demonstrado uma regulação positiva de mRNA de SIRT (silent mating type information regulation 2 homolog) após a ingestão de piceatanol (KAWAKAMI et al., 2017). E essa ativação de SIRT1 pode ser benéfica em doenças como diabetes mellitus tipo 2 e doenças neurodegenerativas (LAVU et. al., 2008). O piceatanol também foi relacionado à atividade potente antioxidante e efeito vasodilatador (SANO et al., 2011), com regulação positiva de óxido nítrico endotelial (KINOSHITA et al., 2013). Em humanos, a sua suplementação mostrou uma melhora na sensibilidade à insulina e capacidade da redução da pressão arterial e frequência cardíaca (KITADA et al., 2017).

O flavonoide, Naringenina-7-O-glucoside, que é encontrada principalmente em frutas cítricas, já foi demonstrado a inibição do ciclo de replicação do DENV (FRABASILE et al., 2017). Achika, 2020 e colaboradores mostram o potencial antimicrobiano desse composto, contra 7 tipos de bactérias. E diante do ZIKV, o flavonoide Naringenina (4, 5, 7-tri-hidroxi-flavanona) já mostrou resultados positivos impedindo a replicação do vírus *in vitro* na linhagem celular de adenocarcinoma e células dendríticas (CATANEO, 2019). E a molécula Naringenina mono-7-O-éteres também foi capaz de impedir a infecção do ZIKV em células de melanoma e carcinoma de mama (MENDES et al., 2020).

2.5.2 *Schinus terebinthifolius* Raddi

A *Schinus terebinthifolius* Raddi, pertencente à família Anacardiaceae, possui uma distribuição tropical e subtropical, e é nativo da América do Sul e se espalhou para outras regiões da América Central, Europa, Ásia e África (ANDRADE; PONCELET; FERREIRA, 2017), e no Brasil é popularmente chamada de aroeira, pimenta rosa, pimenta brasileira ou mástique vermelha (Fig.7) (PAGANI et al., 2014). Sua casca, fruta e folhas (Fig. 7) já tem destaque no ramo alimentício e medicinal (BRANDÃO et al., 2006). Na medicina popular tem destaque para o uso em tratamentos de infecções respiratórias, urinárias e feridas, e na culinária é amplamente utilizada como condimento e em molhos (LORENZI e MATOS, 2002; BERNARDES et al., 2014; PAGANI et al., 2014).

Figura 7: Espécie *Schinus terebinthifolius* Raddi



Fonte: BRASIL, 2014

Esta planta é uma das espécies com propriedades medicinais descritas na Relação Nacional de Plantas Mediciniais (RENISUS), que são de interesse do Sistema Único de Saúde (SUS) por possuírem efeitos cicatrizantes, anti-inflamatórios e anti-séptico tópico (RENISUS, 2009) e também está presente na Forma Fitoterápica da Farmacopeia Brasileira (ANVISA, 2011).

Para esse trabalho foram utilizado os extratos etanólico da fruta da *Schinus terebinthifolius* Raddi e da casca da fruta da *Schinus terebinthifolius* Raddi, e na literatura o extrato da fruta já demonstrou ter significativa atividade antioxidante (OLIVEIRA et al., 2020), anti-hipertensivo (LIMA et al., 2017), antibacteriano (LIDEN et al., 2020; PINTO et al., 2020), de cicatrização (KOMATSU et al., 2019; SCHEIBE et al., 2016), anti-inflamatória (FERIANI et al., 2020), anti-helmintíco (SILVA et al., 2018).

Através do uso de HPLC (Cromatografia Líquida de Alto Desempenho), foram detectado a presença de compostos fenólicos como o ácido gálico e ácido p-cumárico, catequina, epicatequina e resveratrol que foram identificados em ambos os extratos, diferenciando apenas nas concentrações (ROCHA et al., 2019). Dessas substâncias encontradas todas já foram descritas na literatura por apresentar atividade antiviral (ROCHA et al., 2019; LIMA et al.; 2017). Outros estudos também mostraram a presença de naringenina, ácidos vanílico e cumárico, rutina, luteolina e caempferol no extrato da fruta da Pimenta Rosa (GLORIA et al., 2017; Tlili et al., 2018).

2.5.3 *Moringa oleífera*

A espécie *Moringa oleífera* é uma árvore que pertence à família Moringaceae, é nativa das florestas tropicais da Índia (STEVES et al., 2015), e é comumente conhecida como “raiz-forte” (Fig. 8) (GOPALAKRISHNAN et al., 2019). É uma planta amplamente utilizado em ingredientes alimentícios, nutracêuticos e medicamentos (DHAKAD et al., 2019).

Figura 8: Espécie *Moringa oleífera*



Fonte: STEVES et al., 2015

Seu uso é muito antigo, como o óleo de *Moringa oleífera* que estava presente nos cuidados de pele dos antigos egípcios, assim como os curandeiros tradicionais indianos que usavam a espécie para fins curativos de diversas enfermidades (MAHMOOD; MUGAL; HAQ, 2010). Até a década de 90 a moringa era, majoritariamente, consumida nas suas áreas de origem, quando a partir de 2001 seu uso nutricional e propriedades médicas se espalhou para diversos países tropicais e subtropicais quando a espécie foi apelidada de “árvore milagrosa” e “presente natural” (MUTHEESWARAN et al., 2011; MAHMOOD; MUGAL; HAQ, 2010).

Basicamente todas as partes da espécie *Moringa oleífera* são amplamente utilizadas para diferentes fins: as sementes, folhas, casca, flores e raízes (POPOOLA; OBEMBE, 2013). As sementes são mais usadas na nutrição humana e animal (ABE; OHTANI, 2013); as cascas usadas em preparações de bebidas e infusões para tratar doenças estomacais (POPOOLA; OBEMBE, 2013); as raízes usadas como remédio de dor de dente e estimulantes sexuais (SIVASANKARI; ANANDHARAJ; GUNASEKARAN, 2014); as flores usadas como afrodisíacos e para tratar inflamações (ANWAR et al., 2007). Mas as folhas da moringa são as mais utilizadas, ela recebeu um destaque pela riqueza e equilíbrio nutricional, contendo aminoácidos, vitaminas, minerais e ácidos graxos (SUN et al., 2017), além de vários tipos de

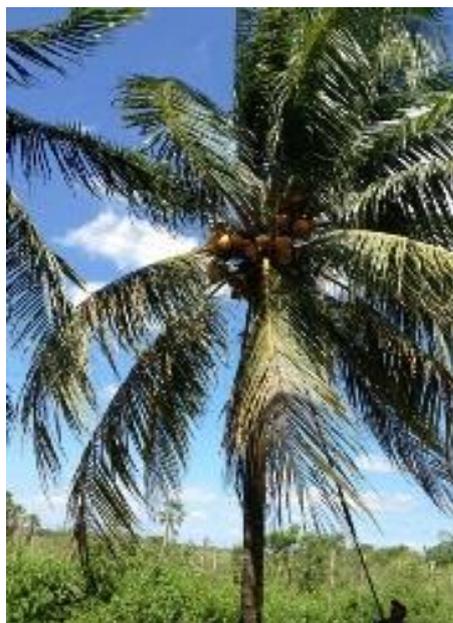
compostos antioxidantes, como ácido ascórbico, flavonoides, fenólicos e carotenoides (ALHAKMANI et al., 2013; VONGSAK et al., 2014).

Para esse trabalho foi utilizado o extrato etanólico da folha da moringa, e em estudo de cromatografia gasosa-espectrometria de massa das folhas dessa planta revelou um total de 35 compostos; dentre eles os mais importantes foram: o ácido n-hexadecanóico, o ácido tetradecanóico, o ácido cis-vacênico, o ácido octadecanóico, o cloreto de palmitoila, beta-l-ramnofuranosídeo, 5-O-acetil-tio-octilo, gama-sitosterol e preña-7-dieno-3-ol-20-ona (BENNETT et al., 2013). E a análise quantitativa HPLC do extrato da folha da *Moringa oleífera*, mostra como principais componentes ativos o ácido clorogênico e a isoquercetina (VONGSAK et al., 2013). E essa fração já demonstrou atividade antiviral contra o vírus da hepatite B (BAGHERI et al., 2020).

2.5.4 *Cocos nucífera*

A espécie *Cocos nucífera*, é uma árvore com grande importância econômica no mundo, ela pertence à família Arecaceae, popularmente conhecida como coco, coco-da-bahia ou cocoda-praia (Fig.9) (LIMA et al., 2015; ROSA et al., 2001). É uma planta originária do sudeste asiático e das ilhas que ficam entre o oceano Pacífico e Índico (LIMA et al., 2015).

Figura 9: Espécie *Cocos nucífera*



Fonte: LIMA et al., 2015

Todas as partes dessa espécie são aproveitadas economicamente, principalmente a água do coco, muito consumida *in natura* (ROSA et al., 2001). A indústria usa a fibra da casca do coco como matéria-prima para produção de tapetes, estofados e como fertilizantes para agricultura. O caule e as folhas são usados na construção civil e de onde pode-se extrair açúcar, vinagre e álcool (FONTENELE, 2005).

E como exemplo do seu amplo e variado uso medicinal pode-se citar: o uso do extrato da casca do *Cocos nucífera* para tratar diarreia, para o tratamento oral de asma, tratar a diabetes, e a gonorreia (HOPE et al., 1993; MITCHELL et al., 2006; RAMIREZ et al., 1988). O óleo de coco muito usado nos cuidados contra queda de cabelo, e também como pomada para queimaduras (WENIGER et al., 1986). O leite do coco é usado como anticoncepcional oral (SACHS; EICHEL; ASSKALI, 2002; MITCHELL et al., 2006), e o extrato da raiz usada para tratar febre e diarreia (SACHS; EICHEL; ASSKALI, 2002).

Para esse trabalho foi usado o extrato etanólico da casca do coco, a literatura mostra que a fumaça líquida destilada da casca do coco foi capaz de melhorar a cicatrização de ferida traumática em ratos diabéticos, e ainda foi identificado os seguintes componentes em maior quantidade na fumaça: fenol (36,6%), 2-metoxifenol (guaiacol) (25,2%), furfural (17,8%) e 4-etil-2-metoxifenol (3,5%) (SURBOYO et al., 2019). O extrato da casca do coco também mostrou potencial contra infecções fúngicas dérmicas (KHALID et al., 2016). O extrato da fibra da casca mostrou atividade inibitória contra vírus herpes simples tipo I, e foi observado que essa fração é rica em catequina (ESQUENAZI et al., 2002). E o extrato aquoso da fibra da casa demonstrou um efeito antitumoral em linhagem celular de leucemia multirresistente (KOSCHEK et al., 2007).

No entanto não existem trabalhos que demonstrem a ação desses extratos vegetais em células placentárias diante da infecção do ZIKV. E diante da falta de tratamento e dos grandes prejuízos que essa infecção pode causar para adultos e recém-nascidos, se faz necessários a investigação de novos compostos para um tratamento eficiente.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito antiviral dos extratos etanólicos obtidos das espécies *Passiflora edulis*, *Schinus terebinthifolius* Raddi, *Moringa oleífera*, *Cocos nucífera*, sobre a resposta de células da placenta exposta ao ZIKV.

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar a viabilidade das células de cultura primária de explante de vilosidade coriônica de placenta a termo e na linhagem HTR-8SV/neo, diante da exposição com os extratos.
- Avaliar o potencial antiviral dos extratos diante de uma infecção *in vitro* pelo ZIKV em células placentárias.
- Determinar o efeito dos extratos frente a proliferação celular de HTR-8SV/neo em uma infecção *in vitro* pelo ZIKV.
- Avaliar a expressão de citocinas em explantes de vilosidade coriônica de placenta a termo e na linhagem HTR-8SV/neo diante da infecção pelo ZIKV.

4 METODOLOGIA

4.1 Obtenção dos extratos vegetais

Todos os extratos utilizados nesse trabalho foram gentilmente cedidos pelas Prof^a Dr^a. Marília Goulart e Prof^a Dr^a. Jadriane Xavier, do laboratório de eletroquímica e estresse oxidativo da Universidade Federal de Alagoas.

4.1.1 Extrato etanólico de semente de *Passiflora edulis* e extrato etanólico da folha da *Moringa oleífera*

As sementes de *Passiflora edulis* e a folha da *Moringa oleífera* foram previamente secas em estufa a 50 °C por 48 h. Após secagem, as sementes foram trituradas em moinho de facas (Oster) e posteriormente armazenadas em frascos âmbar com tampa. A extração foi realizada em aparelho de Soxhlet, foram pesados 12 g do material, primeiramente foi realizada extração com hexano por 6 h para desengordurar as amostras e só então prosseguimos com a extração em etanol por 6 h. O material extraído foi concentrado em rota-evaporador (Buchi), para eliminação do solvente; o extrato foi então transferido para um vidro âmbar e armazenado sob refrigeração (XAVIER et al, 2020).

4.1.2 Extrato etanólico da *Schinus terebinthifolius* Raddi

As cascas e frutos inteiros de *Schinus terebinthifolius* Raddi são produtos artesanais, fornecidos por agricultores familiares da Associação Aroeira, supervisionados pelo Instituto Eco Engenho, em Maceió, Alagoas, Nordeste do Brasil, mantidos em sacos de alumínio, sob vácuo. As plantas foram identificadas pela Sra. Rosângela P. L. Lemos e as amostras foram depositadas no herbário do Instituto do Meio Ambiente, Estado de Alagoas, Brasil. Os extratos brutos dos frutos inteiros *Schinus terebinthifolius* Raddi e da casca do fruto de *Schinus terebinthifolius* Raddi foram preparados com etanol, em aparelho Soxhlet, aquecido por um período de 6 h. O solvente foi removido em um evaporador rotativo, para obter o material vegetal. Logo depois foram armazenados em vidro âmbar, sob refrigeração a 5 °C (OLIVEIRA et al., 2020).

4.1.3 Extrato etanólico da fibra da casca de *Cocos nucífera*

As fibras de casca de árvore *Cocos nucífera* foram processadas em estufa de ar circulante, a uma temperatura de 40 °C, e em pó em moinho de laboratório. O extrato etanólico de fibra de casca de *Cocos nucífera* foi preparada percolando 400 g de pó de casca duas vezes

em 6 L de etanol por 72 h. O extrato etanólico foi concentrado sob a temperatura de 35 °C, usando um rota-evaporador e depois armazenado e refrigerado.

4.2 Propagação viral em células C6/36 e estoque viral

Duas cepas do ZIKV foram gentilmente doadas pelo Prof. Dr. Juliano Bordignon do ICC/FIOCRUZ/PR: a cepa MR766 (proveniente da Uganda, na terceira passagem, com título $6,25 \times 10^7$ FFU/mL, acesso GenBank KX421193) e a cepa PE243 (isolada em Pernambuco, na terceira passagem, com título 1×10^8 FFU/mL, acesso GenBank 335 MF352141.1). Também obtivemos colaboração essencial dos professores Ênio José Bassi e Alessandra Abel Borges do LAPEVI-ICBS-UFAL, que contribuíram cedendo o espaço e a expertise do laboratório para realização da propagação e da titulação viral, assim como o uso das células C6/36 e Vero, respectivamente. Para propagar os vírus e realizar um estoque viral, cultivou-se a linhagem celular C6/36, originada do mosquito *Aedes albopictus* em meio L-15 (Leibovitz), suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (SBF), 10% de Triptose e 1% de PSA (penicillin/streptomycin antibiotic), até uma confluência de 80%. Em seguida, foi realizada a infecção viral com 600 µL de cada vírus por garrafa e no controle negativo foi colocado 600µL de meio de cultura. As garrafas infectadas ou não infectadas foram incubadas a 37 °C e 5% de CO₂ por 90 min, agitando gentilmente a cada 15 min. Após a incubação, os sobrenadantes foram retirados e 12 mL de meio L-15 suplementado foi adicionado para período de incubação de 5 dias. Posteriormente, os sobrenadantes foram coletados, aliquotados em microtubos e armazenados a -80 °C.

4.3 Titulação viral por PFU (Unidade Formadora de Placas)

Para a titulação viral, foi utilizada a linhagem células vero, originada do rim de macaco verde africano, que foi cultivada em meio DMEM (Dulbecco modification of. Minimum Essential Media) suplementado com 10% de SBF e 1% de PSA (Gibco, Gibco Industries Inc., EUA) e transferida para placas de 24 poços. Posteriormente, diluições seriadas dos sobrenadantes infectados foram preparadas a partir de 10⁻¹ até 10⁻¹⁰, e inoculadas nos respectivos poços durante 1 h, agitando levemente a cada 15 min. Após a remoção do meio, as monocamadas infectadas foram cobertas com 1,5% de carboximetilcelulose (CMC) / DMEM com 2% de SBF na proporção de 1: 1 (v/v). A formação de placas foi detectada no dia 5, após a fixação com solução de formalina tamponada a 10% e coloração com 2% de cristal violeta. A contagem do título viral foi realizada por meio do cálculo estabelecido para o método.

$$\text{PFU} = \frac{\text{m\u00e9dia de placas} \times \text{dilui\u00e7\u00e3o do po\u00e7o}}{\text{volume do in\u00f3culo}}$$

Ap\u00f3s a titula\u00e7\u00e3o viral, classificamos o estoque de MR766 a um t\u00edtulo de 5×10^5 PFU/mL e o estoque de PE243 a um t\u00edtulo de 3×10^5 PFU/mL, podendo ent\u00e3o seguir para as infec\u00e7\u00f5es in vitro de nosso interesse.

4.4 Cultura celular (linhagem HTR-8 / SVneo)

A linhagem HTR-8/SVneo (ATCC® CRL-3271™), originada de c\u00e9lulas CTEV de primeiro trimestre de gesta\u00e7\u00e3o, foi gentilmente doada pela Prof^a Dr^a Estela Bevilacqua da Universidade de S\u00e3o Paulo (USP). As c\u00e9lulas foram mantidas em garrafas de 75 cm² com 10 mL de meio Eagle modificado por Dulbecco/mistura de nutrientes F-12 (DMEM/F12) suplementado com 10% de SBF e 0,1% de antibi\u00f3ticos (penicilina/estreptomicina, gentamicina) e anfotericina B (todos da Sigma-Aldrich), em incubadora \u00famida a 37 °C e 5% de CO₂. As c\u00e9lulas foram subcultivadas a cada 5 dias com 80% de conflu\u00eancia e o meio foi trocado a cada 2 dias.

4.5 Cultura de Explantes de Vilosidades Cori\u00f4nicas

Placentas a termo (37-40 semanas de gravidez) provenientes de gesta\u00e7\u00f5es saud\u00e1veis foram coletadas no momento do parto no Hospital Universit\u00e1rio Professor Alberto Antunes (HUPAA) ou no Hospital Geral Santo Ant\u00f4nio em Macei\u00f3/AL, conforme os princ\u00edpios \u00e9ticos, pr\u00e1ticos e de biosseguran\u00e7a estipulados pelo Minist\u00e9rio da Sa\u00fade e pela Comiss\u00e3o de \u00c9tica em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Alagoas (57828616.3.0000.5013). Tendo como crit\u00e9rios de inclus\u00e3o: acompanhamento de pr\u00e9-natal e protocolo terap\u00eautico; aus\u00eancia de enfermidades de car\u00e1ter autoimune, infeccioso ou gen\u00e9tico; parto vaginal ou cir\u00fargico no servi\u00e7o obst\u00e9trico da HUPAA ou HGSA; e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido.

As amostras foram lavadas extensivamente em Solu\u00e7\u00e3o fosfato salina (PBS) e Solu\u00e7\u00e3o salina balanceada de Hank (HBSS), at\u00e9 remo\u00e7\u00e3o do excesso de sangue, seguidas da separa\u00e7\u00e3o cuidadosa, com aux\u00edlio de bisturi, das vilosidades cori\u00f4nicas terminais para cultura de explantes de aproximadamente 3-4 mm de di\u00e2metro em placas de 48 po\u00e7os com meio DMEM/F12 suplementado e mantidas em incubadora \u00famida a 37 °C e 5% de CO₂, conforme j\u00e1 descrito em outros trabalhos (MILLER et al., 2005; HERMANNNS et al., 2018).

4.6 Avaliação da viabilidade celular com os extratos pelo ensaio de Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 digeniltetrazolium (MTT)

4.6.1 Linhagem HTR-8SV/neo

As células HTR-8SV/neo e células Vero (3×10^4 por poço), foram plaqueados, em uma placa de 96 poços com meio DMEM/F12 a 2% de SBF. Após as 24 h, foi retirado o meio de cultura e feito o tratamento com os extratos e com o controle positivo, todos diluídos em meio de cultura DMEM-F12 nas concentrações de 0,01 µg/mL, 0,1 µg/mL, 1 µg/mL, 10 µg/mL e 100 µg/mL por 24 h. Foram adicionados nos poços 23 µL de solução MTT, a solução foi realizada na dissolução de 5 mg de MTT em 1000 µL de meio de cultura DMEM-F12, e foi mantida ao abrigo da luz por 4 h. Logo após, foi retirado o meio e adicionado 150 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) por poço, as medidas foram realizadas em leitor de microplacas em um comprimento de onda de 540 nm.

4.6.2 Explante de vilosidades coriônicas

As vilosidades placentárias extraídas foram plaqueadas em placa de 96 poços e em seguida tratadas com os extratos e com o controle positivo, que foram diluídos em meio de cultura DMEM-F12 nas concentrações de 0,01 µg/mL, 0,1 µg/mL, 1 µg/mL, 10 µg/mL e 100 µg/mL, que foi deixado por 24 h. Depois foram adicionados nos poços 23 µL de MTT, a solução foi realizada na dissolução de 5 mg de MTT em 1000 µL meio de cultura DMEM-F12, e foi mantida ao abrigo da luz por 4 h. A placa foi centrifugada por cinco minutos e o meio retirado cuidadosamente com ajuda de uma pipeta, foram adicionados 150 µL de DMSO por poço e as medidas foram realizadas em leitor de microplacas em um comprimento de onda de 540 nm.

4.7 Tratamento com os extratos e infecção por ZIKV

As células HTR-8SV/neo e os explantes foram tratados com os extratos que não demonstraram toxicidade significativa nesses tipos celulares, foram eles o extrato da semente de *Passiflora edulis*, extrato da fruta da *Schinus terebinthifolius* Raddi e extrato da casca da *Schinus terebinthifolius* Raddi. Assim os extratos foram previamente diluídos em meio de cultura DMEM-F12 nas concentrações de 100 µg/mL, 100 µg/mL e 10 µg/mL, respectivamente, por 1 h. Em seguida, as células foram infectadas com as duas cepas virais, já mencionadas, a uma multiplicidade de infecção (MOI) de 1 (LUO et al., 2018) para as células por 24 h, e a 1,5

x 10⁵ PFU/mL (HERMANNNS et al., 2018) para os explantes por 24 h. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS para remoção completa do inóculo e mantidas em DMEM/F12 com 2% de SBF por 24 h em incubadora a 37 °C com 5% CO₂ para posteriores análises.

4.8 Ensaio de citometria de fluxo

Após 48 h do tratamento com extrato e infecção com as cepas virais, as células foram lavadas com PBS e removidas do substrato com tripsina (Gibco, Life Technologies) a 0,5% e a ação enzimática foi neutralizada com SBF. As células foram centrifugadas a 400 g por 5 min a 37 °C e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, foram ressuspensas em 100 µL de solução de PBS com soro de cabra (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) a 10% por 20 min e posteriormente centrifugadas a 400 g por 5 min a 37 °C. As células foram incubadas com o Kit para fixação e permeabilização (e-Bioscience, San Diego, CA, EUA) de acordo com as instruções do fornecedor. Em seguida, as células foram incubadas em tampão de permeabilização com anticorpo primário Anti-ZIKV NS1 (1:100 (v/v)) previamente conjugado com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com FITC (1:2,5 (v/v)) por 1 h em temperatura ambiente. A porcentagem de células infectadas com ZIKV foi analisada com citômetro de fluxo FACS Canto™ II (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA), com o programa FACSDiva (BD Biosciences). Um total de 10.000 eventos foram adquiridos por amostra e os dados obtidos foram analisados utilizando o software FlowJo (BS Biosciences).

4.9 Extração de RNA e qRT-PCR

O RNA viral foi extraído utilizando o Kit de extração Mini Spin Vírus DNA/RNA (Kasvi), seguindo as instruções do fabricante, obtendo um volume final de 30 µL. Posteriormente, o cDNA foi sintetizado e amplificado utilizando protocolo adaptado da transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen), onde 8 µL de RNA viral foram adicionados a uma mistura contendo 1 µL do iniciador ZIKV 1162c (15 µM) (Lanciotti et al., 2008), 1 µL de dNTP (10 mM) e 2 µL de água DEPC. Em seguida esta mistura foi submetida a uma incubação por 5 min a 65 °C, e após resfriamento em gelo, foram adicionados a mesma 4 µL de tampão 5X (250 mM Tris-HCl pH 8.3 a temperatura ambiente), 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 2 µL de DTT (0,1 M), 1 µL de inibidor de RNase (RNaseOUT, Invitrogen) e 1 µL de transcriptase reversa (M-MLV, Invitrogen). A mistura final foi incubada por 50 min a 37 °C e por 15 min a 70 °C. Em seguida, as cópias de RNA viral de ZIKV foram quantificadas utilizando o QuantStudio 5 (Applied Biosystems). Para tal, foi construída uma curva de diluição contendo 5 pontos, com fator de diluição 1:2, onde o ponto de maior concentração correspondia a 2,5 x 10⁵ PFU/µL.

Para amplificação e leitura das cópias de RNA viral de ZIKV foi utilizado o master mix PowerUp SYBR Green para PCR em tempo-real (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante e utilizando o modo de ciclagem padrão (iniciador com $T_m \geq 60$ °C). Para cada reação de amplificação de poço único, um ciclo limiar (Ct) foi avaliado na fase exponencial. Os iniciadores descritos por Lanciotti et al (2008), ZIKV 1086 (5'-CCGCTGCCCAACAAG-3') e ZIKV 1162c (5'- CCACTAACGTTCTTTTGCAGACAT-3') foram utilizados a uma concentração de 500 nM.

4.10 Ensaio de proliferação e ciclo celular por marcação de Ki-67

As células HTR-8SV/neo, após 48h do tratamento e infecção foram fixadas com paraformaldeído a 4% (PFA) em PBS (v/v). Foi realizada permeabilização com Triton X-100, seguido do bloqueio dos sítios antigênicos inespecíficos com pele de peixe a 0,05% em PBS (v/v) por 1 h, seguido de bloqueio da autofluorescência com PBS/glicina 3%. As células foram incubadas com imunocomplexo anti-Ki67 (1:100 anti-mouse) e alexa 555 (2,5:100 anti-mouse), novamente lavadas com PBS e em seguida coradas com DAPI (Dihidrocloreto de 4',6-diamidino-2-fenilindole) (1:1000). Na análise, as células positivas para Ki-67 foram categorizadas nas diferentes fases do ciclo celular, segundo Raynov e colaboradores (2005).

4.11 Detecção de citocinas por ensaio de citometria por beads

Nessa técnica foi usado um kit LEGENDplex (BioLegend) baseado em beads, usando o mesmo princípio básico dos imunoenaios em sanduíche. As beads são diferenciadas por tamanho e intensidade interna de fluorescência. Cada conjunto de esferas é conjugado com um anticorpo específico em sua superfície e servem como esferas de captura para esse analito em particular. Quando um painel selecionado de esferas de captura é misturado e incubado com uma amostra contendo analitos alvo, cada analito se liga às suas esferas de captura específicas. Após a lavagem, um coquetel de anticorpos de detecção biotilado é adicionado e cada anticorpo de detecção no coquetel se ligará ao seu analito específico ligado às esferas de captura, formando assim sanduíches de anticorpo de captura para análise de esferas e analitos. A estreptavidina-ficoeritrina (SA-PE) é subsequentemente adicionada, que se ligará aos anticorpos de detecção biotilados, fornecendo intensidades de sinal fluorescente na proporção da quantidade de analitos ligados. Uma vez que as esferas são diferenciadas por tamanho e intensidade de fluorescência interna em um citômetro de fluxo, populações específicas de analitos podem ser segregadas e quantificado o sinal fluorescente de PE. A concentração de um analito específico é determinada usando uma curva padrão gerada no mesmo ensaio.

Após o tratamento com os extratos e infecção viral, os sobrenadantes das células HTR-8SV/neo foram avaliados pelo kit LEGENDplex Anti-virus Response Panel (BioLegend, EUA) quanto a presença das citocinas Interferon (IFN)- λ 1, IFN- λ 2-3, IFN- α 2, IFN- β , e IFN- γ , interleucina (IL)-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, proteína 10 induzida pelo IFN- γ (IP-10), fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) e fator de necrose tumoral (TNF- α). Resumidamente, os sobrenadantes e os padrões de citocinas do kit foram incubados com microesferas de captura de dois tamanhos e níveis diferentes de fluorescência e recobertas com anticorpos específicos para as respectivas citocinas e com o anticorpo de detecção marcado com ficoeritrina (PE). Após as incubações de 2 h no escuro e à temperatura ambiente, foi adicionado estreptavidina-ficoeritrina (SA-PE) o qual se ligará aos anticorpos de detecção biotinilados, fornecendo sinal fluorescente com intensidades em proporção à quantidade de analito ligado. Após esse período, a solução de lavagem foi adicionada e o material centrifugado. Por fim a detecção das citocinas foi realizada em citômetro de fluxo FACSCantoTM II equipado com o programa de computador FACSDiva (BD bioscience), com a aquisição de 3.000 microesferas. Os resultados da citometria de fluxo foram convertidos para a secreção de pg/mL usando o programa LEGENDplex v8.0 (BioLegend, EUA).

4.12 Análise Estatística

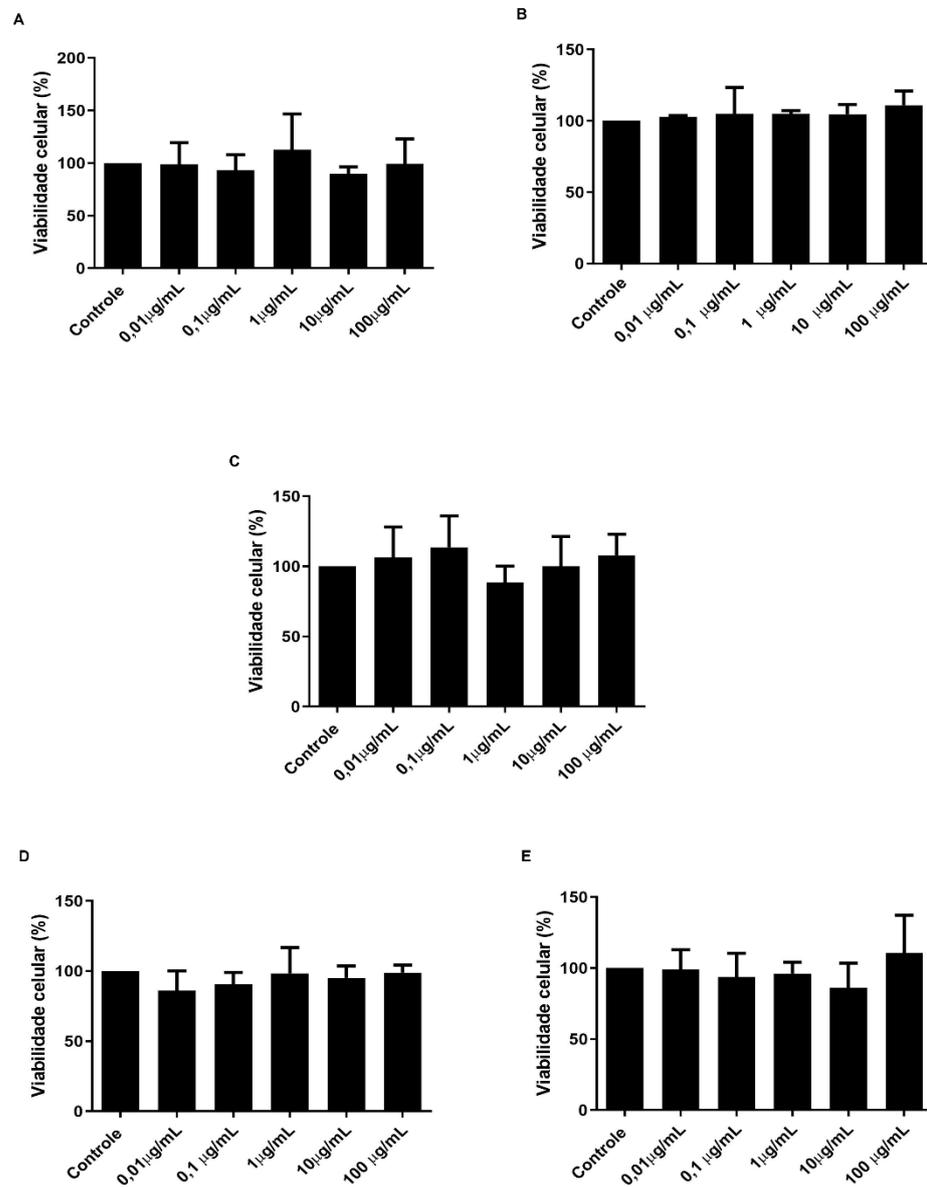
Os ensaios foram realizados em triplicata para cada amostra e os resultados foram expressos em média e desvio padrão. A avaliação estatística foi determinada utilizando testes não paramétricos, ANOVA, seguidos do pós-teste de Dunnett ou Tukey, e Kruskal Wallis, dependendo do experimento. Na legenda das figuras estará indicado o tipo de análise estatística realizada, assim como o número de experimentos realizados. Valores estatisticamente significantes foram considerados quando $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas no GraphPad Prism v.7 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

5 RESULTADOS

5.1 Ensaio de viabilidade celular

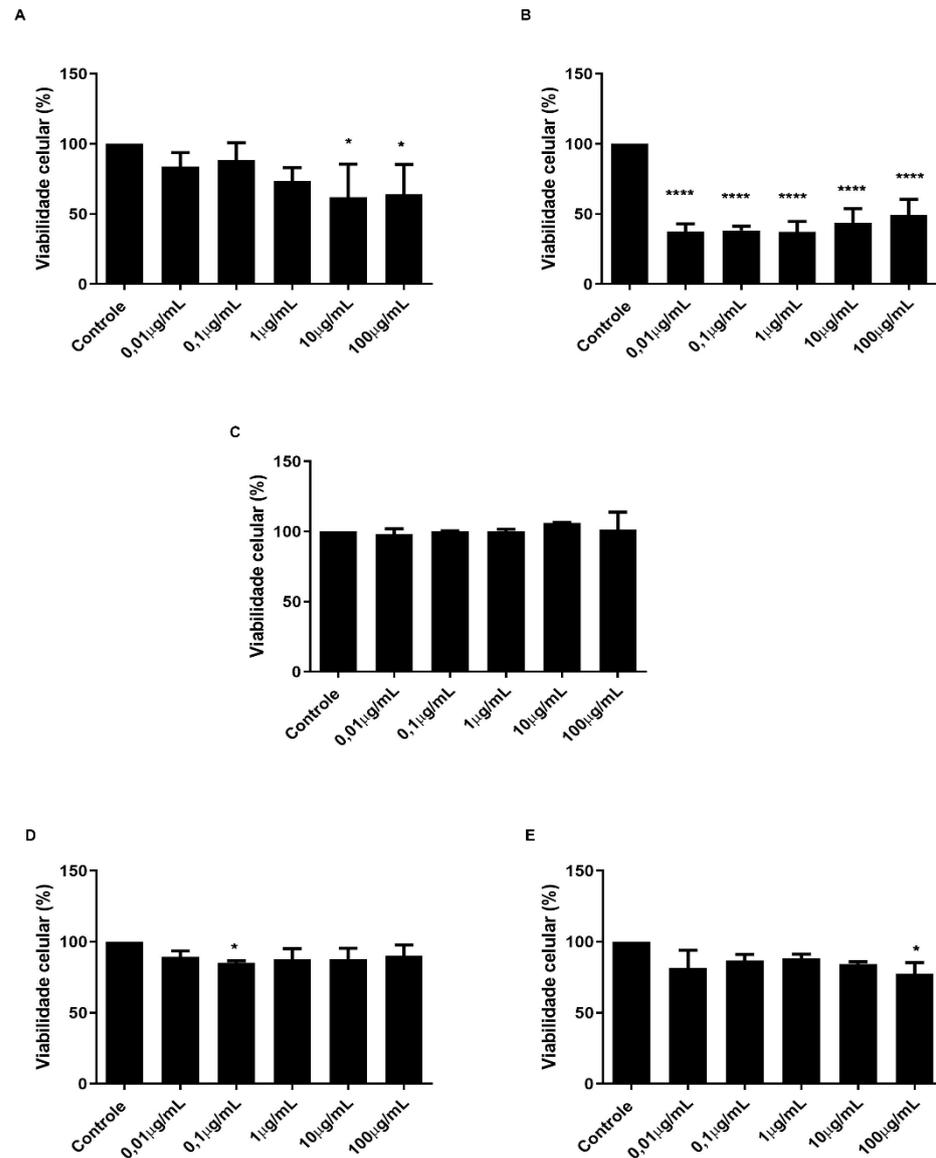
A fim de verificar a viabilidade da linhagem celular HTR-8SV/neo e do explante de vilosidade coriônica diante da exposição aos extratos, realizou-se o ensaio de viabilidade celular por MTT. Os resultados mostraram que, nas concentrações testadas, nos explantes de vilosidade coriônica, nenhum extrato alterou significativamente a viabilidade celular (Fig.10). O explante de vilosidade coriônica possui uma estrutura funcional da placenta e apresenta papel primordial como barreira física e imunológica, sendo mais resistente (COYNE, 2016). Já no ensaio com a linhagem celular HTR-8SV/neo, o extrato da *Moringa oleífera* reduziu a viabilidade celular nas concentrações de 10 µg/mL e 100 µg/mL, e o extrato da *Cocos nucífera* mostrou-se o mais tóxico, reduzindo a viabilidade em todas as concentrações testadas. Já o extrato da *Passiflora edulis* não foi capaz de reduzir a viabilidade celular em nenhuma concentração usada (Fig.11). Com o extrato da fruta da *S. terebinthifolius* Raddi observou-se uma redução na viabilidade celular na concentração de 0,1 µg/mL, e o extrato da casca da *S. terebinthifolius* Raddi mostrou uma redução significativa da viabilidade celular na maior concentração usada, 100µg/mL (Fig. 11).

Figura 10: Análise da viabilidade celular com os extratos em explante de vilosidade coriônica



Legenda: Ensaio de viabilidade para as diferentes concentrações do extrato da folha de *Moringa oleífera* (A), extrato de fibra de *Cocos nucífera* (B), extrato da semente da *Passiflora edulis* (C), extrato da fruta da *S. terebinthifolius* Raddi (D) e extrato da casca da *S. terebinthifolius* Raddi (E) em células HTR-8SV/neo. Teste de múltipla comparação ANOVA one-way com teste post-hoc de Dunnett, n=3 em triplicata.

Figura 11: Análise da viabilidade celular com os extratos na linhagem HTR-8SV/neo

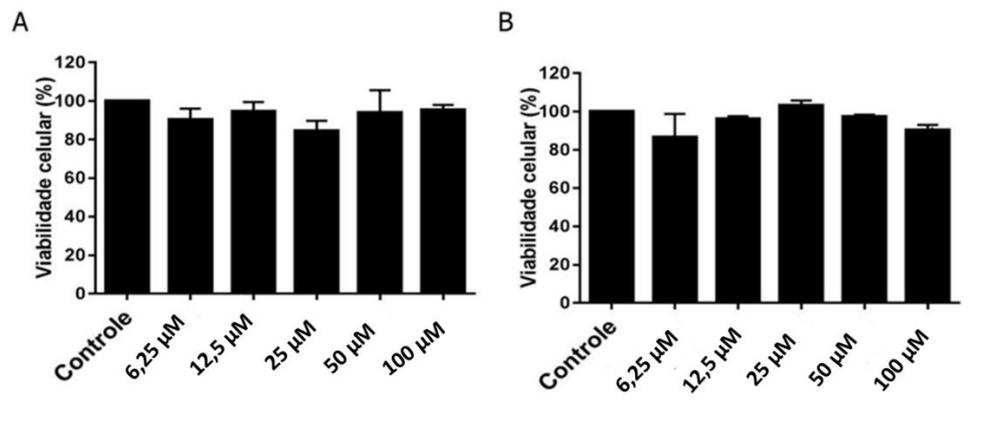


Legenda: Ensaio de viabilidade para as diferentes concentrações do extrato da folha de *Moringa oleifera* (A), extrato de fibra de *Cocos nucifera* (B), extrato da semente da *Passiflora edulis* (C), extrato da fruta da *S. terebinthifolius* Raddi (D) e extrato da casca da *S. terebinthifolius* Raddi (E) em explantes de vilosidades coriônicas. Teste de múltipla comparação ANOVA one-way com teste post-hoc de Dunnett, n=3 em triplicata. *p < 0.05; ****p < 0.0001 em relação ao controle.

Tendo como base os resultados dos ensaios de MTT, selecionou-se os extratos que não mostraram redução da viabilidade celular significativa para as células utilizadas, e nas concentrações que se mostraram seguras para avaliar se algum deles apresenta alguma atividade antiviral, os extratos da semente da *Passiflora edulis*, da fruta da *S. terebinthifolius* Raddi (D) e extrato da casca da *S. terebinthifolius* Raddi. A cloroquina foi usada como controle positivo visto sua comprovada capacidade anti-ZIKV *in vitro* (Delvecchio et al., 2016; Li et al., 2017; Shiryayev et al., 2017), e primeiramente avaliou-se se a mesma modificaria a viabilidade dos

explantes de vilosidades coriônicas a na linhagem HTR-8SV/neo. Como é possível observar, não houve alteração da viabilidade dos explantes e da linhagem (Fig. 12).

Figura 12. Análise da viabilidade celular com cloroquina em células trofoblásticas

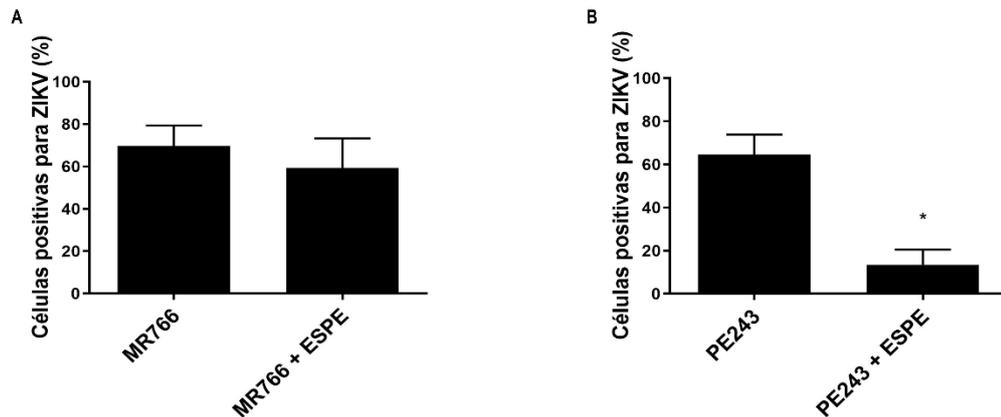


Legenda: Ensaio de viabilidade para as diferentes concentrações de cloroquina em explantes de vilosidades coriônicas (A) e em células HTR-8SV/neo (B). Teste de múltipla comparação ANOVA one-way com teste post-hoc de Dunnett, n=3 em triplicata.

5.2 Ensaio para avaliar a efetividade dos extratos diante a infecção do ZIKV por citometria de fluxo.

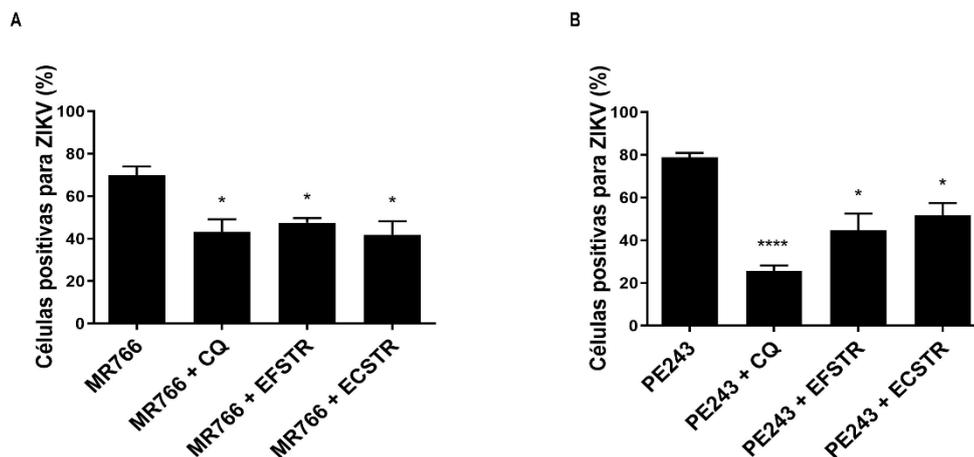
Os testes para avaliar a atividade antiviral foram realizados com os extratos da semente da *Passiflora edulis* (100 µg/mL), da casca da *S. terebinthifolius* Raddi (10 µg/ml), e da fruta da *S. terebinthifolius* Raddi (100 µg/ml). Na análise por citometria de fluxo observou-se que o extrato da semente da *Passiflora edulis* conseguiu reduzir a porcentagem de células positivas para ZIKV somente quando a cepa PE243 foi usada (Fig. 13). Para os extratos da fruta e casca da *S. terebinthifolius* Raddi, observou-se que nas duas cepas utilizadas, os extratos foram efetivos na redução de células positivas para ZIKV (Fig. 14).

Figura 13. Análise da expressão de ZIKV NS1 em células trofoblásticas tratadas com o extrato da semente da *Passiflora edulis*.



Legenda: Análise da expressão de ZIKV NS1 por citometria de fluxo na linhagem HTR-8SV/neo infectadas com a cepa MR766 (A) ou PE243 (B) e tratadas com o extrato da semente da *Passiflora edulis* (ESPE). Teste t com pós-teste Mann-Whitney, n=3. *p = 0.0238.

Figura 14. Análise da expressão de ZIKV NS1 em células trofoblásticas tratadas com o extrato da fruta e casca da *S. terebinthifolius* Raddi.



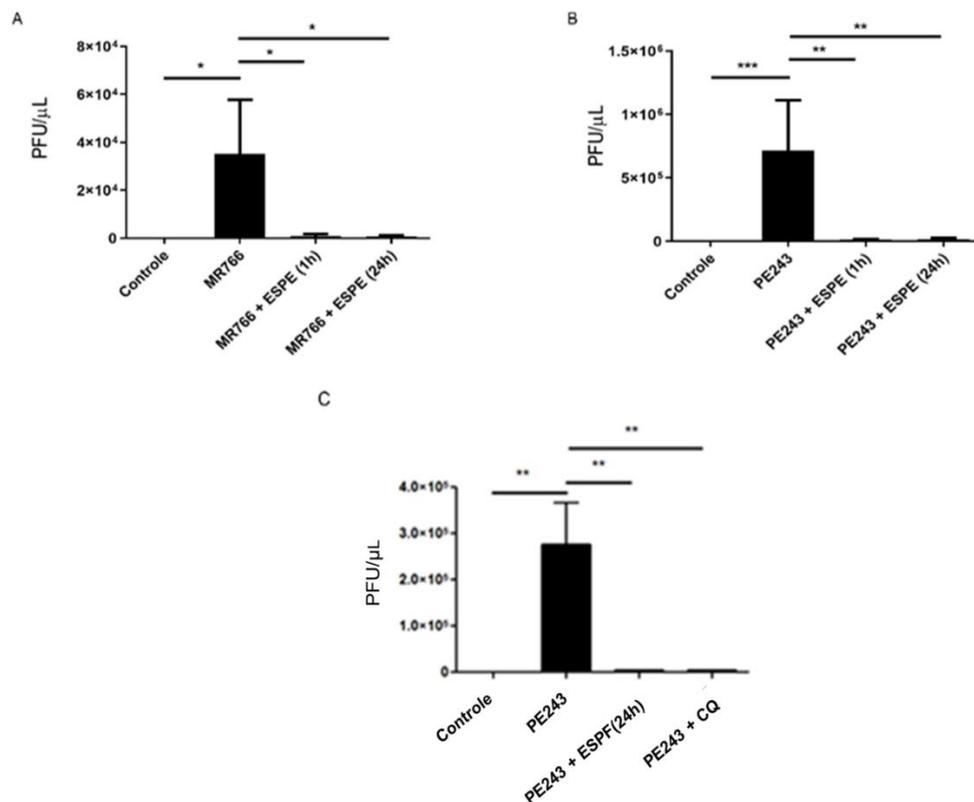
Legenda: Análise da expressão de ZIKV NS1 por citometria de fluxo na linhagem HTR-8SV/neo infectadas com a cepa MR766 (A) ou PE243 (B) e tratadas com cloroquina (CQ), extrato da fruta da *S. terebinthifolius* Raddi (EFSTR) e da casca da *S. terebinthifolius* Raddi (ECSTR). Teste de múltipla comparação ANOVA one-way com teste post-hoc de Dunnett, n=6. *p < 0.05; ****p < 0.0001 em relação a MR766 ou PE243.

5.3 Ensaio para avaliar a efetividade dos extratos diante a infecção do ZIKV por qRT-PCR

A técnica de o qRT-PCR foi utilizada para avaliar o efeito antiviral dos extratos na carga viral presente no sobrenadante das culturas, o que indica que o vírus foi capaz de se replicar e liberar novas partículas virais no sobrenadante. A figura 15, mostra que o extrato da semente do maracujá reduziu amplamente a carga viral no sobrenadante das células HTR-8SV/neo

infectadas com a cepa MR766 ou PE244. O mesmo padrão também foi observado para a cepa PE243 em explantes de vilosidades coriônicas.

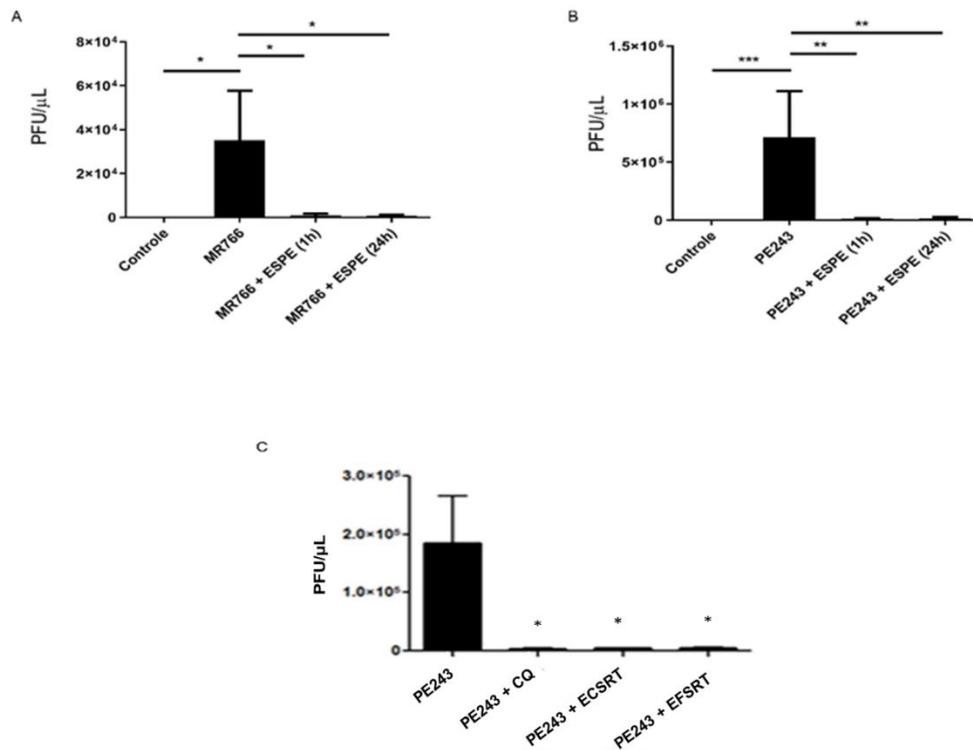
Figura 15. Análise da expressão de RNA no sobrenadante de células trofoblásticas tratadas com o extrato da semente da *Passiflora edulis*.



Legenda: Ensaio de qRT-PCR com células trofoblásticas HTR-8SV/neo infectadas com a cepa MR766 (A) ou PE243 (B) e tratadas com extrato da semente da *Passiflora edulis* (ESPE) por 1 ou 24 h. (C) Explantes de vilosidades coriônicas infectados com a cepa PE243 e tratados com cloroquina (CQ) ou ESPE por 24 h. Teste ANOVA one-way com teste post-hoc de Tukey, n=4. *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001.

Os extratos da fruta e casca da *S. terebinthifolius* Raddi também se mostraram eficientes na redução da carga viral, principalmente após a infecção, pela cepa PE243 na linhagem HTR-8SV/neo, mas também nos explantes de vilosidades coriônicas (Fig. 16).

Figura 16. Análise da expressão de RNA no sobrenadante de células trofoblásticas tratadas com o extrato da fruta e casca da *S. terebinthifolius* Raddi.

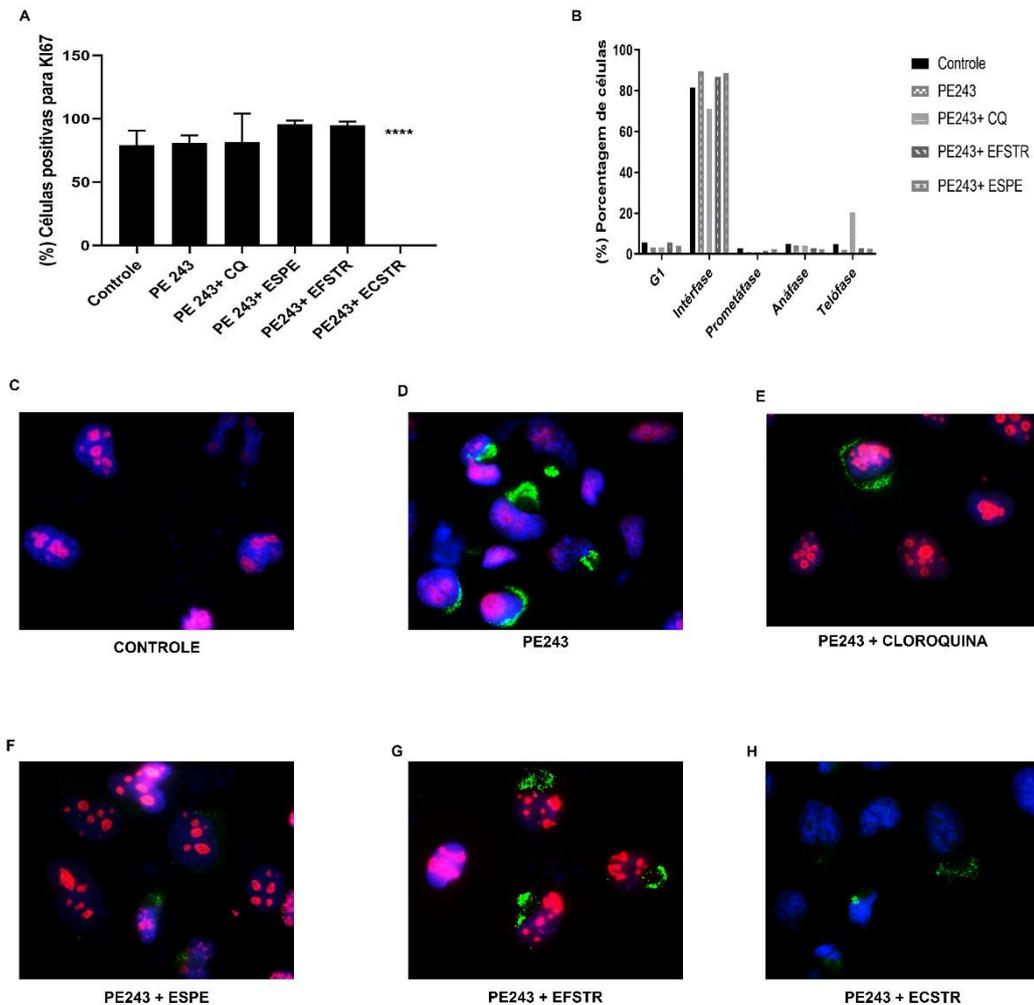


Legenda: Ensaio de qRT-PCR com células trofoblásticas HTR-8SV/neo infectadas com a cepa MR766 (A) ou PE243 (B) e tratadas com extrato da *S. terebinthifolius* Raddi (EFSTR) ou casca da *S. terebinthifolius* Raddi (ECSTR). (C) Explantes de vilosidades coriônicas infectados com a cepa PE243 e tratados com cloroquina (CQ), EFSTR ou ECSTR. Teste ANOVA one-way com teste post-hoc de Tukey, n=4. *p < 0.05; **p < 0.01.

5.4 Efeito dos extratos na proliferação e no ciclo celular das células

Buscamos avaliar se alguns dos extratos poderiam influenciar no ciclo celular das células diante da infecção do ZIKV. Para tal finalidade, foi realizada a quantificação do ensaio de imunofluorescência para Ki-67, um marcador de proliferação celular. Na figura 17, observou-se que a infecção pelo ZIKV não alterou a proliferação quando comparada com o controle, e os tratamentos com ESPE e o EFSTR também não alteraram a proliferação celular. Já com o tratamento com o ECSTR não foi observada marcação para Ki-67. Na análise das fases do ciclo celular (fig. 17), também se observou que nenhum dos tratamentos mostrou alteração significativa nas fases do ciclo celular.

Figura 17. Análise do ciclo celular em células trofoblásticas com os extratos diante da infecção com o ZIKV.



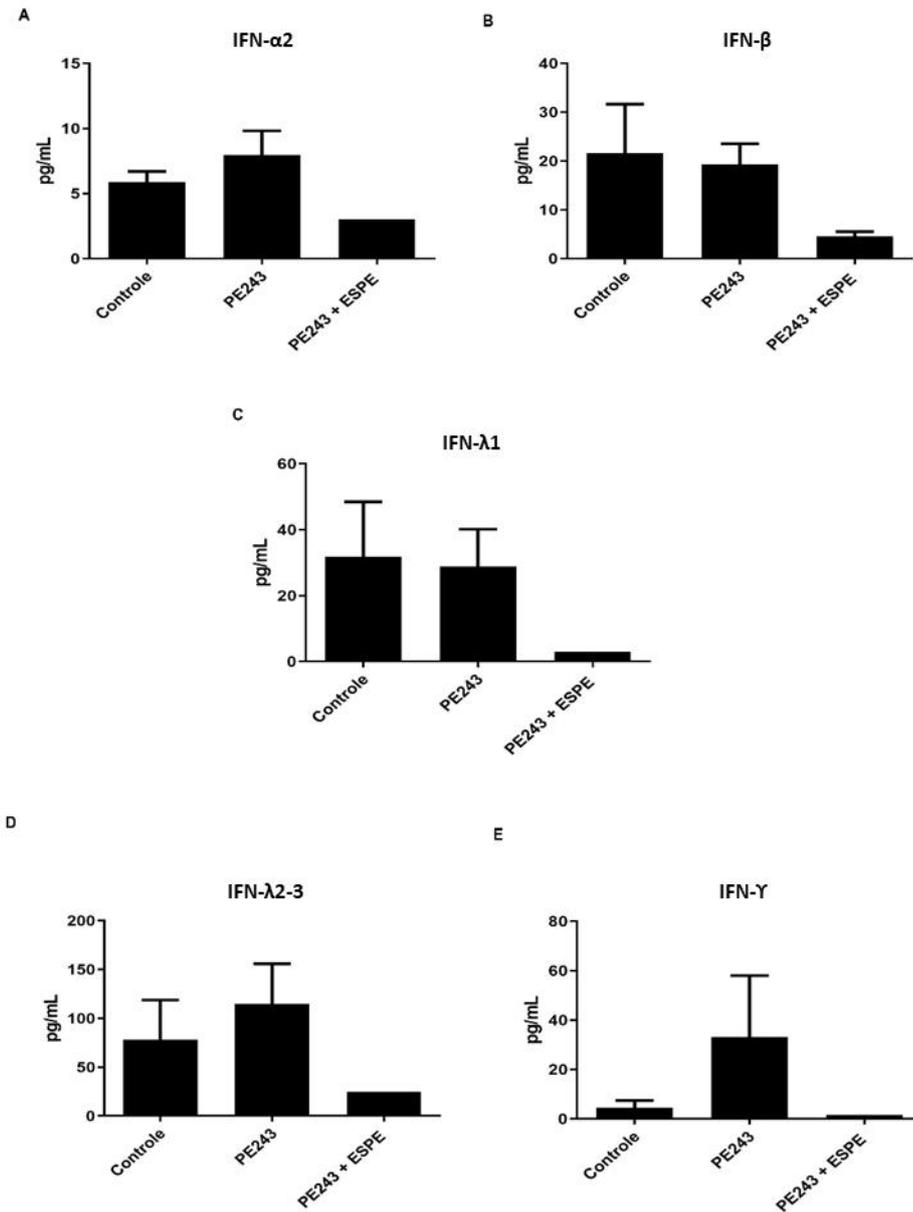
Legenda: Quantificação da taxa de proliferação celular (A) e das fases do ciclo celular (B) com a marcação por Ki-67 com a cepa PE243 e tratamento com cloroquina (CQ) ou os extratos da *Passiflora edulis* (ESPE), fruta da *S. terebinthifolius* Raddi (EFSTR) e casca da *S. terebinthifolius* Raddi (ECSTR) em células trofoblásticas HTR-8SV/neo. Teste ANOVA one-way com teste post-hoc de Tukey, n=3. ****p < 0.0001. (C-H) Imunolocalização de Ki-67 (vermelho) e ZIKV NS1 (verde) nos grupos controle (C), PE243 (D), CQ (E), ESPE (F), EFSTR (G) e ECSTR (H). DAP-I (azul) no núcleo, fotos obtidas na objetiva de x100.

5.5 Efeito na modulação de citocinas pelos extratos diante da infecção por ZIKV

5.5.1 Efeito na produção de Interferons (INF)

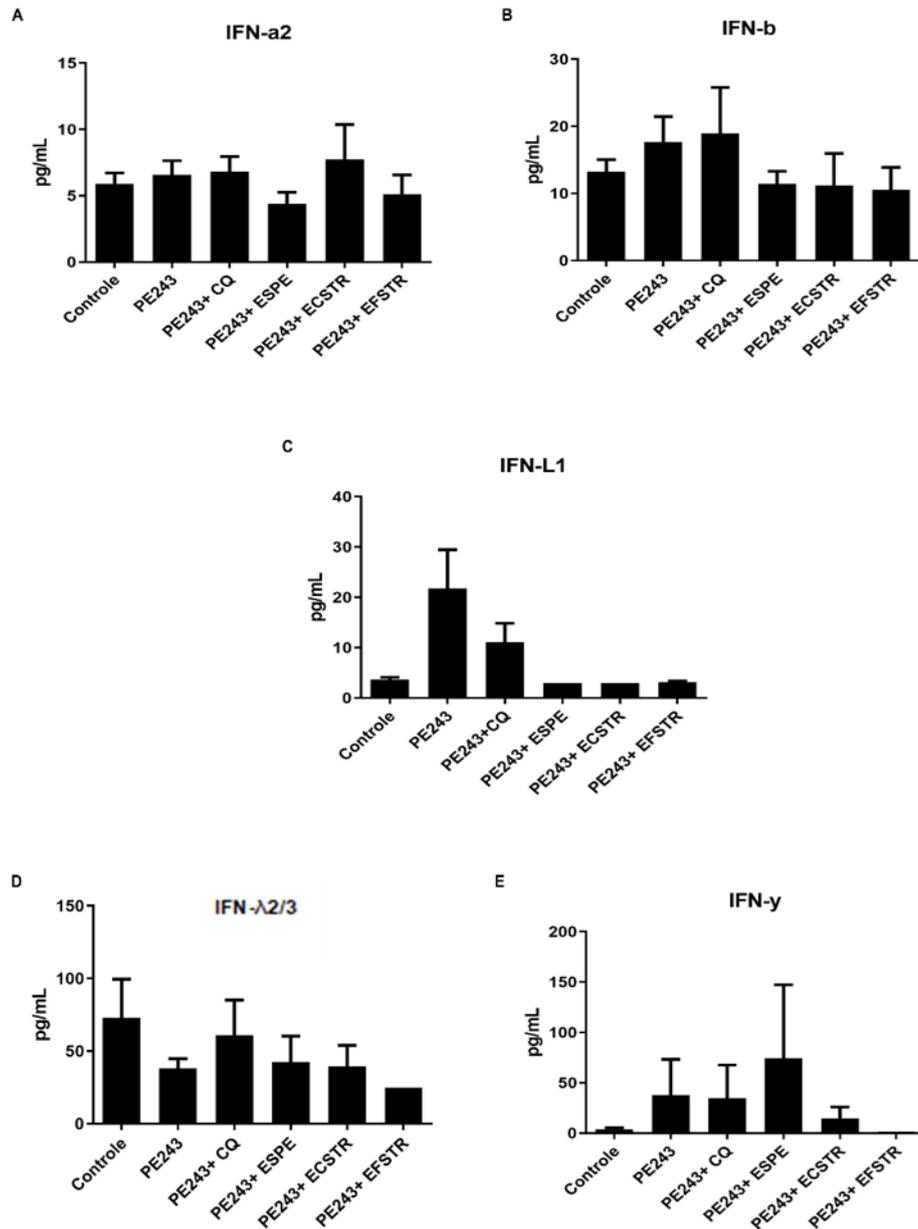
Diferentes interferons (IFN- α 2, IFN- β , IFN- γ , IFN- λ 1, IFN- λ 2/3) foram dosados nos sobrenadantes de explantes de vilosidades coriônicas após 24 h de infecção e tratadas com o extrato da semente da *Passiflora edulis*. A infecção com a cepa PE243 também não alterou significativamente a produção basal dos interferons dosados (fig. 17). Nas células HTR-8SV/neo nenhum dos tratamentos com os *Passiflora edulis* e *S. terebinthifolius* Raddi mostrou alterações significativas na produção dos interferons testados (fig. 18).

Figura 18. Análise da produção de INF pelo extrato da semente da *Passiflora edulis* diante da infecção por ZIKV em explante de vilosidade coriônica.



Legenda: Quantificação por citometria de fluxo de IFN- α 2 (A), IFN- β (B), IFN- λ 1 (C), IFN- λ 2/3 (D), IFN- γ (E) em sobrenadantes coletados de explantes de vilosidade coriônica com 24h de infecção pela cepa PE243 e tratadas com o extrato da *Passiflora edulis* (ESPE). n=8; p < 0,05, segundo análise do teste t pareado (Mann-Whitney Test).

Figura 19. Análise da produção de INF pelos extratos diante da infecção por ZIKV na linhagem HTR8-SV/neo.



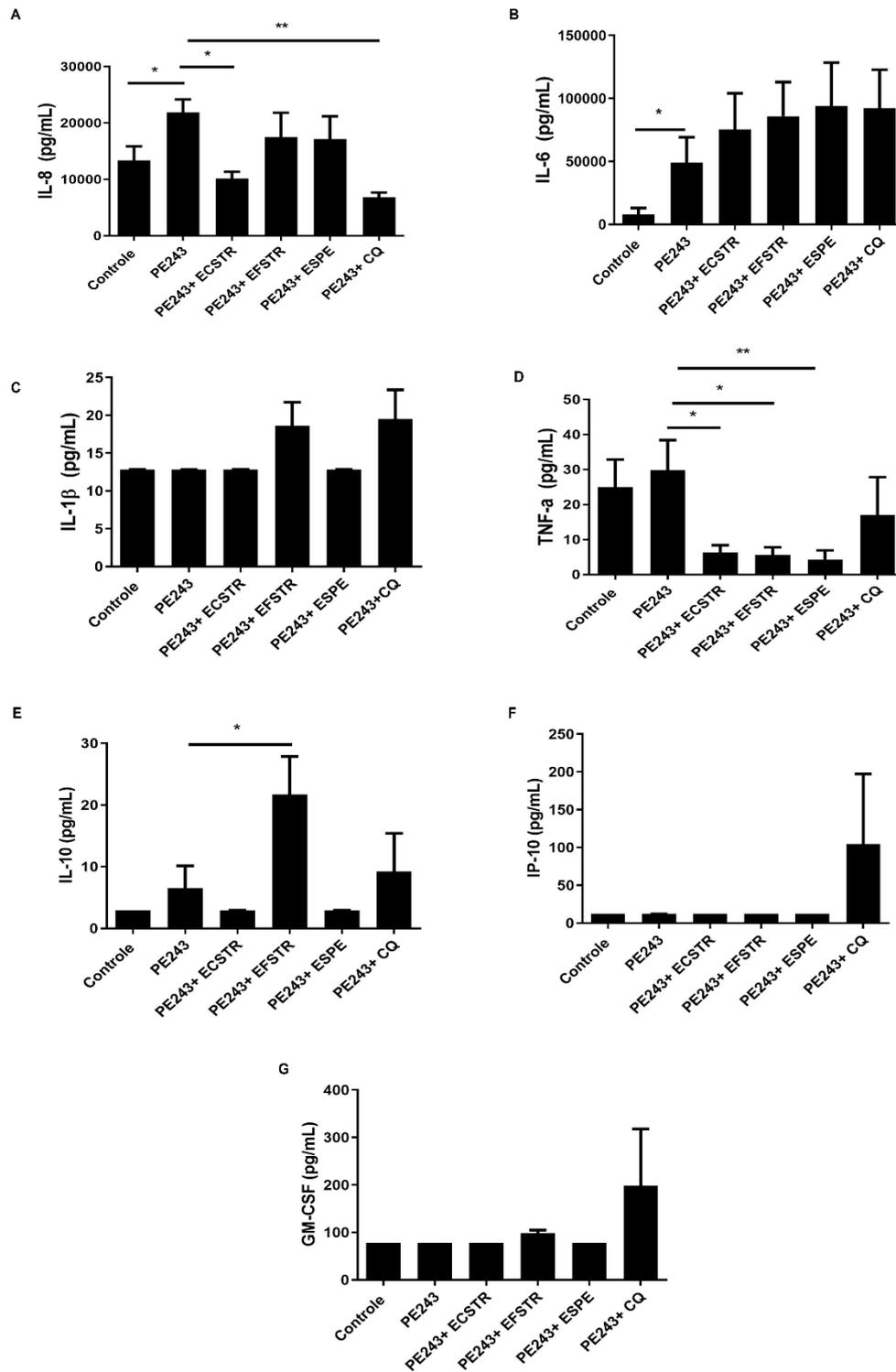
Legenda: Quantificação por citometria de fluxo de IFN- α 2 (A), IFN- β (B), IFN- λ 1 (C), IFN- λ 2/3 (D), IFN- γ (E), em sobrenadantes coletados de células HTR-8SV/neo com 24h de infecção pela cepa PE243 e tratadas com os extratos da semente da *Passiflora edulis* (ESPE), fruta da *S. terebinthifolius* Raddi (EFSTR) e casca da *S. terebinthifolius* Raddi (ECSTR). n=8; p < 0,05. Teste de múltipla comparação ANOVA one-way com teste post-hoc de Dunnett

5.5.2 Efeito na produção de citocinas

Ao analisar a produção de citocinas nos explantes, por citometria de fluxo, não foram encontradas alterações das citocinas 1L-1 β , IP-10 e GM-CSF diante da infecção por ZIKV e relação ao controle e também nos tratamentos utilizados. A infecção induziu o aumento de IL-6 e IL-8, enquanto os tratamentos com o extrato da casca *S. terebinthifolius* Raddi e com a cloroquina conseguiram reduzir somente IL-8. Já em relação a IL-10, o extrato da fruta da *S.*

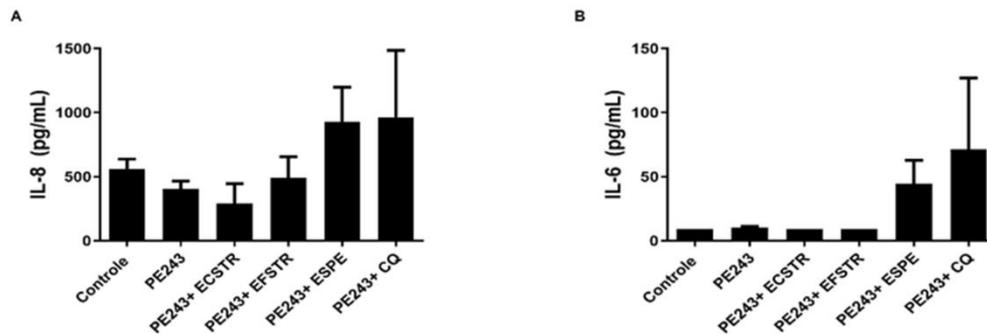
terebinthifolius Raddi induziu sua produção. A citocina TNF- α foi reduzida significativamente pelos três tratamentos (Fig.20). Já em relação as células HTR-8SV/neo, os tratamentos não mostraram alterações nas citocinas detectadas (Fig.21).

Figura 20: Avaliação da produção de citocinas inflamatórias em explantes de vilosidades coriônicas após infecção e tratamento com os extratos.



Legenda: Quantificação por citometria de fluxo de IL-8 (A), IL-6 (B), IL-1B, TNF- α (D), IL-10 (E), IP-10 (F) e GM-CSF (G) em sobrenadantes coletados de explantes de vilosidades coriônicas com 24h de infecção pela cepa PE243 e tratadas com os extratos da semente da *Passiflora edulis* (ESPE), fruta da *S. terebinthifolius* Raddi (EFSTR) e casca da *S. terebinthifolius* Raddi (ECSTR). A citocina IL-12p70 não foi detectada. N = 7; *p < 0,05, **p < 0,01. Teste de múltipla comparação ANOVA one-way com teste post-hoc de Dunnett.

Figura 21. Avaliação da produção de citocinas inflamatórias em células HTR-8SV/neo após infecção e tratamento com os extratos.



Legenda: Quantificação por citometria de fluxo de IL-8 (A), IL-6 (B), em sobrenadantes coletados de células HTR-8SV/neo com 24h de infecção pela cepa PE243 e tratadas com os extratos da semente da *Passiflora edulis* (ESPE), fruta da *S. terebinthifolius* Raddi (EFSTR) e casca da *S. terebinthifolius* Raddi (ECSTR). As citocinas IL-1B, IL-12p70, GM-CSF, TNF- α e IL-10 não foram detectadas. N = 7; *p < 0,05. Teste de múltipla comparação ANOVA one-way com teste post-hoc de Dunnett.

6 DISCUSSÃO

Nesse trabalho foi investigado o potencial antiviral contra o ZIKV dos extratos de produtos naturais *Passiflora edulis*, *Schinus terebinthifolius* Raddi, *Cocos lucífera* e da *Moringa oleífera* que são facilmente encontrados na região Nordeste do Brasil. Primeiro demonstrou-se o sucesso da infecção nos nossos modelos de estudos, na linhagem HTR-8/neo que representa as células trofoblásticas do primeiro trimestre gestacional, com as duas cepas PE243 (asiática) e MR766 (africana) e no explante de vilosidades coriônicas de placentas a termo, com a cepa PE243. Os extratos da semente da *Passiflora edulis*, fruta da *S. terebinthifolius* Raddi e casca da *S. terebinthifolius* Raddi não reduziram a viabilidade celular nos modelos estudados, por isso foram utilizados para as análises seguintes. Com o extrato *Passiflora edulis*, verificamos que após o tratamento, a expressão da proteína NS1 viral foi reduzida significativamente na infecção pela cepa PE234, o mesmo não ocorreu diante da cepa MR766. Os extratos da *S. terebinthifolius* Raddi conseguiu reduzir a proporção de células positivas para o ZIKV tanto pelas cepas PE234 e MR766. Na análise do sobrenadante das culturas, o extrato da *Passiflora edulis* foi efetivo na redução da carga viral das células HTR-8/SVneo para ambas as cepas, enquanto os extratos da *S. terebinthifolius* Raddi não reduziram a carga viral pela cepa MR766, mas conseguiram reduzir expressivamente a carga viral na infecção pela cepa PE234. Nas avaliações de proliferação e ciclo celular os extratos da semente da *Passiflora edulis* e da fruta da *S. terebinthifolius* Raddi não demonstraram nenhuma alteração em relação ao controle, já o extrato da casca pimenta rosa inibiu completamente a expressão de Ki-67, indicando ausência de proliferação. Em relação a expressão de citocinas, os extratos parecem interferir diferencialmente na modulação de IL-8, IL-10 e TNF- α das placentas infectadas.

O público alvo para tratamento contra infecção do ZIKV são as gestantes, justamente para se evitar os desfechos neurológicos negativos na prole, daí a importância de usar modelos de estudos que mimetizem as diferentes etapas gestacionais. Sabe-se que enquanto mais cedo o contato da gestante com a infecção do ZIKV pior é desfecho, da mesma forma que no terceiro trimestre gestacional as consequências para o feto tendem a ser menos graves ou até inexistentes (COYNE et al., 2016). Nesse trabalho não foi possível infectar o explante de vilosidade coriônicas de placenta a termo com a cepa de origem africana, a infecção foi possível apenas com a cepa de origem asiática. A vilosidade coriônica possui uma arquitetura de células e funcionalidade imunológica importante o que faz dessa estrutura da placenta uma parte fundamental na defesa do feto contra diversas infecções (MILLER et al., 2005). Em outro

trabalho foi possível observar também a resistência na infecção pelo ZIKV em vilosidades coriônicas de final gestacional, explicado possivelmente pela produção de IFN tipo III pelo sinciciotrofoblasto (BAYER et al., 2016). Como também já mostram a suscetibilidade das vilosidades coriônicas de primeiro trimestre de gestação para a cepa africana (TABATA et al., 2016; WEISBLUM et al., 2017).

Até hoje, as evidências epidemiológicas associam a linhagem asiática (PE243) responsável pela epidemia nas Américas e por sequelas graves em neonatos, enquanto a linhagem africana (MR766) não foi relacionada a nenhuma epidemia ou a desfechos graves (FARIA et al., 2017; FAYE et al., 2014). Curiosamente, vários testes *in vitro* e *in vivo* tem demonstrando uma maior virulência para a cepa Africana com maiores taxas de replicação e taxas de morte celular (SIMONIN et al., 2016; SHERIDAN et al., 2017), e também resultaram em maior viremia e fatalidade em camundongos prenhes (LAZER et al., 2016; KULESH et al., 2018). Essas divergências mostram que muito se precisa ser investigado para entender os mecanismos de infecção e genéticos que levam a resultados diferentes nas cepas do ZIKV.

Nos extratos testados, alguns reduziram muito a viabilidade das células e em várias concentrações, o que foi motivo de exclusão do material vegetal, sendo o caso dos extratos da *Moringa oleífera* e *Cocos lucífera*. Ainda ocorreu pequena redução de viabilidade na concentração de 100 µg/mL do extrato da casca de *S. terebinthifolius* Raddi. Em tratamento *in vivo*, esse extrato já foi demonstrado por apresentar toxicidade moderada após tratamento agudo e crônico por gavagem em camundongos machos em 83 dias de tratamento com dosagem de 17 mg/kg, com malformações ósseas em filhotes de fêmeas tratadas (CARLINI; DUARTE-ALMEIDA; TABACH; 2013). Já na avaliação da genotoxicidade, foi observado que frações enriquecidas com flavonóides isolados da casca do caule induziram danos ao DNA em plasmídeos (VARELA-BARCA; AGNEZ-LIMA; MEDEIROS; 2007). Em contrapartida, o teste de toxicidade aguda e subaguda em ratos, por administração via oral do extrato da casca, por 45 dias e com doses de 0,625 a 5g/kg não foi observado nenhum efeito tóxico (LIMA et al., 2009). E na avaliação de efeito anti-histaminico do extrato da casca do caule, por Nunes-Neto e colaboradores (2017) também não foi observada nenhum tipo de toxicidade nos camundongos tratados. Desse modo, visto que todas as outras dosagens não apresentaram redução na viabilidade celular, mantivemos esse extrato no nosso estudo.

Interessantemente, não encontramos nenhum dado na literatura sobre toxicidade do extrato etanólico da semente da *Passiflora edulis*, mesmo embora essa seja uma fração pouco explorada (KAWAKAMI et al., 2021). Em estudo em humanos que consumiram uma bebida contendo 27,3 g de extrato da semente de *Passiflora edulis*, por 4 semanas, nenhum dos

participantes apresentaram alterações anormais em exames físicos, análises hematológicas, exames bioquímicos de sangue e urina (SETOGUCHI et al., 2018). Já as outras frações da *Passiflora edulis*, como as folhas, polpa, casca e óleo da semente já foram associados a diversas atividades biológicas importantes como efeito antibiabético, antitrombótico, com propriedades sedativas, ansiolíticas e antiinflamatórias e sem nenhum sinal de toxicidade em vários modelos (SALLES et al., 2020; APPEL et al. 2010; KANG et al., 2015). Na administração do extrato de folhas de *Passiflora edulis* em ratos, não foi observado efeito hepatóxico ou nefrotóxico (DEVAKI et al., 2012). Estudos de toxicidade *in vivo* do extrato da casca da fruta e da folha da *Passiflora edulis* indicaram que a administração oral com doses de 150 a 550 mg/kg não tiveram efeito tóxico em ratos (ANURANGI; SHAMINA, 2018). Apesar de serem necessários mais estudos para verificar a toxicidade do uso da espécie *Passiflora edulis* em animais e humanos, esses resultados são importantes para futuros ensaios visando aplicação clínica.

A investigação de uma possível atividade antiviral, por citometria de fluxo, mostrou efetividade com o extrato da *Passiflora edulis* para a cepa PE243, e com os extratos da *S. terebinthifolius* Raddi para as duas cepas PE243 e MR766. Dados que sugerem uma possível ação dos extratos na ligação ou entrada do vírus na célula hospedeira, assim como a utilização de mecanismos diferentes usados pelas cepas para essa entrada do vírus na célula, visto que o tratamento com o extrato da *Passiflora edulis* não mostrou diferença do grupo infectado com a cepa MR766 quando comparado ao grupo controle. Corroborando com esse resultado, Cataneo (2019) e colaboradores também encontraram resultados diferentes entres as cepas asiática e a africana em testes antivirais. Como a cepa asiática PE243 é a cepa mais agressiva e com comprovada transmissão vertical, os nossos resultados são importantes no estabelecimento do extrato da semente de *Passiflora edulis* como potencial antiviral.

O resultado do ensaio de qRT-PCR que avaliou a presença da proteína NS1 viral no sobrenadante das culturas após 24h da infecção, mostrou um resultado positivo na redução da infecção viral pela *Passiflora edulis*, levantando a hipótese que de alguma forma o extrato impediu a formação e/ou a liberação das partículas virais no sobrenadante, para as duas cepas na linhagem HTR-8SV/neo e nas vilosidades coriônicas. O mesmo foi observado com os extratos da *S. terebinthifolius* Raddi, havendo uma grande redução da presença viral nos sobrenadantes as culturas e reforçando o efeito antiviral dos compostos.

Desde o surgimento das epidemias do ZIKV nas Américas, muitos compostos e extratos naturais vem sendo testados contra esse vírus, a exemplo da curcumina, um pigmento amarelo encontrado na cúrcuma e já demonstrou ser capaz de inibir o ZIKV em uma linhagem de câncer cervical (MOUNCE et al., 2017). Apesar de se mostrar segura, a curcumina apresenta

dificuldades devido a sua baixa disponibilidade e baixa solubilidade (EPSTEIN; SANDERSON; MACDONALD; 2010). O galato de epigalocatequina (EGCG) um flavonóide também eficaz contra o ZIKV *in vitro*, porém com alta taxa de toxicidade em algumas linhagens, não se mostrando totalmente seguro (GOH; MOK; CHU; 2020). Outro composto amplamente estudado é a pinocembrina, com diversas atividades biológicas relatadas, e sua atividade viral contra o ZIKV foi eficiente na linhagem placentária humana JEG-3 *in vitro*, com uma redução de $2,2 \log^{10}$ na sua titulação viral com a concentração de uso de 40 $\mu\text{g/ml}$ (LEE et al. 2019). O extrato de *Psiloxylon mauritianum* foi efetivo contra o ZIKV em células de rim de macacos, apresentou redução de 75% das partículas virais na concentração de 100 $\mu\text{g/ml}$ (CLAIN et al, 2019). Comparando com os nossos resultados, principalmente com os extratos de *Passiflora edulis*, por ainda não ter apresentado nenhum tipo de toxicidade e uma redução significativa tanto das proteínas virais, como da carga de RNA viral, e por já ter sido avaliado em células e tecidos placentários, se mostra muito promissor e com algumas vantagens para avançar em etapas subsequentes.

Pensando nas possíveis substâncias que possam ser responsáveis pelo efeito antiviral observados nos ensaios com o extrato da *Passiflora edulis*, destacamos o piacetanol, que além de ser encontrado em grande quantidade no extrato (XAVIER et al., 2022), apresenta estudos *in vitro* que mostram que essa substância isolada conseguiu suprimir a infecção pelo citomegalovírus humano (WANG et al., 2020). Outro composto interessante que também já demonstrou atividade antiviral foi a Naringenina, *in vitro* e *in vivo*, e apresentou inibição dose-dependente da produção de partículas virais de HCV (vírus da hepatite C) (GOLDWASSER et al., 2011; NAHMIA et al., 2008); e em células Vero foi eficiente contra infecção por CHIKV e DENV-2 (ZANDI et al., 2011; AHMADI et al., 2016). Adicionalmente, foi eficiente na inibição da replicação viral do ZIKV em células epiteliais de adenocarcinoma humano pela Naringenina (4, 5, 7-trihidroxifavanona) com redução de 4 vezes da infecção (CATANEO et al., 2019).

E relação aos compostos que podem estar promovendo esse efeito antiviral nos extratos da *S. terebinthifolius* Raddi, dentro dos compostos fenólicos identificados, ambos apresentando em comum os compostos: ácido gálico, ácido p-cumárico, catequina, epicatequina e resveratrol, com concentrações menores para o extrato da fruta (ROCHA et al., 2019), e também já foi descrita a presença de naringenina (BERNARDES et al. 2014). Curiosamente, a atividade antiviral já foi descrita em todos esses compostos com diferentes tipos virais (ÖZCELIK et al., 2010; LEE et al., 2016; MUSARRA-PIZZO et al., 2019; FERREIRA et al., 2018; PEI et al.,

2015), com ênfase para a naringenina e o resveratrol (MOHD et al., 2019; CATANEO et al., 2019).

Na avaliação do ciclo e proliferação celular, nossos resultados mostraram que a infecção da cepa PE243 na linhagem HTR-8/neo manteve-se nas mesmas configurações do controle. Tabata e colaboradores (2018) mostraram também que não houve alteração no padrão de proliferação diante da infecção pelo ZIKV em células do citotrofoblasto viloso e células de Hofbauer de explantes de vilosidades coriônicas. Com relação ao efeito inibitório de proliferação visto com o extrato da casca da *S. terebinthifolius* Raddi, há estudos que mostram atividade anticancerígena dessa espécie *in vitro*, mais especificamente na avaliação do óleo da fruta em células contra a linhagem tumoral da mama (BENDAOU et al., 2010). Outra atividade relacionada ao extrato metanólico da folha da *S. terebinthifolius* Raddi, mostra atividade quimiopreventiva com atuação de reparação a danos no DNA *in vitro* e *in vivo* (FEDEL-MIYASATO et al., 2014), nenhuma delas com mecanismos de ação esclarecidos. Dessa maneira se faz necessário mais estudos para identificar como ocorre esse efeito antiproliferativo da casca da fruta da *S. terebinthifolius* Raddi encontrada em nossos resultados, ficando claro que esse extrato teria uso limitado em gestantes, mas pode apresentar esse efeito de forma mais interessante em outros tipos celulares, como leucócitos infectados por vírus ou células cancerígenas.

Com relação a resposta imunológica placentária diante da infecção por ZIKV e comportamento diante dos tratamentos, observou-se que não ocorreu interferência na secreção de IFN- α 2, IFN- β , IFN- λ 1, IFN- λ 2/3, IFN- γ , ou seja, não ocorreu um aumento da ação antiviral mediada por interferons, sendo possível mecanismos de ação na entrada ou replicação dos vírus. Na placenta, especificamente, o interferon III produzido pelo sinciciotrofoblasto aparece em um papel importante na proteção contra a infecção por ZIKV (BAYER et al., 2016). Sendo assim, os flavívirus procuram evitar essa defesa do sistema imunológico, empregando vários mecanismos virais para antagonizar a indução dos interferons, como a inibição de IRF-3, IRF-7, IRF-9, STAT-2 e STAT-1 (NGONO; SHRESTA, 2018), o que justificaria nossos resultados onde os interferons não aumentam em resposta a infecção.

Quanto a outras citocinas, nossos modelos mostraram aumento de IL-8 e IL-6 em modelos de infecção de explantes de vilosidades coriônicas. Em outros estudos com explantes placentários mostrou-se o aumento da expressão de IL-1 β , IL-6 e TNF- α (RIBEIRO et al., 2018). Já a infecção da cepa asiática na linhagem HTR-8SV/neo mostrou o aumento IL-6, IL-8 e TNF- α (LUO et al., 2018), o que difere dos nossos resultados que não mostraram diferenças nas linhagens. A infecção do ZIKV tende a induzir uma resposta inflamatória do hospedeiro

com a indução de IL4, IL1, IL6, CCL5, IL8, CXCL10, CXCL1 (GARCIA et al., 2017), daí a importância de um tratamento que possa ajudar a combater essa resposta, visto que uma inflamação exacerbada pode ser prejudicial ao desenvolvimento placentário e conseqüentemente ao feto (GINSBERG et al., 2017; FOO et al., 2018). Nesse contexto, a atividade antiinflamatória dos tratamentos usados foi vista com a redução de IL-8 e TNF- α e aumento de IL-10 pelos extratos, particularmente a inibição e TNF- α sendo realizada por todos. A atividade antiinflamatória da espécie *Passiflora edulis* de algumas frações já foi demonstrada (MONTANHER et al., 2006; ZUCOLOTTO et al., 2009; GUNATHILAKE et al., 2018). Na fração testada aqui, um dos principais componentes é o piceatanol, um flavanoide análogo do resveratrol, que tem sua atividade anti-inflamatória bem descrita (YAMAMOTO et al., 2016). Tang (2017) e colaboradores mostraram que *in vitro* o piceatanol atenuou a produção de TNF- α , IL-6, óxido nítrico, prostaglandina E2 e ciclooxigenase-2 em modelo de osteoartrite. Assim, acreditamos que os nossos resultados possam estar relacionados com o potencial dessa molécula. Sobre os extratos da *S. terebinthifolius* Raddi, a porção da fruta mostrou uma interessante atividade, *in vitro*, anti-inflamatória e antioxidante (FERIANI et al., 2020). E no óleo da fruta foi observada atividade anti-inflamatória (FORMAGIO et al., 2011), o que também encontramos em nosso modelo.

Diante da importância da gravidade que a infecção pelo ZIKV pode levar aos bebês com a síndrome congênita do Zika, e em adultos com a síndrome de Guillain-Barré, a busca por tratamentos são de grande importância para o mundo. Mesmo com esse cenário, ainda estamos distantes de um tratamento efetivo, por isso a investigação em produtos naturais pode ajudar na busca por tratamento contra essa infecção e aumentando o leque de opções, por serem potenciais reservatórios de compostos interessantes (KATZ et al., 2016; NEWMAN et al., 2012). De tal forma, acreditamos que os extratos aqui explorados possuem potencial para se tornarem úteis contra a infecção do ZIKV, em especial o extrato da *Passiflora edulis*. Contudo, ainda precisamos entender os mecanismos de ação dos extratos, quais compostos estão relacionados com os efeitos benéficos e ampliar os experimentos afim de descobrir novos efeitos relacionados aos mesmos.

7 CONCLUSÃO

Diante dos nossos resultados, podemos concluir que:

- A cepa MR766 não foi capaz de infectar a cultura de explantes placentários nas condições experimentais utilizadas.

- Os extratos avaliados contra a infecção do ZIKV, *Passiflora edulis* e *S. terebinthifolius* Raddi, se mostraram efetivos na redução da infecção por ZIKV em células trofoblásticas humanas e em explantes de vilosidades coriônicas.

- Os extratos avaliados apresentaram boa tolerância, com efeitos anti-inflamatórios e potencialmente antivirais, mas não por aumento de interferons.

- O extrato da semente da *Passiflora edulis*, se mostra mais promissor para o desenvolvimento de uma terapia contra o ZIKV.

REFERÊNCIAS

- ACHIKA, J.I. et al. Flavonoids with antibacterial and antioxidant potentials from the stem bark of *Uapaca heudelotti*. *Heliyon*, p.381-384, 2020.
- ADAMS, W. K.M. et al. Fetal brain lesions after subcutaneous inoculation of Zika virus in a pregnant nonhuman primate. *Nat Med*, v.22, p.1256–1259, 2016.
- ADIBI, J.J. et al. Teratogenic effects of the Zika virus and the role of the placenta. *Lancet*, v.387, p.1587–1590, 2016.
- AHMADI, A. et al. Inhibition of chikungunya virus replication by hesperetin and naringenin. *RSC Advances*, v.67, p. 69421–69430, 2016.
- ALBUQUERQUE, O.M.L. et al. The anti-Zika virus and anti-tumoral activity of the citrus flavanone lipophilic naringenin-based compounds. *Chem Biol Interact*, v.16, p.331-333, 2020.
- ALDO, P. et al. HSV-2 enhances ZIKV infection of the placenta and induces apoptosis in firsttrimester trophoblast cells. *Am J Reprod Immunol*, v.76, p.1–10, 2016.
- ALIOTA, M.T. et al. Characterization of lethal Zika virus infection in AG129 mice. *PLoS Negl Trop*, v.10, p.46-82, 2016.
- AMERICAN COLLEGE OF OBSTETRICIANS AND GYNECOLOGISTS. Practice bulletin no. 151: Cytomegalovirus, parvovirus B19, varicella zoster, and toxoplasmosis in pregnancy. *Obstet Gynecol* 125:1510–1525.
- ANURANGI, C. R., SHAMINA S. Preliminary phytochemical screening and acute & subacute toxicity study on different concentrations of unripen fruit peel flour of *Passiflora edulis* in male albino rats. *World J. Pharm. Pharmaceut*, v.7, p.828–834, 2018.
- BAGHERI, G. et al. Phytochemical screening of *Moringa oleifera* leaf extracts and their antimicrobial activities. *Cell Mol Biol*. v. 66, p. 20-26, 2020.
- BAHRAMI, A., MAJEED M., SAHEBKAR A. Curcumin: a potent agent to reverse epithelial-to-mesenchymal transition. *Cell. Oncol*. v. 42, p.405–421, 2019.
- BAILEY, H. et al. HIV treatment in pregnancy. *Lancet HIV*, v.58, p.457-467, 2018.
- BALM, M.N. et al. A diagnostic polymerase chain reaction assay for Zika virus. *J Med Virol*, v.84, p.1501-5, 2012.
- BARROWS, N.J. et al. A Screen of FDA-Approved Drugs for Inhibitors of Zika Virus Infection. *Cell Host Microbe*, v.10, p. 259-70, 2016.
- BAURAKIADE, S. E. et al. Histomorphometric and immunohistochemical analysis of infectious agents, T-cell subpopulations and inflammatory adhesion molecules in placentas from HIV-seropositive pregnant women. *Diagn Pathol*, v. 39, p. 106-118, 2011.
- BAYER, A. et al. Type III interferons produced by human placental trophoblasts confer protection against Zika virus infection. *Cell Host Microbe.*, v.19, p.705–12, 2016.

BAYLESS N.L. et al. Zika Virus Infection Induces Cranial Neural Crest Cells to Produce Cytokines at Levels Detrimental for Neurogenesis. *Cell Host Microb.*, v. 20, p. 423-428, 2016.

BENDAOU, H. et al. Chemical composition and anticancer and antioxidant activities of *Schinus molle* L. and *Schinus terebinthifolius* Raddi berries essential oils. *J Food Sci.*, v.75, p.466-72, 2010.

BENIRSCHKE, k., BURTON, G. J., BAERGEN, R. N. *Pathology of the Human Placenta* 2012. 6^o edição. Springer Berlin Heidelberg, 2012.

BERNACCI, et al. *Passiflora edulis* Sims: the correct taxonomic way to cite the yellow passion fruit (and of others colors). *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 30, p. 566-576, 2008.

BERNARDES, N. R. et al. Nitric oxide production, inhibitory, antioxidante and antimycobacterial activities of the fruits extract and flavonoid content of *Schinus terebinthifolius*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.24, p. 644–650, 2014.

BERNATCHEZ, J.A. et al. Drugs for the Treatment of Zika Virus Infection. *J Med Chem*, v.63, p.470-489, 2020.

BESNARD, M. et al. Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. *Eurosurveillance*, v.19, p.8–11, 2014.

BOWEN, J. R. et al. Zika virus antagonizes type I interferon responses during infection of BRANDÃO M.G.L. et al. Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian official pharmacopeia. *Rev. Bras*, v.16, p.408–420, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico. Monitoramento integrado de alterações no crescimento e desenvolvimento relacionadas à infecção pelo vírus Zika e outras etiologias infecciosas, até a Semana Epidemiológica 52 de 2017. Vol. 50. ISSN 2358-9450. 2018b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica. Vol 49. ISSN 2358-9450. 2018a.

BUCKLEY, A., Gould E. A. Detection of virus-specific antigen in the nuclei or nucleoli of cells infected with Zika or Langkat virus. *J Gen Virol*, v. 69, p.1913-20, 1988.

BURTON, G. J., JAUNIAUX E., WATSON A. L. Maternal arterial connections to the placental intervillous space during the first trimester of human pregnancy: the Boyd collection revisited. *Am. J. Obstet. Gynecol*, v. 181, p.718–724, 1999.

CALITZ, C. et al. Impact of traditional African medicine on drug metabolism and transport. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. v.107, p. 991-1003, 2014

CAO-LORMEAU, V.M. Zika virus, French polynesia, South pacific, 2013. *Emerg. Infect. Dis.* v. 20, p.1085–1086, 2014.

CARLINI E.A., DUARTE-ALMEIDA J.M., TABACH R. Assessment of the toxicity of the Brazilian pepper trees *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira-da-praia) and *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Aroeira-do-sertão). *Phytother Res.*v. 27, p.692-8, 2013.

- CARVALHO, N.S. et al. Zika virus infection during pregnancy and microcephaly occurrence: a review of literature and Brazilian data. *Braz J Infect Dis.* v.20, p.282–289, 2016.
- CATANEO, A. et al. The citrus flavonoid naringenin impairs the in vitro infection of human cells by Zika virus. *Scientific Reports*, v.9, p. 1–15, 2019.
- CATANEO, A.H.D. et al. The citrus flavonoid naringenin impairs the in vitro infection of human cells by Zika virus. *Sci Rep*, v.8, p.163-168, 2019.
- CHECK HAYDEN, E. Zika highlights role of controversial fetal-tissue research. *Nature.* v.7, p.532-538, 2016.
- CLAIN, E. et al. Extract from *Aphloia theiformis*, an edible indigenous plant from Reunion Island, impairs Zika virus attachment to the host cell surface. *Sci. Rep*, v.8, p.1–12, 2018.
- CLAIN, E. et al. The Polyphenol-Rich Extract from *Psiloxylon mauritianum*, an Endemic Medicinal Plant from Reunion Island, Inhibits the Early Stages of Dengue and Zika Virus Infection. *Int J Mol Sci.*, v.15, p.1860, 2019.
- COLE, E.R. et al. Chemical composition of essential oil from ripe fruit of *Schinus terebinthifolius* Raddi and evaluation of its activity against wild strains of hospital origin. *Braz J Microbiol*, v. 45(3), p.821-8, 2014.
- COTTREAU, J.M, BARR V.O. A Review of Antiviral and Antifungal Use and Safety during Pregnancy. *Pharmacotherapy*, v.36, p.668-78, 2016.
- COUNOTTE, M.J. et al. Sexual transmission of Zika virus and other flaviviruses: A living systematic review. *PLoS Med.* v.24, p.15-7, 2018.
- COYNE, C.B., LAZEAR H.M. Zika virus—reigniting the TORCH. *Nat Rev Microbiol.* v.14, p.707–715, 2016.
- CUGOLA, FR, et al. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. *Nature.* 2016;534(7606):267–271.
- DA SILVA, J.H.S. et al. Anti-*Escherichia coli* activity of extracts from *Schinus terebinthifolius* fruits and leaves. *Nat Prod Res.*, v. 32, p.1365-1368, 2018.
- DAVIS N.L., KING C.C., KOURTIS A.P. Cytomegalovirus infection in pregnancy. *Birth Defects Res.*, v.15, p. 336-346, 2017.
- DE LIMA G.L. Phenolic Compounds Present *Schinus terebinthifolius* Raddi Influence the Lowering of Blood Pressure in Rats. *Molecules.*, v. 23, p.1792, 2017.
- DE NORONHA, L. et al. Zika virus infection at different pregnancy stages: anatomopathological findings, target cells and viral persistence in placental tissues. *Front Microbiol.*, v.9, p.22-66, 2018.
- DE OLIVEIRA, V.S. et al. Effect of aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) fruit against polyunsaturated fatty acids and cholesterol thermo-oxidation in model systems containing sardine oil (*Sardinella brasiliensis*). *Food Res Int.*, v.132, p.109-91, 2020.

- DE SOUZA, A.A.A, et al. Inhibition of Brazilian ZIKV strain replication in primary human placental chorionic cells and cervical cells treated with nitazoxanide. *Braz J Infect Dis.*, v.24, p.505-516, 2020.
- DELORME-AXFORD E., SADOVSKY Y., COYNE C.B. The Placenta as a Barrier to Viral Infections. *Annu Rev Virol.* v. 141, p.133-46, 2014.
- DEVAKI, K. et al. Effect of Aqueous Extract of *Passiflora edulis* on Biochemical and Hematological Parameters of Wistar Albino Rats. *Toxicol Int.* v.19, p.63-7, 2012.
- DIALLO, D. et al. Zika virus emergence in mosquitoes in southeastern Senegal, 2011. *PLoSOne*, v. 9, p.109-114, 2014.
- DICK, G.W., COZINHA S.F., HADDOW A.J. Zika virus. I: isolations and serological specificity. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*, v.46, p. 509–20, 1952.
- DUDLEY, D.M. et al. A rhesus macaque model of Asian-lineage Zika virus infection. *Nature Communications.*, v.47, p.122-24, 2016.
- DUFFY, M.R. et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *The New England Journal of Medicine*, v. 360, p. 2536–43, 2009.
- EL COSTA, H. et al. ZIKA virus reveals broad tissue and cell tropism during the first trimester of pregnancy. *Sci Rep.*, v. 19, p.352-96, 2016.
- ENNIGROU, A. et al. Assessing the fatty acid, essential oil composition, their radical scavenging and antibacterial activities of *Schinus terebinthifolius* Raddi leaves and twigs. *J Food Sci Technol.*, v.55, p.1582-1590, 2018.
- EPSTEIN, J., SANDERSON I. R., MACDONALD T. T. Curcumin as a therapeutic agent: the evidence from in vitro, animal and human studies. *Br J Nutr.*, v. 103, p.1545-57, 2010.
- ESQUENAZI, D. et al. Antimicrobial and antiviral activities of polyphenolics from *Cocos nucifera* Linn. (Palmae) husk fiber extract. *Research in Microbiology.* v. 153, p. 647-652, 2002.
- ESQUIVEL, M. et al. Vertical transmission and placental pathology of twin pregnancies from Zika virus infected mothers. *Am J Obstet Gynecol.*, v. 218, p.520, 2018.
- EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. Rapid risk assessment: Zika virus infection outbreak, French Polynesia: 14 february 2014
- FARIA, N.R. et al. Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. *Science.*, v.352, p.345–349, 2016.
- FARIA, N.R., QUICK J., CLARO I.M., et al. Estabelecimento e transmissão críptica do vírus Zika no Brasil e nas Américas. *Natureza.*, v.546, p.406–410, 2017.
- FAYE, O. et al. Evolução molecular do vírus Zika durante seu surgimento no século XX. *PLoS Negl Trop Dis.* v.38, p.26-36, 2014.
- FEDEL-MIYASATO L. E. et al. Antigenotoxic and antimutagenic effects of *Schinus terebinthifolius* Raddi in *Allium cepa* and Swiss mice: a comparative study. *Genet Mol Res.* v. 30, p. 3411-25, 2014.

- FERIANI, A, et al. Multidirectional insights on polysaccharides from *Schinus terebinthifolius* and *Schinus molle* fruits: Physicochemical and functional profiles, in vitro antioxidant, anti-genotoxicity, antidiabetic, and antihemolytic capacities, and in vivo anti-inflammatory and anti-nociceptive properties. *Int J Biol Macromol.*, v.15, p.2576-2587, 2020.
- FERNANDES, N.C. et al. Experimental Zika virus infection induces spinal cord injury and encephalitis in newborn Swiss mice. *Exp Toxicol Pathol.*, v. 69, p.63-71, 2017.
- FERREIRA, P.G. Detection of the antiviral activity of epicatechin isolated from *Salacia crassifolia* (Celastraceae) against Mayaro virus based on protein C homology modelling and virtual screening. *Arch. Virol.*, v.163, p.1567–1576, 2019.
- FOO, S. et al. Biomarkers and immunoprofiles associated with fetal abnormalities of ZIKVpositive pregnancies. *JCI insight*, v. 3, n. 21, 2018.
- FORMAGIO, A. S. N. et al. Chemical composition and anti-inflammatory activity of the essential oil of *Schinus terebinthifolius* Raddi (anacardiaceae) fruits. *Lat Am J Pharm.*, v.30, p.1555–9, 2011.
- FOROUZANFAR, F. et al. Neuroprotective effects of curcumin through autophagy modulation. *IUBMB Life.*, v.72, p.652-664, 2020.
- FRABASILE, S. et al. The citrus flavanone naringenin impairs dengue virus replication in human cells. *Sci. Rep.*, v. 37, p. 41-47, 2017.
- FRERIKSEN, J.J.M. et al. Review article: direct-acting antivirals for the treatment of HCV during pregnancy and lactation - implications for maternal dosing, foetal exposure, and safety for mother and child. *Aliment Pharmacol Ther.*, v.50, p.738-750, 2019.
- GALANG, R.R. et al. Etiology of Microcephaly and Central Nervous System Defects during the Zika Epidemic in Colombia. *J Pediatr.*, v.222, p.112-119, 2020.
- GARCIA, M. et al. Skin innate immune response to flaviviral infection. *Eur Cytokine Netw.* v. 28, p.41-51, 2017.
- GBR, A.A. et al. Cardioprotective effect of pioglitazone and curcumin against diabetic cardiomyopathy in type 1 diabetes mellitus: impact on CaMKII/NF- κ B/TGF- β 1 and PPAR- γ signaling pathway. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.*, v.394, p.349-360, 2021.
- GINSBERG, Y. et al. Maternal inflammation, fetal brain implications and suggested neuroprotection: a summary of 10 years of research in animal models. *Rambam Maimonides medical journal*, v. 8, n. 2, 2017.
- GLÓRIA, L.L. et al. Phenolic compounds present in *Schinus terebinthifolius* raddi influence the lowering of blood pressure in rats. *Molecules*, v. 22, 10. 2019.
- GOH, V.S.L., MOK C.K., CHU J.J.H. Antiviral Natural Products for Arbovirus Infections. *Molecules.*, v.17, p. 2796, 2020.
- GOLDWASSER, J. et al. Naringenin inhibits the assembly and long-term production of infectious hepatitis C virus particles through a PPAR-mediated mechanism. *Journal of Hepatology*, v.55, p. 963–971, 2019.

- GORNET, M.E., BRACERO N.J., SEGARS J.H. Zika Virus in Semen: What We Know and What We Need to Know. *Semin Reprod Med.*, v.34, p.285-292, 2016.
- GOVERO, J. et al. Zika virus infection damages the testes in mice. *Nature*. v.540, p.438-442, 2016.
- GRANT A. et al. Zika virus targets human STAT2 to inhibit type I interferon signaling. *Cell Host Microbe*. v.19, p.882– 890, 2016.
- GRARD, G. et al. Zika Virus in Gabon (Central Africa) - 2007: A new threat from *Aedes albopictus*? *Plos Neglected Tropical Disease*, v. 8, p. 2681, 2014.
- GUDE, N. M. et al. Growth and function of the normal human placenta. *Thromb Res*. v.114(5-6), p. 397-407, 2004.
- GUNATHILAKE, K. D. P. P. et al. In Vitro Anti-Inflammatory Properties of Selected Green Leafy Vegetables. *Biomedicines*. v.19, p.107, 2018.
- GUO, J. et al. The anti-apoptotic, antioxidant and anti-inflammatory effects of curcumin on acrylamide-induced neurotoxicity in rats. *BMC Pharmacol Toxicol.*, v.21, p. 62-69, 2020.
- HAMEL, R. et al. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. *J Virol.*, v.89, p. 80-96, 2015.
- He, X. *Passiflora edulis*: An Insight Into Current Researches on Phytochemistry and Pharmacology. *Front Pharmacol.*, v.20, p.611-617, 2020.
- HEANG V. Zika virus infection, Cambodia, 2010. *Emerg Infect Dis*. v.18, p. 349-51, 2012.
- HENNESSE, Y M., FISCHER M., STAPLES J.E. Zika Virus Spreads to New Areas—Region of the Americas, May 2015–January 2016. *Morb. Mortal. Wkly. Rep*. v.65, p. 55–58, 2016.
- HUPPERTZ, B. Traditional and New Routes of Trophoblast Invasion and Their Implications for Pregnancy Diseases. *Int J Mol Sci*. v.31, p. 289, 2019.
- HUSTIN, J., Schaaps J. P. Echographic [corrected] and anatomic studies of the maternotrophoblastic border during the first trimester of pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol*. v.157, p. 162–168, 1987.
- JENNINGS, M.R., PARKS R.J. Curcumin as an Antiviral Agent. *Viruses*. v.31, p.1242, 2020.
- JURADO, K. A. et al. Zika virus productively infects primary human placenta-specific macrophages. *JCI Insight*. v. 25, p. 1–6. 25, 2016.
- KANG, H. et al. Anti-inflammatory effects of vicenin-2 and scolymoside in vitro and in vivo. *Inflamm Res.*, v.64, p. 1005-21, 2015.
- KATZ, L., BALTZ R.H. Natural product discovery: past, present, and future. *J Ind Microbiol Biotechnol*. v. 43, p.155-76, 2016.
- KAWAKAMI, S. et al. Constituent Characteristics and Functional Properties of Passion Fruit Seed Extract. *Life (Basel)*. v. 27, p.1238, 2021.
- KAWAKAMI, S. et al. Piceatannol and its metabolite, isorhapontigenin, induce SIRT1 expression in THP-1 human monocytic cell line. *Nutrients.*, v.6, p. 4794–4804, 2014.

- KERSHAW, J., KIM K. H. The Therapeutic Potential of Piceatannol, a Natural Stilbene, in Metabolic Diseases: A Review. *J. Med. Food.*, v. 20, p. 427–438, 2017.
- KINDHAUSER, M.K. et al. Zika: the origin and spread of a mosquito-borne virus. *Bull World Health Organ.* v. 94, p. 675- 686, 2016.
- KINOSHITA, Y. Effect of long-term piceatannol treatment on eNOS levels in cultured endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.430, 1164–1168, 2013.
- KITADA, M. et al. The Effect of Piceatannol from Passion Fruit (*Passiflora edulis*) Seeds on Metabolic Health in Humans. *Nutrients.*, v.18, p.10-1142, 2017.
- KLASE, Z. A. et al. Zika fetal neuropathogenesis: etiology of a viral syndrome. *PLoS Negl Trop Dis.* v.10, p. 48-57, 2016.
- KO, R. J. Causes, epidemiology, and clinical evaluation of suspected herbal poisoning. *Clin. Toxicol.*, v.37, p.697-708, 1999.
- KOEHN, F.E. Carter GT. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.*, v.43, p.206-20, 2015.
- KOMATSU, D, et al. Alternative Cutaneous Substitutes Based on Poly(l-co-d,l-lactic acid-co-trimethylene carbonate) with *Schinus terebinthifolius* Raddi Extract Designed for Skin Healing. *ACS Omega.* v. 23, p.18317-18326, 2019.
- KOTHA, R.R., LUTHRIA D.L. Curcumin: Biological, Pharmaceutical, Nutraceutical, and Analytical Aspects. *Molecules.* v.13, p. 26-30, 2019.
- KUHN, R. J. et al. Shake, rattle, and roll: Impact of the dynamics of flavivirus particles on their interactions with the host. *Virology.* V.78, p. 479-480, 2015.
- KULESH, D. A. et al. Os isolados de vírus Zika africanos e asiáticos apresentam diferenças fenotípicas tanto in vitro quanto in vivo. *Am J Trop Med Hyg.*, v.98, p. 432–444, 2018.
- KUMAR, A. et al. Hydroxychloroquine Inhibits Zika Virus NS2B-NS3 Protease. *ACS Omega.* v. 31, p.18132-18141, 2018.
- KUMAR, A. et al. Zika virus inhibits type-I interferon production and downstream signaling. *EMBO Rep.*, v.17, p.1766 –1775, 2016.
- KUMAR, S., PANDEY A.K. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *Sci. World J.* v.33, p. 162-50, 2013.
- KUSZEWSKI, J. C. et al. Effects of fish oil and curcumin supplementation on cerebrovascular function in older adults: a randomized controlled trial. *Nutr. Metabol. Cardiovasc. Dis.* v.30, p. 625–633, 2019.
- LANCIOTTI, R. S. et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerging Infectious Disease*, v. 14, p. 1232–9, 2008.
- LANDAIS, A. et al. ZIKA vasculitis: A new cause of stroke in children? *J Neurol Sci.* v. 315, p.211-213, 2017.

- LAVU, S. et al. Sirtuins—Novel therapeutic targets to treat age-associated diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.*, v.67, p. 841–853, 2008.
- LAZEAR, H.M. et al. Um modelo de camundongo da patogênese do vírus Zika. *Micróbio Hospedeiro Celular*. v.19, p.720–730, 2016.
- LEDERMANN, J.P. *Aedes hensilli* as a potential vector of Chikungunya and Zika Viruses. *PLoS Neglected Tropical Disease*, v. 8, p. 3188, 2014.
- LEE J. et al. Antiviral effects of black raspberry (*Rubus coreanus*) seed and its gallic acid against influenza virus infection. *Viruses* v.48, p. 149-157, 2016.
- LEE, J. L. et al. Antiviral activity of pinocembrin against Zika virus replication. *Antiviral Res.*, v. 167, p.13-24, 2019.
- LI, J. W., VEDERAS J.C. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? *Science*. v. 315, p. 161-5. 2009.
- LIMA, L.B. et al. Acute and subacute toxicity of *Schinus terebinthifolius* bark extract. *J Ethnopharmacol*. v.126, p. 468-73, 2009.
- LIN, L.T., HSU W.C., LIN C.C. Antiviral natural products and herbal medicines. *J Tradit Complement Med*. v.41, p. 24-35, 2014.
- LINDEN, M. et al. Effects of structural differences on the antibacterial activity of biflavonoids from fruits of the Brazilian peppertree (*Schinus terebinthifolius* Raddi). *Food Res Int*. v.133, p.,109-114, 2020.
- LORENZI, H., MATOS F.J. *Plantas Mediciniais no Brasil: Nativas e Exóticas*. Nova Odessa: SP: Instituto Plantarum; 2002.
- LUO, H. et al. Zika, dengue and yellow fever viruses induce differential anti-viral immune response. *PLoS ONE*. v.14, p. e0200000, 2019.
- MARCHETTE N. J., GARCIA R., RUDNICK A. Isolation of Zika virus from *Aedes aegypti* mosquitoes in Malaysia. *Am J Trop Med Hyg*. v.18, p. 411-5, 1969.
- MARCONDES, C. B., XIMENES M. F. Zika virus in Brazil and the danger of infestation by *Aedes (Stegomyia)* mosquitoes. *Rev Soc Bras Med Trop*. v. 49, p. 4-10, 2016.
- MASMEJAN, S. Zika virus, vaccines, and antiviral strategies. *Expert Rev Anti Infect Ther*. v.16, p.471-483, 2018.
- MATSUI, Y. et al. Extract of passion fruit (*Passiflora edulis*) seed containing high amounts of piceatannol inhibits melanogenesis and promotes collagen synthesis. *J. Agric. Food Chem.*, v.58, p. 11112–11118, 2010.
- MAYKIN, M. et al. Placental histopathologic findings in Zikainfected pregnancies. *Am J Obstet Gynecol*. v. 218, p. 520–521, 2018.
- MINER, J. J. Zika virus infection in mice causes panuveitis with shedding of virus in tears. *Cell Rep.*, v. 16, p. 3208 –3218, 2016.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim Epidemiológico Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica. Brasil. Volume 48, N° 43 – 2017.

- MLAKAR, J. Zika Virus Associated with Microcephaly. *N Engl J Med.* v.374, p. 951-8, 2016.
- MOCHIDA, G.H. Zika Virus: Learning from the Past as We Prepare for the Future. *J Pediatr.* v. 222, p.15-16, 2020.
- MOHD, A. et al. Resveratrol effects Zika virus replication in vitro. *Sci. Rep.*, v. 91, p. 143-36, 2019.
- MOLÁS, R. B. et al. The involvement of annexin A1 in human placental response to maternal Zika virus infection. *Antiviral Res.* v.179, p.104-09, 2020.
- MONTANHER, A. B. et al. Evidence of anti-inflammatory effects of *Passiflora edulis* in an inflammation model. *J Ethnopharmacol.* v. 109, p. 281-8, 2007.
- MOORE, C.A. et al. Characterizing the Pattern of Anomalies in Congenital Zika Syndrome for Pediatric Clinicians. *JAMA Pediatr.* v. 171, p. 288-295, 2017.
- MOTTIN, M. et al. The A-Z of Zika drug discovery. *Drug Discov Today.* v.18, p.1833-1847, 2018.
- MOUNCE, B.C. et al. Curcumin inhibits Zika and chikungunya virus infection by inhibiting cell binding. *Antiviral Res.*, v:142, p.148-157, 2017.
- MUSARRA-PIZZO, M. et al. The antimicrobial and antiviral activity of polyphenols from almond (*Prunus dulcis* L.) Skin. *Nutrients*, v. 11, p. 2355, 2019.
- MUSSO, D. et al. Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. *Eurosurveillance*, v. 19, p. 207-11. 2014.
- MUSSO, D. et al. Potential sexual transmission of Zika virus. *Emerg Infect Dis.* v. 21, p. 359-61, 2015.
- MUSSO, D., Gubler D. J. Zika Virus. *Clin Microbiol Rev.*, v.29, p. 487-524, 2016.
- NAHMIAS, Y. et al. Apolipoprotein B-dependent hepatitis C virus secretion is inhibited by the grapefruit flavonoid naringenin. *Hepatology*, v. 47, v. 1437–1445, 2008.
- NEWMAN, D.J., CRAGG G.M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J Nat Prod.*, v.79, p.629-61, 2016.
- NGONO, A.E., SHRESTA S. Immune Response to Dengue and Zika. *Annu Rev Immunol.*, v.26, p.279-308, 2018.
- NOCCHI, S.R. et al. In vitro Cytotoxicity and Anti-herpes Simplex Virus Type 1 Activity of Hydroethanolic Extract, Fractions, and Isolated Compounds from Stem Bark of *Schinus terebinthifolius* Raddi. *Pharmacogn Mag.* v. 46, p.160-4, 2016.
- NORONHA, L. et al. Zika virus damages the human placental barrier and presents marked fetal neurotropism. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* v.111, p. 287–293, 2016.

- NUNES-NETO P. A. et al. The Effect of *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) Bark Extract on Histamine-Induced Paw Edema and Ileum Smooth Muscle Contraction. *Evid Based Complement Alternat Med.*, v.141, p. 63-75, 2017.
- OLIVEIRA M. A. S. et al. Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: tip of the iceberg? *Ultrasound Obstet Gynecol.* v. 47, p. 6-7, 2016.
- OLIVEIRA, A. F. et al. Potential Antivirals: Natural Products Targeting Replication Enzymes of Dengue and Chikungunya Viruses. *Molecules*, v.22, p. 505, 2017.
- OLIVEIRA, M.B.S. et al. *Schinus terebinthifolius* Raddi extracts: From sunscreen activity toward protection of the placenta to Zika virus infection, new uses for a well-known medicinal plant. *Ind Crops Prod.* v.15, p.152-156 2020.
- OSUNA, C. E. et al. Zika viral dynamics and shedding in rhesus and cynomolgus macaques. *Nat Med.*, v. 22, p.1448–1455, 2016.
- ÖZCELİK, B., KARTAL M., ORHAN I. Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids, flavonoids, and phenolic acids. *Pharm. Biol.* v.49, p. 396–402, 2010. p. 55-62, 2018.
- PAGANI, A. A. C. et al. Quantification of bioactive compounds of pink pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi). *International Journal of Engineering and Innovative Technology*, p.4; p.37–41, 2014.
- PEI, K. et al. p-Coumaric acid and its conjugates: dietary sources, pharmacokinetic properties and biological activities. *J. Sci. Food Agric.*, v. 96, p. 2952–2962, 2015.
- PERERA-LECOIN, M. et al. Flavivirus entry receptors: an update. *Viruses.* v. 30, p. 69-88, 2013.
- PETERSEN, E.E. et al. Update: interim guidance for preconception counseling and prevention of sexual transmission of Zika virus for persons with possible Zika virus exposure—United States, September 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* v. 65, p.1077–81, 2016.
- PETERSEN, L. R. et al. Zika Virus. *N Engl J Med.* v.374, p.1552-63, 2016.
- PIELNAA, P. et al. Zika virus-spread, epidemiology, genome, transmission cycle, clinical manifestation, associated challenges, vaccine and antiviral drug development. *Virology.*, v.543, p. 34-42, 2020.
- PINTO, I. C. et al. Preparation of glass-ionomer cement containing ethanolic Brazilian pepper extract (*Schinus terebinthifolius* Raddi) fruits: chemical and biological assays. *Sci Rep.*, v.18, p. 223-12, 2020.
- PLOURDE, A.R., BLOCH E. M. A Literature Review of Zika Virus. *Emerg Infect Dis.* v. 22, p. 1185-92, 2016.
- POLAND, G. A. et al. Development of vaccines against Zika virus. *Lancet Infect Dis.* v.18, p.211-e219, 2018.
- PRADHAN, F. et al. Case report: Zika virus meningoencephalitis and myelitis and associated magnetic resonance imaging findings. *Am J Trop Med Hyg.*, v. 97, p. 340-3, 2017.

- RAC H. Common Bacterial and Viral Infections: Review of Management in the Pregnant Patient. *Ann Pharmacother.*, v.53, p. 639-651, 2019.
- RAI, M. Curcumin and curcumin-loaded nanoparticles: antipathogenic and antiparasitic activities. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* v.18, p. 367–379, 2019.
- RELICH, R. F., LOEFFELHOLZ, M. Zika Virus. *Clin Lab Med.* v. 37, p. 253-267, 2017.
- RIBEIRO, I.G. et al. Microcephaly in Piauí, Brazil: descriptive study during the Zika virus epidemic, 2015-2016. *Epidemiol Serv Saude.* v. 27, p. 2016-22, 2018.
- RIBEIRO, M. R. et al. Zika-virus-infected human full-term placental explants display proinflammatory responses and undergo apoptosis. *Archives of virology*, v. 163, p. 2687-2699, 2018.
- RODRÍGUEZ-CABO, T. et al. Investigation of liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry performance for identification and determination of hydroxylated stilbene antioxidants in wine. *J. Chromatogr.*, v.1337, 162–170, 2014.
- ROSENBERG, K. Zika Virus can Persist in Body Fluids for Prolonged Periods. *Am J Nurs.*, v.117, p.71, 2017.
- ROSSI, S. L. et al. Characterization of a novel murine model to study Zika virus. *Am J Trop Med Hyg.*, v. 94, p.1362–1369, 2016.
- SALLES, B.C.C. et al. Passiflora edulis Leaf Extract: Evidence of Antidiabetic and Antiplatelet Effects in Rats. *Biol Pharm Bull.*, v. 43, p.169-174, 2019.
- SANO, S. et al. Identification of the strong vasorelaxing substance scirpusin B, a dimer of piceatannol, from passion fruit (*Passiflora edulis*) seeds. *J. Agric. Food Chem.*, v.59, p. 6209–6213, 2011.
- SANTOS, F.R.S. et al. Identification of Zika Virus NS2B-NS3 Protease Inhibitors by Structure-Based Virtual Screening and Drug Repurposing Approaches. *J Chem Inf Model.*, v.24, p. 731-737, 2019.
- SANTOS, R. P. et al. Microbiological quality, chemical profile as well as antioxidant and antidiabetic activities of *Schinus terebinthifolius* Raddi. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.*, v. 220, p. 36-46. 2019.
- SCHAEFER, C. Drug safety in pregnancy: utopia or achievable prospect? Risk information, risk research and advocacy in Teratology Information Services. *Congenit Anom (Kyoto).*, v. 51, p. 6-11, 2011.
- SCHEIBE, C. L. et al. *Schinus terebinthifolius* raddi (Aroeira) and *Orbignya phalerata* mart. (Babassu) effect in cecorahy healing in rats. *Acta Cir Bras.*, v.31, p. 402-10, 2016.
- SCHWARTZ, D.A. Viral infection, proliferation, and hyperplasia of Hofbauer cells and absence of inflammation characterize the placental pathology of fetuses with congenital Zika virus infection. *Arch Gynecol Obstet.* v. 295, p.1361–1368, 2017.
- SETOGUCHI, Y.; Mori, S.; Oki, M.; Morita, M. Safety evaluation study on overdose of passion fruit seed extract in healthy subjects-An open-label trial. *Jpn. Pharmacol*, v. 46, 911–918. 2018.

SHERIDAN, M. A. et al. Vulnerabilidade do trofoblasto placentário humano primitivo ao vírus Zika. *Proc Natl Acad Sci.* v. 114, p.1587-1596, 2017.

SIMONIN, Y. et al. As cepas do vírus Zika apresentam potencialmente diferentes perfis infecciosos em células neurais humanas. *EBioMedicina.* v.12, p.161–169, 2016.

SIROHI, D. et al. The 3.8Å^o resolution cryo-EM structure of Zika virus. *Science* v. 352, p.467–70, 2016.

SOARES, C.N. et al. Fatal encephalitis associated with Zika virus infection in an adult. *J Clin Virol.*, v. 83, p. 63-5, 2016.

SUI Z. et al. Inhibition of the HIV-1 and HIV-2 proteases by curcumin and curcumin boron complexes. *Bioorg. Med. Chem.* v.11, p. 415–422, 1993.

TABATA, T., et al. Zika virus targets different primary human placental cells, suggesting two routes for vertical transmission. *Cell Host Microbe.* v. 20, p.155–166, 2016.

TANG, H. et al. Zika virus infects human cortical neural progenitors and attenuates their growth. *Cell Stem Cell.* v.18, p. 587–590, 2016.

TANG, Q. et al. Piceatannol inhibits the IL-1 β -induced inflammatory response in human osteoarthritic chondrocytes and ameliorates osteoarthritis in mice by activating Nrf2. *Food Funct.*, v. 15, p. 3926-3937, 2017.

TLILI, N. et al. *Schinus terebinthifolius* vs *Schinus molle*: A comparative study of the effect of species and location on the phytochemical content of fruits. *Ind. Crops Prod.*, v.186, p. 559–565, 2018.

TURCO, M.Y, MOFFETT, A. Development of the human placenta. *Development.* v. 146, p.163-28, 2019.

TUTUNCHI, H. et al. Naringenin, a flavanone with antiviral and anti-inflammatory effects: A promising treatment strategy against COVID-19. *Phytother Res.* v. 34, p. 3137-3147, 2020.

TYLER, V. E. Natural products and medicine: an overview. *Medicinal resources of the tropical forest, biodiversity and its importance to human health.*, v.12, p.3-10, 1996.

VALLÉE, A., LECARPENTIER Y. Curcumin and Endometriosis. *Int J Mol Sci.*, v. 31, p. 2440, 2020.

VAN DEN BROEK, M.F. et al. Immune defence in mice lacking type I and/or type II interferon receptors. *Immunol Rev.*, v. 148, p.5–18, 1995.

VARELA-BARCA, F. N., AGNEZ-LIMA L.F., MEDEIROS S.R. Base excision repair pathway is involved in the repair of lesions generated by flavonoid-enriched fractions of pepper tree (*Schinus terebinthifolius*, Raddi) stem bark. *Environ Mol Mutagen.* v.48, p. 672-81, 2007.

VASCONCELOS, P.F.C. Doença pelo vírus Zika: um novo problema emergente nas Américas? *Revista PanAmazônica de Saúde*, v. 6, p. 9-10, 2015.

- VÁZQUEZ-CALVO, Á. et al. Antiviral Properties of the Natural Polyphenols Delphinidin and Epigallocatechin Gallate against the Flaviviruses West Nile Virus, Zika Virus, and Dengue Virus. *Front. Microbiol.* 48, p. 134-141, 2017.
- VENCESLAU, E.M. et al. Characterization of Placental Infection by Zika Virus in Humans: A Review of the Literature. *Rev Bras Ginecol Obstet.* v.42, p. 577-585. English, 2020.
- VIVEIROS R.S., FIERRO I.M., SANTOS W. Repositioning and investigational drugs for Zika virus infection treatment: a patent review. *Expert Opin Ther Pat.*, v.30, p.847-862, 2020.
- VONGSAK, B. et al. Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaf extract by the appropriate extraction method. *Industrial Crops and Products.* v. 44, p. 566-571, 2013.
- WALKER, B. C., MITTAL S. Antitumor Activity of Curcumin in Glioblastoma. *Int J Mol Sci.* v.21, p. 9435, 2020.
- WANG, S.Y. et al. Inhibitory effects of piceatannol on human cytomegalovirus (hCMV) in vitro. *J Microbiol.* v.58, p. 716-723, 2020.
- WANG, Y., ZHAO S. Cell types of the placenta. In: *Vascular Biology of the Placenta*. San Rafael, California, USA: Morgan & Claypool Life Sciences; Chapter 4, 2010.
- WEGER-LUCARELLI J. Development and Characterization of Recombinant Virus Generated from a New World Zika Virus Infectious Clone. *J Virol.* V.91,p. 1765-16, 2016.
- WHO, R. D BLUEPRINT List of Blueprint priority diseases. 2018;1–3.
- WIKAN, N., SMITH D.R. Zika virus from a Southeast Asian perspective. *Asian Pac J Trop Med.* v.10, p. 1-5, 2017.
- WIKAN, N., Smith D.R. Zika virus: history of a newly emerging arbovirus. *Lancet Infect Dis.* v.16, p.119-e126, 2016.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Screening, assessment and management of neonates and infants with complications associated with Zika virus exposure in utero. 2016, August 30.
- XIA, Z. H. et al. Curcumin inhibits alloxan-induced pancreatic islet cell damage via antioxidation and antiapoptosis. *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, v.34, p.22-29, 2020.
- XU, F. Q. et al. Cdideoxyhexosyl flavones from the stems and leaves of *Passiflora edulis* Sims. *Food Chem.* v.136, p. 94–99, 2013.
- YAMAMOTO, T. et al. Piceatannol exhibits anti-inflammatory effects on macrophages interacting with adipocytes. *Food Sci Nutr.*, v.16, p.76-85, 2016.
- YANG, C. X. et al. Anti-HIV bioactive stilbene dimers of *Caragana rosea*. *Planta Medica*, v.71, p. 569–571, 2005.
- YUAN, T. Z. et al. Chemical constituents of leaves of *Passiflora edulis*. *Chem. Nat. Compd.* v.53, p. 1165–1166, 2017.
- ZANDI, K. In vitro antiviral activity of Fisetin, Rutin and Naringenin against dengue virus type-2. *Journal of Medicinal Plants Research* v. 5, p. 5534–5539, 2011.

ZHANG, J. et al. Glycosidic inhibitors of melanogenesis from leaves of *Passiflora edulis*. *Chem. Biodivers.* v.10, p.1851–1865, 2013.

ZHOU, H., BEEVERS C.S., HUANG S. The targets of curcumin. *Curr Drug Targets.* v. 12, p. 332-47, 2011.

ZMURKO, J. et al. The viral polymerase inhibitor 7-deaza-2'-C-methyladenosine is a potent inhibitor of in vitro Zika virus replication and delays disease progression in a robust mouse infection model. *PLoS Negl Trop Dis.* v. 23, p. 234-239, 2016.

ZUCOLOTTO, S. M. et al. Bioassay-guided isolation of anti-inflammatory C-glucosylflavones from *Passiflora edulis*. *Planta Med.*, v.75, p.1221-6, 2009.