

Universidade Federal de Juiz de Fora
Instituto de Ciências Biológicas
Pós-graduação em Ciências Biológicas

Thayná Gomes Ferreira

Potencial Antifúngico de *Mitracarpus frigidus* Frente a Isolados
Clínicos de *Candida albicans*: Investigação do Mecanismo de
Ação e Desenvolvimento de Sistemas Poliméricos para o
Tratamento da Candidíase Mucosal

Juiz de Fora
2026

Thayná Gomes Ferreira

Potencial Antifúngico de *Mitracarpus frigidus* Frente a Isolados Clínicos de *Candida albicans*: Investigação do Mecanismo de Ação e Desenvolvimento de Sistemas Poliméricos para o Tratamento da Candidíase Mucosal

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Área de concentração Genética e Biotecnologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito à obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Luiz Fabri

Juiz de Fora
2026

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Gomes Ferreira, Thayná .

Potencial Antifúngico de *Mitracarpus frigidus* Frente a Isolados Clínicos de *Candida albicans* : Investigação do Mecanismo de Ação e Desenvolvimento de Sistemas Poliméricos para o Tratamento da Candidíase Mucosal / Thayná Gomes Ferreira. -- 2026.
242 p.

Orientador: Rodrigo Luiz Fabri

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2026.

1. mecanismo de ação antifúngico do extrato metanólico de *Mitracarpus frigidus*. 2. Caracterização fitoquímica do extrato metanólico de *Mitracarpus frigidus*. 3. Desenvolvimento de formulações poliméricas de quitosana com extrato metanólico de *Mitracarpus frigidus*. 4. Caracterização físicoquímica das formulações poliméricas de quitosana com extrato metanólico de *Mitracarpus frigidus*. 5. Atividade antifúngica das formulações poliméricas de quitosana com extrato metanólico de *Mitracarpus frigidus*. I. Luiz Fabri, Rodrigo, orient. II. Título.

Thayná Gomes Ferreira

**Potencial Antifúngico de *Mitracarpus frigidus* Frente a Isolados Clínicos
de *Candida albicans*: Investigação do Mecanismo de Ação e Desenvolvimento de Sistemas Poliméricos para
o Tratamento da Candidíase Mucosal**

Tese apresentada ao Programa da Universidade
Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à
obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas.
Área de concentração: Genética & Biotecnologia

Aprovada em 12 de junho de 2026.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rodrigo Luiz Fabri - Orientador

Universidade Federal de Juiz de Fora

Profª. Drª. Michele Munk Pereira

Universidade Federal de Juiz de Fora

Profª. Drª. Priscila de Lima Paula

Cecon

Profª. Drª. Lara Melo Campos

FIOCRUZ

Profª. Drª. Gisele Rodrigues da Silva

Universidade Federal de Ouro Preto

Juiz de Fora, 26/05/2026.



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Luiz Fabri, Professor(a)**, em 12/06/2026, às 12:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gisele Rodrigues da Silva, Usuário Externo**, em 15/06/2026, às 13:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Lara Melo Campos, Usuário Externo**, em 15/06/2026, às 14:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Priscila de Lima Paula, Usuário Externo**, em 15/06/2026, às 14:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

Documento assinado eletronicamente por **Michele Munk Pereira, Professor(a)**, em 05/08/2026, às 11:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Uffj (www2.uffj.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **3001865** e o código CRC **30DBA8BC**.

*Dedico este trabalho a Deus, em memória da
minha mãe Maria Nilza e ao meu pai Jorge.*

AGRADECIMENTOS

Nenhuma conquista é construída sozinha. Ao longo desta trajetória, contei com o apoio, o incentivo e o carinho de muitas pessoas que fizeram diferença na minha vida e contribuíram para que este momento fosse possível. A todas elas, deixo aqui o meu sincero agradecimento.

À Deus, por ter guiado meus caminhos até aqui e me capacitado em cada etapa desta jornada, mostrando-me que não há limites para aquilo que posso realizar quando Ele está comigo.

À minha mãe Nilza, que partiu antes de me ver alçar este voo, mas que, ao lado do meu pai Jorge, sempre me incentivou a sonhar e a acreditar em mim, lembrando-me constantemente de que sou capaz de conquistar tudo aquilo que me proponho a alcançar e de que o presente não define, e jamais definirá, o futuro.

Às minhas irmãs, Thayne, Maria Clara e Deisy, por nunca me deixarem esquecer do meu potencial e por estarem ao meu lado em todos os momentos.

Às minhas tias, Alice, Mel e Vilma, que me acolheram em Juiz de Fora desde a graduação com tanto carinho, e aos meus primos, Fiama, Ricardo e Paula, pelo apoio, incentivo e por me fazerem sentir acolhida e pertencente em um lugar que, até então, era completamente novo para mim.

Ao meu orientador, Rodrigo, por acreditar em mim desde o mestrado e por sempre se empenhar para que eu pudesse vivenciar, de forma completa e enriquecedora, as melhores experiências que o doutorado poderia proporcionar.

Às minhas colegas de laboratório e amigas, Thalita e Olívia, que estiveram comigo em cada etapa desta caminhada, ouvindo-me, apoiando-me e incentivando-me a respirar fundo e seguir em frente.

À todos os meus colegas do LabBio, que estiveram ao meu lado sempre que precisei. Em especial, à Priscila, ao Ari e à Lara, que me ajudaram a dar os primeiros passos. Sem cada um de vocês, esta conquista não seria possível.

Ao técnico de laboratório Delfino, que me auxiliou desde o início desta trajetória e contribuiu para o desenvolvimento de soluções técnicas criativas e funcionais, sem as quais grande parte desta pesquisa não teria sido possível.

Aos amigos que estiveram ao meu lado ao longo desta jornada, em especial a

Suliane, que me acompanhou desde a graduação, Rosalva, Matheus e Hevelyn, que mesmo de longe, oferecem apoio e incentivo nos momentos mais desafiadores, e ao Edmundo, que me ajudou quando eu mais precisei.

À Cinthia e à Dea, que me incentivaram a participar do processo seletivo do mestrado e vibraram comigo a cada conquista alcançada ao longo desta trajetória.

*“Mas a vereda dos justos é como a luz da aurora, que
vai brilhando mais e mais até ser dia perfeito.”*

(Provérbios 4:18)

RESUMO

A candidíase representa um importante problema de saúde pública devido à elevada prevalência, recorrência clínica e crescente tolerância aos antifúngicos convencionais. Neste contexto, a prospecção de produtos naturais bioativos e o desenvolvimento de formulações tecnológicas constituem estratégias promissoras. Assim, esta tese teve como objetivo investigar o potencial antifúngico do extrato metanólico de *Mitracarpus frigidus* (MFM) frente a isolados clínicos e linhagens de referência de *Candida albicans*, elucidar possíveis mecanismos de ação antifúngica e desenvolver sistemas poliméricos mucoadesivos à base de quitosana para o tratamento da candidíase vulvovaginal e oral. Inicialmente, foi realizada a avaliação da atividade antifúngica do MFM frente a 52 linhagens de *C. albicans*, incluindo isolados provenientes de candidíase vulvovaginal, candidíase oral, coinfeção associada à COVID-19 e cepas ATCC. O extrato apresentou atividade antifúngica frente aos diferentes perfis clínicos avaliados, demonstrando potencial de ampla aplicabilidade antifúngica (MIC = 62,5–100 µg/mL). Posteriormente, foram conduzidos ensaios voltados à investigação do mecanismo de ação do extrato. Os resultados indicaram que o MFM atua de maneira multifatorial, promovendo desorganização celular e comprometimento de importantes fatores de virulência de *C. albicans*. As análises ultraestruturais por microscopia eletrônica revelaram alterações compatíveis com danos à parede e membrana celular, desorganização citoplasmática, vacuolização e comprometimento mitocondrial. A caracterização fitoquímica por LC–MS/MS revelou perfil predominantemente constituído por flavonoides glicosilados e derivados de ácidos fenólicos, destacando-se quercetina-3-O-galactosídeo, peltatosídeo, rutina, kaempferol, kaempferol-3-O-glicosídeo, quercetina e ácido clorogênico. Com base no potencial biológico observado, foram desenvolvidos filmes poliméricos mucoadesivos à base de quitosana e MFM para aplicação vaginal e oral. Os filmes foram caracterizados quanto às propriedades físico-químicas, morfológicas, térmicas e mecânicas por meio de técnicas como FTIR, TGA, DSC, MEV, espessura, resistência mecânica, grau de intumescimento, mucoadesão, pH superficial e perfil de liberação *in vitro*, apresentando adequada uniformidade, estabilidade físico-química, capacidade de intumescimento e liberação sustentada do extrato. Adicionalmente, os sistemas demonstraram biocompatibilidade *in vitro*, mantendo viabilidade celular acima de 70%. Por fim, a eficácia terapêutica dos filmes vaginais foi avaliada em modelo experimental de candidíase vulvovaginal *in vivo*, no qual os sistemas contendo MFM promoveram redução da carga fúngica vaginal de 70,1% (QMFM 1%) e 100% (QMFM 2,5%), além de melhora dos parâmetros inflamatórios. Em conjunto, os resultados obtidos demonstram que o extrato metanólico de *Mitracarpus frigidus* apresenta relevante potencial antifúngico e antibiofilme frente a *C. albicans*, enquanto os sistemas poliméricos desenvolvidos constituem plataformas promissoras para o tratamento de candidíase mucosal. Esta pesquisa alinha-se ao Objetivo de Desenvolvimento Sustentável 3 (Saúde e Bem-Estar) da Agenda 2030 da ONU.

Palavras-chave: *Mitracarpus frigidus*; *Candida albicans*; quitosana; filmes poliméricos; candidíase; vaginite

ABSTRACT

Candidiasis represents a significant public health concern due to its high prevalence, clinical recurrence, and increasing tolerance to conventional antifungal agents. In this context, the prospecting of bioactive natural products and the development of technological formulations constitute promising therapeutic strategies. Therefore, this thesis aimed to investigate the antifungal potential of the methanolic extract of *Mitracarpus frigidus* (MFM) against clinical isolates and reference strains of *Candida albicans*, elucidate its possible antifungal mechanisms of action, and develop chitosan-based mucoadhesive polymeric systems for the treatment of vulvovaginal and oral candidiasis. Initially, the antifungal activity of MFM was evaluated against 52 *C. albicans* strains, including isolates obtained from vulvovaginal candidiasis, oral candidiasis, COVID-19-associated coinfections, and ATCC strains. The extract exhibited antifungal activity against all clinical profiles evaluated, demonstrating broad-spectrum antifungal applicability (MIC = 62.5–100 µg/mL). Subsequently, studies were conducted to investigate its mechanism of action. The results indicated that MFM acts through a multifactorial mechanism, promoting cellular disorganization and impairing important virulence factors of *C. albicans*. Ultrastructural analyses by electron microscopy revealed alterations consistent with cell wall and membrane damage, cytoplasmic disorganization, vacuolization, and mitochondrial impairment. Phytochemical characterization by LC–MS/MS revealed a profile predominantly composed of glycosylated flavonoids and phenolic acid derivatives, with quercetin-3-O-galactoside, peltatoside, rutin, kaempferol, kaempferol-3-O-glycoside, quercetin, and chlorogenic acid identified as major compounds. Based on the observed biological potential, chitosan-based mucoadhesive films containing MFM were developed for vaginal and oral applications. The systems were characterized regarding their physicochemical, morphological, thermal, and mechanical properties using FTIR, TGA, DSC, SEM, thickness, mechanical strength, swelling degree, mucoadhesion, surface pH, and in vitro release profile analyses, demonstrating adequate uniformity, physicochemical stability, swelling capacity, and sustained extract release. Additionally, the systems showed in vitro biocompatibility, maintaining cell viability above 70%. Finally, the therapeutic efficacy of the vaginal films was evaluated in an in vivo experimental model of vulvovaginal candidiasis, in which MFM-loaded systems reduced the vaginal fungal burden by 70.1% (QMFM 1%) and 100% (QMFM 2.5%), in addition to improving inflammatory parameters. Collectively, the results demonstrate that the methanolic extract of *Mitracarpus frigidus* exhibits significant antifungal and antibiofilm activity against *C. albicans*, while the developed polymeric systems represent promising platforms for the treatment of mucosal candidiasis. This research is aligned with Sustainable Development Goal 3 (Good Health and Well-Being) of the United Nations 2030 Agenda.

Keywords: *Mitracarpus frigidus*; *Candida albicans*; chitosan; polymeric systems; candidiasis; vulvovaginal candidiasis; oral candidiasis; biofilm.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Formas morfológicas das espécies de leveduras do gênero <i>Candida</i> spp.	18
Figura 2	Mecanismos de resistência aos azólicos	24
Figura 3	<i>Mitracarpus Frigidus</i> (Willd. ex Schult Reem.) K. Schum. (<i>Rubiaceae</i>) partes aéreas e fruto.	27

CAPÍTULO 2

Figura 1	Efeito do MFM e da nistatina sobre a integridade da membrana de cepas de <i>Candida albicans</i> avaliada por captação de iodeto de propídio após 12 h de tratamento.	70
Figura 2	Efeito do MFM e da nistatina sobre a produção intracelular de espécies reativas de oxigênio (ROS) em cepas de <i>Candida albicans</i> .	73
Figura 3	Efeito do MFM e da nistatina sobre o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) em cepas de <i>Candida albicans</i> .	74
Figura 4	Aspectos ultraestruturais da cepa sensível de <i>Candida albicans</i> (ATCC® 24433™) após tratamento com MFM observados por microscopia eletrônica de transmissão.	76
Figura 5	Alterações ultraestruturais detalhadas da cepa sensível de <i>Candida albicans</i> (ATCC® 24433™) após tratamento com MFM.	77
Figura 6	Aspectos ultraestruturais da cepa resistente de <i>Candida albicans</i> (ATCC® 10231™) após tratamento com MFM observados por microscopia eletrônica de transmissão.	79
Figura 7	Alterações ultraestruturais em isolados clínicos de <i>Candida albicans</i> após tratamento com MFM.	80
Figura 8	Curvas de cinética de morte (time-kill) de cepas de <i>Candida albicans</i> tratadas com MFM e nistatina.	81
Figura 9	Área sob a curva (AUC) das curvas de time-kill de cepas de <i>Candida albicans</i> tratadas com MFM e nistatina.	83
Figura 10	Efeito do MFM sobre a adesão e a formação inicial de biofilme de <i>Candida albicans</i> .	85
Figura 11	Avaliação por microscopia eletrônica de varredura (MEV) do efeito do MFM sobre a formação de biofilme de <i>Candida albicans</i> .	85

CAPÍTULO 3

Figura 1	Caracterização das soluções precursoras dos filmes de quitosana contendo extrato de <i>Mitracarpus frigidus</i> (QMFM 0,5–2,5% p/v) e do filme branco (QBR): potencial zeta (A) e diâmetro hidrodinâmico (B).	114
Figura 2	Análise reológica das soluções precursoras dos filmes de quitosana contendo extrato de <i>M. frigidus</i> (QMFM 0,5–2,5% p/v) e do filme branco (QBR).	117

Figura 3	Análise termogravimétrica (TGA/DTG) dos filmes de quitosana contendo extrato de <i>M. frigidus</i> (QMFM 0,5–2,5% p/v) e do filme branco (QBR).	121
Figura 4	Microscopia eletrônica de varredura da superfície dos filmes de quitosana contendo extrato de <i>M. frigidus</i> (QMFM 0,5–2,5% p/v) e do filme branco (QBR).	124
Figura 5	Microscopia eletrônica de varredura das secções transversais dos filmes de quitosana contendo extrato de <i>M. frigidus</i> (QMFM 0,5–2,5% p/v) e do filme branco (QBR).	125
Figura 6	Espectros de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) do extrato metanólico de <i>M. frigidus</i> (MFM), dos filmes contendo MFM (QMFM 0,5–2,5% p/v) e do filme branco (QBR).	127
Figura 7	Propriedades mecânicas dos filmes de quitosana contendo extrato de <i>M. frigidus</i> (QMFM 0,5–2,5% p/v) e do filme branco (QBR).	129
Figura 8	Peso e espessura dos filmes de quitosana contendo extrato de <i>M. frigidus</i> (QMFM 0,5–2,5% p/v) e do filme branco (QBR).	131
Figura 9	Teor de umidade dos filmes de quitosana contendo extrato de <i>M. frigidus</i> (QMFM 0,5–2,5% p/v) e do filme branco (QBR).	133
Figura 10	Capacidade de intumescimento dos filmes de quitosana contendo extrato de <i>M. frigidus</i> (QMFM 0,5–2,5% p/v) e do filme branco (QBR).	135
Figura 11	Perfil de liberação in vitro do extrato metanólico de <i>M. frigidus</i> a partir dos filmes de quitosana.	137
Figura 12	Atividade anti-inflamatória dos filmes de quitosana contendo extrato de <i>M. frigidus</i> (QMFM 1% e 2,5% p/v) e do filme branco (QBR).	139
Figura 13	Efeito dos filmes de quitosana contendo extrato de <i>M. frigidus</i> sobre a migração celular de fibroblastos L929.	141
Figura 14	Inibição percentual do crescimento de cepas de <i>Candida albicans</i> pelos filmes de quitosana contendo extrato de <i>M. frigidus</i> (QMFM 1% e 2,5% p/v) e pelo filme branco (QBR).	144
Figura 15	Cinética de crescimento de cepas de <i>Candida albicans</i> tratadas com filmes de quitosana contendo extrato de <i>M. frigidus</i> (QMFM 1% e 2,5% p/v) e filme branco (QBR).	146
Figura 16	Inibição da fase de adesão do biofilme de <i>Candida albicans</i> pelos filmes de quitosana contendo extrato de <i>M. frigidus</i> (QMFM 1% e 2,5% p/v) e filme branco (QBR).	148
Figura 17	Inibição da fase de proliferação do biofilme de <i>Candida albicans</i> pelos filmes de quitosana contendo extrato de <i>M. frigidus</i> (QMFM 1% e 2,5% p/v) e filme branco (QBR).	151

Figura 18 Fotomicrografia da mucosa vaginal de ratas dos grupos controle, infectado, tratado com nistatina, tratado com 154 quitosana, QMFM 1% e QMFM 2,5%.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1	Número de trabalhos acadêmicos selecionados em cada base de dados.	35
----------	--	----

CAPÍTULO 2

Tabela 1	Perfil químico qualitativo sugerido do extrato metanólico de <i>Mitracarpus frigidus</i> obtido por UPLC-QTOF-MS/MS.	62
Tabela 2	Concentração inibitória mínima (CIM) do extrato metanólico de <i>Mitracarpus frigidus</i> (MFM) e da nistatina frente a cepas de <i>Candida albicans</i> .	68
Tabela 3	Concentração inibitória mínima (CIM) do MFM nos ensaios de proteção por sorbitol e interação com ergosterol exógeno frente a cepas de <i>Candida albicans</i> .	71
Tabela 4	Interação entre MFM e itraconazol frente a cepas de <i>Candida albicans</i> avaliada pelo índice de concentração inibitória fracionada (FICI).	88

CAPÍTULO 3

Tabela 1	Perfil fitoquímico do extrato metanólico de <i>Mitracarpus frigidus</i> obtido por LC-MS/MS.	103
Tabela 2	Eventos de degradação térmica e perda de massa obtidos por análise termogravimétrica (TGA/DTG).	120
Tabela 3	Carga fúngica vaginal dos grupos experimentais durante o tratamento in vivo.	153

LISTA DE ABREVIATURAS

AMR	<i>Antimicrobial resistance</i>
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATR	<i>Attenuated total reflectance</i>
AUC	<i>Area under the curve</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
C.a.1015	<i>Candida albicans</i> 1015
C.a.O2	<i>Candida albicans</i> O2
C.a.vv1	<i>Candida albicans</i> vv1
CDR1	<i>Candida drug resistance protein 1</i>
CDR2	<i>Candida drug resistance protein 2</i>
CH	<i>Chitosan</i>
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
COX-1	<i>Cyclooxygenase-1</i>
COX-2	<i>Cyclooxygenase-2</i>
CPA	<i>Cyclophosphamide</i>
CVV	<i>Candidíase vulvovaginal</i>
CYP51	<i>Cytochrome P450 14α-demethylase</i>
DLS	<i>Dynamic light scattering</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DSC	<i>Differential scanning calorimetry</i>
DTG	<i>Derivative thermogravimetry</i>
ERG11	<i>Lanosterol 14α-demethylase</i>
ERG2	<i>C-8 sterol isomerase</i>
ERG3	<i>C-5 sterol desaturase</i>
ERG6	<i>Sterol 24-C-methyltransferase</i>
ESI	<i>Electrospray ionization</i>
EVs	<i>Extracellular vesicles</i>
FCY1	<i>Cytosine deaminase</i>
FCY2	<i>Cytosine permease</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FICI	<i>Fractional inhibitory concentration index</i>
FKS	<i>β-(1,3)-D-glucan synthase</i>
FTIR	<i>Fourier transform infrared spectroscopy</i>
FUR1	<i>Uracil phosphoribosyltransferase</i>
G'	<i>Storage modulus</i>

G''	<i>Loss modulus</i>
H2DCFDA	<i>2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate</i>
HD	<i>Hidrodinamic</i>
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i>
IFIs	<i>Invasive fungal infections</i>
IL-12	<i>Interleukin 12</i>
IL-6	<i>Interleukin 6</i>
LC-MS/MS	<i>Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry</i>
LPS	<i>Lipopolysaccharide</i>
MDR1	<i>Multidrug resistance protein 1</i>
MEV	<i>Microscopia eletrônica de varredura</i>
MFC	<i>Minimum fungicidal concentration</i>
MFM	<i>Methanolic extract of <i>Mitracarpus frigidus</i></i>
MIC	<i>Minimum inhibitory concentration</i>
MVBs	<i>Multivesicular bodies</i>
NO	<i>Nitric oxide</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PI	<i>Propidium iodide</i>
QB	<i>Filme de quitosana branco</i>
QMFM 0,5%	<i>Filme de quitosana contendo 0,5% de MFM</i>
QMFM 1%	<i>Filme de quitosana contendo 1% de MFM</i>
QMFM 2,5%	<i>Filme de quitosana contendo 2,5% de MFM</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RVVC	<i>Recurrent vulvovaginal candidiasis</i>
SD	<i>Standard deviation</i>
SDA	<i>Sabouraud dextrose agar</i>
SDB	<i>Sabouraud dextrose broth</i>
SEM	<i>Scanning electron microscopy</i>
TEM	<i>Transmission electron microscopy</i>
TGA	<i>Thermogravimetric analysis</i>
TWEEN 80	<i>Polyoxyethylene sorbitan monooleate</i>
UV	<i>Ultraviolet</i>
VVC	<i>Vulvovaginal candidiasis</i>
ZP	<i>Zeta potential</i>
$\Delta\Psi_m$	<i>Mitochondrial membrane potential</i>

Sumário

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 CANDIDÍASE	18
1.2 TERAPIAS ANTIFÚNGICAS	21
1.3 MECANISMO DE RESISTÊNCIA	23
1.4 PLANTAS MEDICINAIS	26
1.5 FILMES MUCOADESIVOS	28
1.6 QUITOSANA	30
2 JUSTIFICATIVA	31
3 OBJETIVOS	33
3.1 OBJETIVO GERAL	33
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
4 CAPÍTULO 1	34
5 CAPÍTULO 2	55
6 CAPÍTULO 3	107
CONCLUSÃO	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
REFERENCIAS	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
ANEXO I	189
ANEXO II	191

APRESENTAÇÃO

Os resultados que compõem esta tese estão organizados em formato de coletânea, sendo apresentados em três capítulos correspondentes a artigos científicos e um anexo referente a uma patente. Dessa forma, as seções de Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências encontram-se inseridas nos respectivos manuscritos, constituindo parte integrante deste trabalho. A estrutura da tese compreende, ainda, a Introdução, os Objetivos Geral e Específicos, a Conclusão Geral, as Referências Bibliográficas e dois Anexos, reunindo de forma integrada os produtos científicos e tecnológicos desenvolvidos durante a pesquisa. O capítulo 1, refere-se ao Artigo 1, publicado na revista científica da FAMINAS, intitula-se “*Mitracarpus frigidus*: explorando o potencial medicinal e os compostos bioativos de uma fonte natural – um estudo de revisão”. O capítulo 2, refere-se ao Artigo 2, submetido à revista *Biomedicine & Pharmacotherapy*, intitula-se “Multi-target antifungal mechanisms of *Mitracarpus frigidus* extract against *Candida albicans* through membrane damage, ROS overproduction, and mitochondrial dysfunction”. O capítulo 3, refere-se ao Artigo 3, submetido à revista *Journal of Drug Delivery Science and Technology* e em processo de segunda revisão, intitula-se “Localized Vaginal Drug Delivery Using Chitosan Films Incorporating *Mitracarpus frigidus* Extract: From Physicochemical Design to *In Vivo* Antifungal Efficacy”. Os manuscritos destinados à submissão foram elaborados em língua inglesa e formatados de acordo com as normas específicas de cada periódico, sendo apresentados nesta tese na mesma versão encaminhada para submissão.

No Anexo I encontra-se a primeira página do artigo intitulado “*Mitracarpus frigidus*: explorando o potencial medicinal e os compostos bioativos de uma fonte natural – um estudo de revisão”, publicado na Revista Científica FAMINAS e apresentado no Capítulo 1 desta tese.

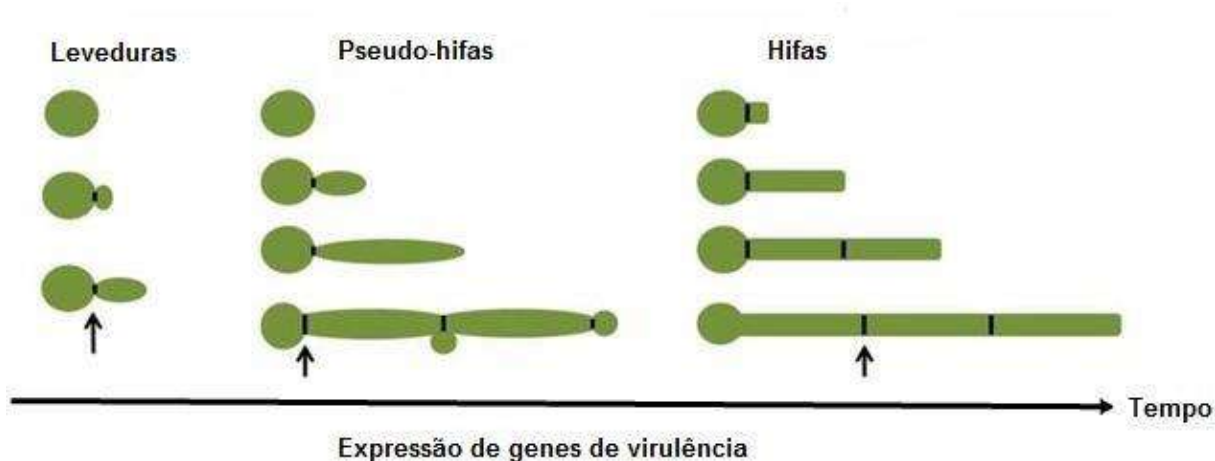
No Anexo II encontra-se a Patente I, intitulada “Formulação mucoadesiva à base de extrato metanólico de *Mitracarpus frigidus* incorporado a filmes poliméricos de quitosana para uso oral e vulvovaginal, processo de obtenção, composições e usos”, referente à principal formulação desenvolvida nesta tese.

1 INTRODUÇÃO

1.1 CANDIDÍASE

Candida albicans é um fungo eucarioto pertencente ao gênero *Candida* spp. Este gênero é caracterizado pela ausência de pigmentos fotossintetizantes, por apresentar parede celular composta predominantemente por β -glucanas, mananas e quitina, e pela membrana plasmática rica em esteróis, especialmente ergosterol. A *Candida albicans*, especialmente, se comporta como organismo polimórfico, capaz de transitar reversivelmente entre as formas de levedura, pseudo-hifa e hifa, característica intimamente relacionada à sua plasticidade adaptativa e potencial patogênico do fungo (HALL, 2015; POLESELLO et al., 2017).

Figura 1 - Formas morfológicas das espécies de leveduras do gênero *Candida* spp.



Fonte: Adaptado de Chen e colaboradores (2020)

Legenda: Transição da forma de levedura até a forma hifal e, conseqüentemente, o aumento da expressão dos genes de virulência com o decorrer do tempo.

C. albicans compõe a microbiota humana como comensal e está entre as principais espécies do gênero associadas a infecções oportunistas, sendo responsável por 90% dos casos. Estima-se que 25 a 75% dos indivíduos saudáveis são colonizados por cândida (HAMEED et al., 2021). Em mulheres, a colonização

vaginal por *Candida spp* ocorre em aproximadamente 20–30% dos casos, sendo *C. albicans* a espécie predominante (RODRIGUEZ-CERDEIRA et al., 2020). Além da mucosa vaginal, o gênero também pode estar presente na cavidade oral, trato gastrointestinal, respiratório e urinário (HAMEED et al., 2021).

Quando há perda da homeostase do hospedeiro, como em situações de disbiose, danos às superfícies mucosas ou imunossupressão, *C. albicans* pode transitar do estado comensal para o patogênico, resultando em infecções superficiais ou sistêmicas (CAMPOS et al., 2021). Esse processo envolve um conjunto de fatores de virulência, incluindo adesão às células do hospedeiro mediada por glicoproteínas de superfície, transição morfogenética para a forma de hifa, variação fenotípica, secreção de enzimas hidrolíticas, produção de toxinas, capacidade de evasão e modulação das respostas imunes, adaptação ao estresse oxidativo, aquisição de micronutrientes essenciais (especialmente ferro) e plasticidade metabólica frente a variações de pH e temperatura no microambiente do hospedeiro (LOPES et al., 2022).

A transição entre levedura e hifa constitui um dos principais determinantes da invasão tecidual, já que esta forma permite a penetração ativa das barreiras epiteliais e o acesso a tecidos mais profundos. Esse processo é iniciado a partir da adesão às células do hospedeiro, mediada principalmente por proteínas das famílias adesinas e invasinas, seguido do alongamento das hifas, associado à endocitose induzida e à secreção de proteinases e fosfolipases, favorecendo a invasão do tecido, dano celular e aquisição de nutrientes. Além disso, a capacidade de sobreviver no interior de fagócitos e modular vias inflamatórias contribuem para a persistência da infecção (LOPES et al., 2022; KATSIPOULAKI et al., 2024).

A adesão também representa a etapa inicial da formação de biofilme, um importante determinante de virulência de *C. albicans*. Após a fixação às superfícies bióticas ou abióticas, as células proliferam e se organizam em comunidades estruturadas compostas por leveduras, pseudo-hifas e hifas imersas em matriz extracelular rica em polissacarídeos e proteínas. Nesse contexto, a parede celular desempenha papel central, pois seus componentes estruturais participam tanto da adesão inicial quanto da manutenção do biofilme. Essa organização confere resistência a antifúngicos e às defesas do hospedeiro, favorecendo a persistência da infecção, recorrência clínica e a ineficácia terapêutica (COSTA et al., 2014; KATSIPOULAKI et al., 2024).

Estima-se que aproximadamente 65% das infecções microbianas estejam relacionadas à formação de biofilmes (RODRIGUEZ-CERDEIRA et al., 2020). Além disso, em condições assintomáticas, como na mucosa vaginal de mulheres saudáveis, predominam formas planctônicas, enquanto que, em quadros sintomáticos, observa-se a formação de biofilme organizado, associado a maior inflamação e recorrência clínica (CAMPOS et al., 2021). Isso ocorre porque no biofilme, as diferentes variantes morfológicas expressam perfis genéticos e metabólicos distintos das células planctônicas, incluindo aumento na produção de proteases, maior síntese de componentes de matriz extracelular e superexpressão de genes associados à adesão, bombas de efluxo e mecanismos de quorum sensing. Esse sistema permite que as células coordenem respostas adaptativas, potencializando a resistência antifúngica e a capacidade de persistência no hospedeiro (KATSIPOULAKI et al., 2024).

Na última década houve um aumento expressivo na incidência de infecções causadas por *Candida*, especialmente em razão do crescimento do número de indivíduos suscetíveis. Programas de vigilância de longo prazo, como o estudo epidemiológico ARTEMIS DISK, que reuniu dados de 41 países ao longo de mais de uma década, e o programa SENTRY de monitoramento antimicrobiano, demonstraram que, apesar das mudanças no perfil epidemiológico indicarem um aumento progressivo de espécies não *albicans*, na maioria das regiões analisadas, *C. albicans* permanece como a espécie mais prevalente. Além disso, recentemente, a Organização Mundial da Saúde divulgou sua primeira lista de patógenos fúngicos prioritários, na qual espécies de *Candida* foram classificadas em níveis de prioridade média, alta e crítica. *Candida albicans*, juntamente com *Candida auris*, foi incluída entre os quatro patógenos considerados de prioridade crítica (PFALLER et al., 2010; PFALLER et al., 2011).

Dentre as infecções mais comuns pode se destacar a candidíase vulvovaginal e a candidíase oral. A candidíase vulvovaginal (CVV) é uma inflamação causada por espécies de *Candida*, podendo ser classificada em formas não complicadas e complicadas (GONÇALVES et al., 2016; YAN et al., 2020). A forma não complicada envolve episódios esporádicos, leves a moderados, em mulheres saudáveis, enquanto a forma complicada inclui casos graves, recorrentes (≥ 4 episódios/ano) ou associados a fatores de risco, como gravidez, diabetes e imunossupressão. Os sintomas são inespecíficos e incluem prurido, queimação, dor, irritação vaginal,

dispareunia e disúria, além de sinais como eritema, edema e fissuras, podendo se confundir com outras infecções vaginais (WILLEMS et al., 2020).

Embora não seja de notificação obrigatória, a CVV é altamente prevalente, sendo a segunda causa mais comum de vaginite; estima-se que 70–80% das mulheres terão ao menos um episódio ao longo da vida, com recorrência em cerca de metade dos casos e desenvolvimento da forma recorrente em 5–10%, apesar das limitações epidemiológicas (RODRIGUEZ-CERDEIRA et al., 2020; SOUZA et al., 2025).

A candidíase oral, por sua vez, é considerada por alguns autores a lesão mais comum dos tecidos moles na cavidade bucal, tendo como principal reservatório o dorso da língua, que frequentemente atua como ponto inicial da colonização por *Candida* (MILLSOP et al., 2016). A infecção pode se estender para a orofaringe, caracterizando a candidíase orofaríngea, marcada pela invasão do epitélio local. A candidíase oral apresenta múltiplas formas clínicas, geralmente classificadas em manifestações agudas, crônicas e síndromes de candidíase mucocutânea crônica, podendo ocorrer simultaneamente em diferentes regiões da cavidade oral (VILA et al., 2020). A transição de *Candida albicans* de um estado comensal para patogênico está associada a fatores predisponentes, como uso de antibióticos de amplo espectro, imunossupressão, presença de dispositivos médicos e aumento de procedimentos como transplantes, o que contribui para o crescimento da incidência dessas infecções (LOPES et al., 2022).

1.2 TERAPIAS ANTIFÚNGICAS

Os antifúngicos utilizados no tratamento das infecções por *Candida* podem ser divididos em diferentes classes, de acordo com seu mecanismo de ação. Os azóis, incluindo os imidazóis e triazóis, são amplamente utilizados devido à sua boa farmacocinética e segurança, atuando na inibição da enzima lanosterol 14 α -desmetilase (CYP51), essencial para a síntese de ergosterol, componente fundamental da membrana fúngica. Como consequência, ocorre acúmulo de esteróis tóxicos e alteração da estrutura da membrana, levando à inibição do crescimento fúngico, com efeito geralmente fungistático em leveduras (CAMPOY et al., 2017; PRISTOV & GHANNOUM, 2019).

As equinocandinas, como caspofungina, micafungina e anidulafungina, representam uma classe mais recente e atuam de forma seletiva na parede celular fúngica, inibindo a enzima β -(1,3)-D-glucano sintase, o que compromete a integridade estrutural e leva à lise osmótica da célula, apresentando efeito fungicida. Apesar da boa segurança, sua utilização é limitada à via intravenosa (VAN DAELE et al., 2019; LEE et al., 2020).

Já os poliênicos, como anfotericina B e nistatina, atuam predominantemente sobre a membrana plasmática fúngica por meio da ligação ao ergosterol, levando à desorganização estrutural da membrana e aumento de sua permeabilidade. Tradicionalmente, esse efeito foi associado à formação de poros transmembrana capazes de promover extravasamento de íons e metabólitos essenciais, culminando em desequilíbrio osmótico e morte celular. Entretanto, evidências mais recentes sugerem que o mecanismo de ação da anfotericina B é mais complexo e multifatorial, envolvendo extração de ergosterol da membrana plasmática por agregados supramoleculares ("sterol sponge model"), comprometendo a estabilidade e funcionalidade da membrana fúngica (LEE et al., 2020; VANREPPELEN et al., 2023).

Além da desorganização de membrana, diversos estudos demonstram que poliênicos induzem intenso estresse oxidativo intracelular em espécies de *Candida* e outros fungos patogênicos. A exposição à anfotericina B está associada ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), disfunção mitocondrial, despolarização do potencial de membrana mitocondrial e ativação de vias relacionadas à morte celular programada. Evidências indicam que o dano oxidativo promovido por anfotericina B pode ocorrer independentemente da formação de poros, sugerindo mecanismos adicionais associados à toxicidade celular fúngica (GONZALEZ-JIMENEZ; PERLIN; SHOR, 2023).

Embora apresentem amplo espectro antifúngico e potente atividade fungicida, os poliênicos possuem uso clínico limitado principalmente pela toxicidade sistêmica, especialmente nefrotoxicidade associada à interação parcial com colesterol presente em membranas de células humanas. Formulações lipídicas de anfotericina B foram desenvolvidas com o objetivo de reduzir esses efeitos adversos, preservando a eficácia antifúngica (LEE et al., 2020; VANREPPELEN et al., 2023).

Por fim, os análogos de pirimidina, como a flucitosina, interferem na síntese de ácidos nucleicos e proteínas, afetando diretamente o metabolismo celular fúngico. De

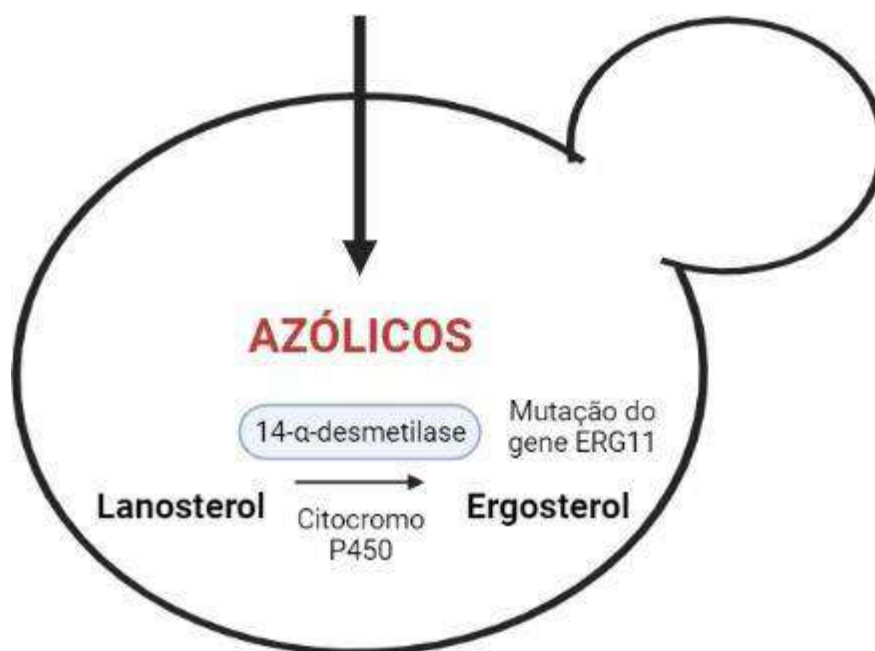
modo geral, apesar da diversidade de classes, as opções terapêuticas ainda são limitadas, o que reforça a necessidade de desenvolvimento de novos agentes antifúngicos. (SUN et al., 2021).

1.3 MECANISMO DE RESISTÊNCIA

Os mecanismos de resistência em *Candida* spp. estão intimamente relacionados aos alvos moleculares dos antifúngicos e refletem as adaptações celulares frente às pressões impostas por esses fármacos. De modo geral, tais mecanismos incluem alterações no alvo, redução da concentração intracelular do fármaco, ativação de vias compensatórias e processos adaptativos associados a biofilmes (CAMPOS et al., 2021; CZAJKA et al., 2023).

No caso dos azóis, cujo mecanismo de ação se baseia na inibição da lanosterol 14 α -desmetilase, codificada por ERG11, a resistência pode ocorrer por diferentes vias que atuam de forma complementar. Entre os mecanismos mais bem descritos estão as mutações em ERG11, que reduzem a afinidade do antifúngico pelo alvo, e a superexpressão desse gene, que aumenta a quantidade da enzima e exige concentrações intracelulares mais elevadas do fármaco para que a inibição seja efetiva. Além disso, a resistência aos azóis também pode envolver a superexpressão de bombas de efluxo, como CDR1, CDR2 e MDR1, reduzindo a concentração intracelular do antifúngico. Outro mecanismo relevante é o desvio da via de biossíntese de esteróis, como observado em alterações de ERG3, que impedem a formação de esteróis tóxicos acumulados na presença de azóis e permitem a manutenção da integridade da membrana celular mesmo sob pressão antifúngica (SANGUINETTI; POSTERARO; LASS-FLÖRL, 2015; SHARMA & ROGERS, 2020; LEE et al., 2021)

Figura 2 - Mecanismos de resistência aos azólicos



Fonte: Adaptado de Campos (2022).

Legenda: Mutação do gene ERG11

Para os polienos, como a anfotericina B, cujo mecanismo de ação envolve a ligação direta ao ergosterol e a consequente desorganização da membrana plasmática, a resistência é menos frequente, mas pode ocorrer principalmente por alterações quantitativas ou qualitativas no conteúdo de ergosterol. Mutações em genes da via de biossíntese de esteróis, incluindo ERG2, ERG3, ERG6 e ERG11, podem modificar a composição lipídica da membrana, diminuindo a afinidade do fármaco por seu alvo e, consequentemente, sua eficácia. (LEE et al., 2021; AHMAD et al., 2019).

estudos recentes demonstram que mecanismos associados à resposta ao estresse oxidativo também desempenham papel importante na tolerância aos poliênicos. Como a anfotericina B induz intensa produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), algumas linhagens resistentes apresentam aumento da expressão de enzimas antioxidantes, incluindo catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase, reduzindo o dano oxidativo promovido pelo antifúngico. Esse mecanismo adaptativo permite maior sobrevivência celular durante a exposição ao tratamento antifúngico e está associado à persistência da infecção, especialmente em biofilmes maduros (BRAJTBURG et al., 2021; JUKIĆ et al., 2017).

No caso das equinocandinas, que atuam inibindo a enzima β -1,3-glucano

sintase, essencial para a síntese da parede celular fúngica, a resistência está principalmente associada a mutações nos genes FKS. Essas alterações reduzem a sensibilidade da enzima ao fármaco e elevam os valores de concentração inibitória mínima. Além disso, respostas compensatórias relacionadas ao remodelamento da parede celular e à ativação de vias de estresse também podem favorecer a persistência celular durante a exposição a essa classe, contribuindo para a seleção de variantes resistentes, especialmente em nichos protegidos (PERLIN, 2015; SANGUINETTI; POSTERARO; LASS-FLÖRL, 2015; KATSIPOULAKI et al., 2024).

A resistência aos antimetabólitos, como a flucitosina, está diretamente relacionada ao seu mecanismo de ação, uma vez que a atividade desse fármaco depende da entrada na célula e de sua posterior conversão em metabólitos ativos. Assim, a resistência geralmente decorre de perda de função em genes envolvidos na captação e ativação do composto, como FCY2, que codifica uma permease de citosina, FCY1, que codifica a citosina-desaminase, e FUR1, que codifica a uracil fosforibosiltransferase. Alterações nesses genes impedem a formação dos metabólitos ativos que interferem na síntese de DNA e RNA, comprometendo a eficácia terapêutica da flucitosina. Embora esse mecanismo tenha sido classicamente descrito em diferentes espécies de *Candida*, ele permanece como a principal base molecular para a resistência a essa classe antifúngica (PAPON et al., 2007; LEE et al., 2021; KAUR et al., 2022).

Por fim, em biofilmes, a resistência apresenta caráter multifatorial e não pode ser explicada exclusivamente pelos mecanismos descritos em células planctônicas. Nesses ambientes, observa-se a contribuição adicional de matriz extracelular, heterogeneidade celular, subpopulações persistentes e barreiras físico-químicas, que dificultam a penetração dos antifúngicos e comprometem a eficácia terapêutica. Consequentemente, a correlação entre valores de MIC obtidos in vitro e resposta clínica torna-se limitada (HEALEY et al., 2018; CAMPOS et al., 2021).

Em conjunto, esses mecanismos refletem a capacidade adaptativa de *Candida* spp. frente à pressão antifúngica, resultando em aumento dos valores de MIC, persistência durante o tratamento e maior risco de falha terapêutica, especialmente em infecções invasivas ou em espécies com suscetibilidade reduzida intrínseca (SOUZA et al., 2025).

1.4 PLANTAS MEDICINAIS

O avanço progressivo da resistência microbiana a terapias convencionais, tem revelado a necessidade de busca por alternativas mais eficazes. Neste sentido, os extratos vegetais têm sido amplamente investigados como agentes antibacterianos e antifúngicos. Evidências recentes têm demonstrado que a riqueza metabólica de plantas medicinais confere uma bioatividade única, capaz de modular processos essenciais à sobrevivência microbiana (ANGELINI et al., 2024). Nesse contexto, extratos brutos de diferentes espécies vegetais têm demonstrado ações microbiológicas consistentes e diversificadas, como a inibição de bactérias clinicamente importantes. Estudos recentes mostram que os extratos de Jambu e de jabuticaba, ricos em alcaloides e polifenóis, apresentaram efeito antimicrobiano promissor frente as espécies *S. aureus* e *P. aeruginosa* (FARJADO et al., 2025; VIANNA et al., 2026). Além disso, extratos de *Calotropis gigantea* demonstrou efeito antifúngico contra *Candida albicans* e *Aspergillus spp.* Adicionalmente, há relatos de extratos aquosos/metanólicos com ação contra fenótipos associados à multirresistência, reforçando a relevância dos produtos vegetais para prospecção de agentes com potencial aplicação clínica (ARIP et al., 2022).

Devido à ampla diversidade molecular dos metabólitos secundários produzidos por plantas e à possibilidade de diferentes constituintes atuarem de maneira complementar, extratos naturais frequentemente exibem perfis de ação multitarget, os quais podem representar uma vantagem estratégica frente à resistência microbiana por atingirem simultaneamente múltiplos sistemas celulares (FERREIRA et al., 2023). Nesse sentido, a literatura descreve que metabólitos vegetais podem atuar pela desorganização de membranas, interferência na síntese e função de DNA/RNA/enzimas e, de forma particularmente relevante para a resistência, pela modulação de quorum sensing e pela inibição de bombas de efluxo, mecanismos diretamente relacionados ao aumento de tolerância a fármacos e à persistência microbiana em biofilmes (CAMPOS et al., 2021).

Além da ação antimicrobiana direta, muitos extratos e fitoquímicos têm sido propostos como adjuvantes terapêuticos capazes de potencializar antimicrobianos convencionais. Esse efeito é especialmente relevante quando atuam sobre determinantes-chave da resistência, como efluxo e permeabilidade de membrana,

reduzindo a concentração necessária dos fármacos e restaurando sua eficácia (ZAI; COCK; CHEESMAN, 2025; NGUYEN et al., 2023).

Mitracarpus frigidus, (Willd. ex ReemSchult.) K. Schum., espécie pertencente à família *Rubiaceae*, é uma planta comumente encontrada em regiões tropicais, sendo amplamente distribuída nas Antilhas e na América tropical. No Brasil, sua presença é observada em todas as regiões do país, de Norte a Sul (Souza et al., 2022). Embora não seja amplamente utilizada na medicina popular, estudos científicos têm revelado um potencial farmacoterapêutico promissor de suas partes aéreas (Fabri et al., 2009).

Figura 3 - *Mitracarpus Frigidus* (Willd. ex Schult Reem.) K. Schum. (*Rubiaceae*) partes aéreas e fruto.



Fonte: Autores.

As partes aéreas de *Mitracarpus frigidus* possuem um extrato rico em metabólitos de importância biológica, como flavonóides, triterpenos e ácidos fenólicos, cuja presença está associada a uma série de atividades farmacológicas, incluindo propriedades antioxidantes, antitumorais, anti-inflamatórias, antimicrobianas e leishmanicidas. Estudos biológicos conduzidos com o extrato metanólico e frações de *M. frigidus* evidenciaram seu potencial farmacológico em diversas condições

patológicas, incluindo atividade antimicrobiana contra várias linhagens bacterianas e fúngicas, tais como *S. aureus*, *B. cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Shigella sonnei*, *Bacillus cereus*, *Cryptococcus neoformans* e *C. albicans* (Fabri et al., 2009; Ferreira et al., 2023).

A caracterização química do extrato metanólico das partes aéreas de *M. Frigidus* (MFM) identificou, por meio do perfil cromatográfico por UFLC QTOF- MS, alguns compostos como, ácido clorogênico, clarinosídeo e 2-azaaantraquinona (Fabri et al., 2021). Além disso, análises por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), revelaram a presença dos triterpenos ácido ursólico e ursolato de metila, dos flavonóides, rutina e campferol-3-O-rutinosídeo, e da psicorubrina, uma naftoquinona relatada até hoje apenas na família *Rubiaceae*. (Lemos et al., 2020; FABRI et al., 2012a, 2014b).

Um trabalho realizado com o extrato metanólico de *Mitracarpus frigidus* demonstrou seu efeito promissor contra *C. albicans*. O estudo foi realizado utilizando uma linhagem fúngica de *C. albicans* resistente a antifúngicos convencionais (ATCC® 10231™) como anidulafungina, voriconazol, itraconazol e fluconazol, resultando na diminuição da atividade metabólica, redução da frequência, densidade e tamanho das células planctônicas de *C. albicans* (Campos et al., 2021).

Estudos *in vivo* também foram realizados, demonstrando que o extrato metanólico de *M. frigidus* foi capaz de reduzir significativamente a carga fúngica em ratas *wistar* fêmeas infectadas com *C. albicans* (ATCC® 10231™) após seis dias de tratamento. Estes ensaios demonstraram o potencial de *M. frigidus* para o tratamento da candidíase vulvovaginal, ressaltando a necessidade de estudos adicionais que sustentem sua relevância terapêutica (Campos et al., 2020).

1.5 FILMES MUCOADESIVOS

A *American Society of Testing and Materials* define a mucoadesão como o estado em que duas superfícies permanecem unidas por forças interfaciais, que podem envolver forças de valência, intertravamento mecânico ou ambos. Nesse contexto, os sistemas mucoadesivos representam uma estratégia promissora frente as limitações dos medicamentos convencionais, como a retenção inadequada no sítio de aplicação e a recorrência de efeitos adversos sistêmicos. Ao prolongarem o tempo

de permanência da forma farmacêutica sobre a mucosa e promoverem contato íntimo com a superfície absorviva, esses sistemas favorecem a liberação sustentada do fármaco, melhoram seu desempenho terapêutico e potencializam efeitos locais ou sistêmicos (MAMATHA et al., 2022).

Entre as diferentes formulações mucoadesivas, os filmes se destacam como uma das estratégias mais promissoras. Essas formulações são desenvolvidas para aderir firmemente à mucosa, permitindo administração mais precisa do fármaco e favorecendo sua absorção tanto em tratamentos locais quanto sistêmicos (DE CARO et al., 2022). Em geral, são constituídas por polímeros biocompatíveis e biodegradáveis, características que as tornam particularmente adequadas para aplicação na mucosa oral e vaginal, em razão de sua flexibilidade, conforto e resistência mecânica (DI PRIMA et al., 2020).

No contexto clínico, já existem filmes bucais aprovados pelo FDA contendo fármacos como buprenorfina, fentanil, naloxona e lidocaína. Em comparação com géis orais, que podem ser rapidamente diluídos ou removidos pela saliva, os filmes apresentam maior retenção no local de aplicação, além de contribuírem para a proteção da área lesionada, alívio da dor e aumento da eficácia terapêutica (ALVES et al., 2020; DE CARO et al., 2019). Corroborando esse potencial, Brenna et al. (2022) avaliaram adesivos mucoadesivos contendo diferentes concentrações de clobetasol em comparação com adesivos sem fármaco e observaram que, embora o dispositivo vazio não tenha promovido melhora dos sintomas, foi capaz de reduzir significativamente a dor, sugerindo que a própria forma farmacêutica pode exercer efeito benéfico adicional no manejo das lesões (BRENNAN et al., 2022; MAUCERI et al., 2025).

Por outro lado, os filmes vaginais têm se destacado como formas farmacêuticas promissoras por oferecerem vantagens relevantes em relação a sistemas tópicos convencionais, como géis, cremes e pomadas. Entre seus principais benefícios estão a maior precisão de dose e o maior conforto durante a administração, fatores essenciais para a aceitação da paciente. Esses sistemas apresentam aplicação prática, boa portabilidade e menor risco de vazamento após o uso, características que favorecem a adesão ao tratamento (CERVI et al., 2022).

Inicialmente empregados, sobretudo, como contraceptivos e espermicidas de uso sob demanda, os filmes vaginais vêm sendo progressivamente explorados para

diferentes finalidades terapêuticas, incluindo o tratamento de infecções vaginais. Nesse contexto, estudos recentes têm demonstrado o potencial desses sistemas no manejo da candidíase vulvovaginal, especialmente quando formulados com quitosana. Filmes vaginais à base desse polímero têm apresentado resultados promissores, com aumento de 2 a 3 vezes no tempo de residência vaginal e liberação sustentada do fármaco por até 24–72 h, características que reforçam sua aplicabilidade no tratamento dessa condição (PATEL et al., 2026).

1.6 QUITOSANA

A quitosana é um polissacarídeo catiônico natural obtido pela desacetilação parcial ou total da quitina, um dos biopolímeros mais abundantes da natureza, encontrado em fontes como crustáceos, fungos, algas, insetos e moluscos. Em razão dessa ampla disponibilidade, esse material pode ser obtido a baixo custo e tem despertado grande interesse em aplicações biomédicas. Além disso, trata-se de um polímero considerado seguro, atóxico, biocompatível e biodegradável, características que favorecem seu emprego em sistemas farmacêuticos e biomateriais destinados à administração de fármacos e ao reparo tecidual (MATICA et al., 2019; LIU et al., 2018).

As propriedades físico-químicas da quitosana contribuem para sua versatilidade funcional, especialmente em formulações farmacêuticas voltadas à liberação controlada de fármacos. Esse polímero também pode atuar como promotor de permeação em mucosa, favorecendo a passagem de substâncias pelo epitélio, o que o torna particularmente interessante para sistemas de administração intravaginal e oral. Entre suas características mais relevantes está a natureza catiônica em meio ácido, resultante da ionização dos grupamentos amino distribuídos ao longo da cadeia polimérica. A proporção desses grupamentos está relacionada ao grau de desacetilação, enquanto a massa molar interfere em parâmetros como bioatividade, viscosidade, elasticidade e resistência mecânica, fatores importantes para a obtenção de formulações estáveis e eficazes (LIU et al., 2018; WANG; ROMAN, 2023).

Entre as propriedades mais relevantes da quitosana, destaca-se sua atividade antimicrobiana intrínseca. A interação entre os grupamentos catiônicos da cadeia polimérica e os componentes aniônicos da superfície microbiana pode comprometer a integridade celular, enquanto outros mecanismos descritos incluem interferência na

síntese de RNA mensageiro e proteínas. No caso de *C. albicans*, há evidências de importante atividade antibiofilme, com redução de aproximadamente 95% na adesão e superior a 90% na formação de biofilme, reforçando a relevância desse biopolímero no controle de infecções fúngicas (COSTA et al., 2014; MATICA et al., 2019).

No desenvolvimento de filmes poliméricos antifúngicos, a quitosana tem se destacado por reunir mucoadesão, biodegradabilidade, capacidade de formação de matriz polimérica e atividade antimicrobiana, tornando-se uma plataforma promissora para aplicações em mucosas. Estudos têm demonstrado seu uso em formulações vaginais destinadas ao tratamento da candidíase, tanto isoladamente quanto em associação com outros polímeros e antifúngicos. Como exemplo, um estudo com filme vaginal mucoadesivo e de rápida dissolução para liberação de clotrimazol mostrou eficiência de encapsulação de cerca de 99,6%, manutenção da atividade antifúngica contra *C. albicans* e estabilidade do teor do fármaco por 120 dias sob refrigeração, evidenciando o potencial desses sistemas no manejo de infecções fúngicas recorrentes (CERVI et al., 2022).

2 JUSTIFICATIVA

Os avanços no desenvolvimento de terapias antifúngicas têm sido bastante relevantes nas últimas décadas, no entanto, as infecções causadas por *C. albicans* permanecem sendo um importante problema de saúde pública, principalmente quando se trata de manifestações mucosais, como a candidíase oral e vulvovaginal. A alta prevalência e recorrência clínica dessas infecções, associada ao potencial patogênico de linhagens resistentes aos antifúngicos convencionais, limita a eficácia das terapias disponíveis, reforçando a necessidade de desenvolvimento de novas abordagens antifúngicas mais seguras e eficazes.

Nesse contexto, produtos naturais têm se destacado como fontes promissoras de moléculas bioativas, especialmente devido à elevada diversidade estrutural de metabólitos secundários e ao potencial de atuação simultâneo em múltiplos alvos terapêuticos. Entre as espécies vegetais brasileiras com potencial farmacológico, *M. frigidus* apresenta atividade antimicrobiana e anti-inflamatória previamente descritas, além da presença de compostos fenólicos e flavonoides associados à atividade biológica. Entretanto, apesar do potencial farmacológico da espécie, ainda existem

poucas investigações acerca de sua atividade antifúngica diante de isolados clínicos de *C.albicans*, especialmente considerando fenótipos provenientes de coinfeções e contextos clínicos distintos. Além disso, a literatura carece de investigações relacionadas ao mecanismo de ação e aos possíveis alvos terapêuticos envolvidos no potencial antifúngico do extrato de *M. frigidus*.

Por outro lado, embora estudos recentes tenham demonstrado o potencial de sistemas mucoadesivos para o tratamento de infecções em mucosas, ainda são limitadas as formulações poliméricas associadas a extratos vegetais antifúngicos voltadas especificamente para candidíase oral e vulvovaginal. Neste cenário, a quitosana se destaca como um biopolímero particularmente relevante, devido às suas propriedades mucoadesivas, biodegradáveis, biocompatíveis e à sua atividade antimicrobiana intrínseca, características que favorecem sua aplicação em sistemas terapêuticos destinados à administração local em mucosas.

Dessa forma, esta tese justifica-se pela necessidade de ampliar as alternativas terapêuticas para o tratamento das infecções causadas por *C. albicans*, bem como pela carência de abordagens inovadoras capazes de transformar o potencial biológico de uma espécie vegetal nativa ainda pouco explorada em uma tecnologia farmacêutica aplicável. A pesquisa foi estruturada de forma integrada, contemplando diferentes etapas de investigação, desde a prospecção fitoquímica e a validação da atividade antifúngica frente a isolados clínicos de relevância médica até a elucidação dos mecanismos de ação envolvidos. A partir da comprovação do potencial antifúngico e antibiofilme do extrato de *M. frigidus*, avançou-se para o desenvolvimento de sistemas poliméricos mucoadesivos destinados à liberação local de compostos bioativos, associando inovação tecnológica à aplicação terapêutica. Essa abordagem permitiu avançar da identificação de um produto natural com atividade antifúngica para o desenvolvimento de sistemas farmacêuticos voltados à sua administração local, resultando na proteção intelectual da tecnologia proposta e evidenciando seu potencial para aplicação no tratamento da candidíase mucosal. Além disso, esta pesquisa está alinhada ao Objetivo de Desenvolvimento Sustentável 3 (Saúde e Bem-Estar) da Agenda 2030 da ONU, ao contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, incentivar o uso sustentável da biodiversidade brasileira e ampliar as perspectivas para o enfrentamento da resistência aos antimicrobianos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o potencial antifúngico do extrato de *Mitracarpus frigidus* frente a isolados de *Candida albicans*, incluindo linhagens multirresistentes, por meio da avaliação de seus mecanismos de ação e atividade sobre fatores de virulência. Além disso, desenvolver sistemas mucoadesivos à base de quitosana para aplicação em candidíase oral e vulvovaginal.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o perfil químico de MFM.
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de MFM frente a linhagens padrão e isolados clínicos de *C. albicans*.
- Investigar os mecanismos de ação antifúngica de MFM sobre *C. albicans*, por meio de ensaios relacionados à integridade de envoltório celular, produção intracelular de espécies reativas de oxigênio (ROS), alterações no potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) e análises ultraestruturais por microscopia eletrônica de transmissão.
- Avaliar os efeitos de MFM sobre o biofilme de *C. albicans*.
- Investigar possíveis interações farmacológicas entre MFM e antifúngicos convencionais.
- Desenvolver filmes mucoadesivos à base de quitosana incorporados ao MFM para aplicação em mucosa.
- Caracterizar os filmes desenvolvidos quanto às propriedades físico-químicas, mecânicas, térmicas, reológicas e morfológicas.
- Avaliar a capacidade de intumescimento, perfil de liberação e desempenho tecnológico das formulações mucoadesivas.
- Investigar a atividade antifúngica e antibiofilme *in vitro* dos filmes mucoadesivos frente a *C. albicans*.
- Avaliar a biocompatibilidade e a segurança preliminar das formulações.
- Investigar o potencial terapêutico das formulações mucoadesivas *in vivo*.

4 CAPÍTULO 1

O Capítulo 1 apresenta o artigo intitulado “*Mitracarpus frigidus*: explorando o potencial medicinal e os compostos bioativos de uma fonte natural – um estudo de revisão”, publicado na Revista Científica FAMINAS (e-ISSN: 2763-941X). O estudo teve como objetivo reunir e discutir evidências científicas acerca do potencial terapêutico de *M. frigidus*, abordando seus principais compostos bioativos, propriedades farmacológicas e aplicações medicinais descritas na literatura. Além disso, o trabalho destaca a relevância da espécie como fonte promissora para o desenvolvimento de produtos com potencial biotecnológico e farmacêutico. Embora a autora desta tese figure como segunda autora na publicação, o manuscrito foi desenvolvido em regime de co-titularidade entre as duas primeiras autoras, com participação equivalente na concepção, elaboração e desenvolvimento do estudo. A primeira página do artigo publicado, encontram-se no Anexo I.

Mitracarpus frigidus: explorando o potencial medicinal e os compostos bioativos de uma fonte natural – um estudo de revisão

Mitracarpus frigidus: exploring the medicinal potential and bioactive compounds of a natural source – a review study

Thalita de Freitas SOUZA¹, Thayná Gomes FERREIRA¹, Karollina Chves FERREIRA¹, Laura Morais de OLIVEIRA¹, Lara de Melo CAMPOS¹, Lucas de Araújo CARVALHO¹, Nubia Bennini ANDRADE¹; Rodrigo Luiz FABRI¹.

(1) Laboratório de Produtos Naturais Bioativos, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora. Juiz de Fora –MG, Brasil.

Autor correspondente:

Rodrigo Luiz Fabri (rodrigo.fabri@ufjf.br) Laboratório de Produtos Naturais Bioativos. Departamento de Bioquímica. Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Juiz de Fora.
Rua José Lourenço Kelmer, s/n - São Pedro. CEP 36036-900. Juiz de Fora – MG, Brasil.
Telefone: +55 32 2102 3208 Fax: +55 32 2102 3216

Conflitos de interesses: Os autores deste artigo declaram que não possuem conflito de interesse de ordem financeiro, pessoal, político, acadêmico ou comercial.

Resumo

Os produtos naturais, derivados de plantas e outros organismos, têm se mostrado uma fonte promissora de fármacos inovadores. Apesar dos avanços na síntese de novos medicamentos, a química de produtos naturais continua relevante devido à diversidade de substâncias biologicamente ativas que podem ser encontradas. O gênero *Mitracarpus*, nativo do Brasil e presente em países tropicais e subtropicais, possui uma grande variedade de compostos químicos com potencial farmacológico, como triterpenos, terpenos e alcaloides. Dentre as espécies desse gênero, destaca-se *Mitracarpus frigidus*, embora não seja amplamente utilizado na medicina popular, possui metabólitos de importância biológica e tem demonstrado potencial antioxidante, antitumoral, anti-inflamatório, antimicrobiano e leishmanicida. Portanto, é relevante explorar o potencial medicinal dessa espécie e suas atividades biológicas e compostos bioativos. A revisão sistemática destacou a composição química e atividades biológicas de *M. frigidus*, ressaltando seu potencial farmacológico e etnofarmacologia positiva. São necessários mais estudos para comprovar sua segurança e eficácia, visando seu uso terapêutico e desenvolvimento de formulações farmacêuticas futuras.

Palavras chaves: *Mitracarpus frigidus*; plantas medicinais; biodiversidade brasileira; etnofarmacologia.

Abstract

Natural products derived from plants and other organisms have emerged as a promising source of innovative drugs. Despite advances in the synthesis of new medicines, natural product chemistry remains relevant due to the diversity of biologically active substances that can be found. The genus *Mitracarpus*, native to Brazil and found in tropical and subtropical countries, has a wide variety of chemical compounds with pharmacological potential, such as triterpenes, terpenes, and alkaloids. Among the species in this genus, *Mitracarpus frigidus* stands out. Although not widely used in popular medicine, it possesses biologically important metabolites and has demonstrated potential as an antioxidant, anticancer, anti-inflammatory, antimicrobial, and leishmanicidal agent. Therefore, it is relevant to explore the medicinal potential of this species and its biological activities and bioactive compounds. The systematic review highlighted the chemical composition and biological activities of *M. frigidus*, emphasizing its pharmacological potential and positive ethnopharmacology. Further pharmacological, clinical, and toxicological studies are necessary to verify its safety and efficacy, aiming to promote its therapeutic use.

Keywords: *Mitracarpus frigidus*; medicinal plants; Brazilian biodiversity; ethnopharmacology.

1 Introdução

Os produtos naturais emergiram como uma fonte de fármacos inovadores. Tal fato se deve a origem das substâncias biológica e farmacologicamente ativas, que são extraídas das plantas e de outros organismos, como fungos, bactérias e insetos. Mesmo em uma era tecnológica com a possibilidade de obtenção de novos fármacos por meio de síntese, a química de produtos naturais ainda é promissora, uma vez que, usufrui dos metabólitos secundários, por representarem uma ampla diversidade de substâncias com potencial biológico (BARREIRO, BOLZANI, 2009).

O gênero *Mitracarpus* é nativo do Brasil, e também é encontrado em países tropicais e subtropicais. Essa família apresenta uma grande diversidade de constituintes químicos já isolados com grande potencial farmacológico, como, triterpenos, terpenos e alcaloides. Esses metabólitos ativos podem ser usados como marcadores quimiotaxonômicos, tanto para gêneros, quanto para subfamílias (PEREIRA, CARVALHO-OKANO, GARCIA, 2006; MARTINS, NUNES, 2015; EKALU, 2021).

O gênero contém pelo menos 50 espécies, dentre elas, pode-se destacar a espécie *Mitracarpus scaber*, que faz parte da medicina tradicional da África ocidental, usada para dor de cabeça, dor de dente, amenorria, dispepsia, doenças hepáticas, ulcerativas e hanseníase. Além disso, seu uso tópico é ativo para dermatites infecciosas, eczema e escabiose. Estudos também revelaram seu potencial como antimicrobiano (DALZIEL et al., 1937; KERHARO; ADAM et al., 1974; SANOGO et al., 1996). Outra espécie de importância biológica é a *Mitracarpus villosus*, que apresentou ao longo dos estudos, potencial antimicrobiano e sedativo (IROBI e DARAMOLA, 1993; JOHN-AFRICA et al., 2014). *Mitracarpus hirtus* também apresentou propriedades farmacológicas para tratamento de infecções de pele, atividades antioxidantes, antidiabéticas, antiacetilcolinesterase e anti- tirosinases. (BISIGNANO et al., 2000; ETIENNE et al., 2021)

Mitracarpus frigidus (Willd. ex Reem Schult.) K. Schum. não possui uso popular, porém, o extrato bruto e frações das partes aéreas da planta têm revelado ao longo dos estudos, um potencial farmacoterapêutico promissor. Os extratos e frações dessa espécie vegetal é constituído por metabólitos de importância biológica, como alcaloides, triterpenos e compostos fenólicos. Além disso, a presença desses fitoconstituintes tem sido correlacionada com o potencial antioxidante, antitumoral, anti-inflamatório, antimicrobiano e leishmanicida da espécie (FABRI et al., 2009).

Dessa forma, é de extrema importância discutir o potencial da espécie *Mitracarpus frigidus* como uma planta medicinal, bem como suas atividades biológicas e substâncias bioativas já relatadas.

2 Metodologia

A revisão sistemática da literatura sobre *Mitracarpus frigidus* conta com artigos, monografias, dissertações e teses publicados no período de 2007 a 2021, cuja busca iniciou-se no primeiro semestre de 2021, a partir das bases de dados on-line CAPES, Google Acadêmico, PubMed e ScienceDirect nos idiomas português e inglês, combinando-se as palavras-chaves: *Mitracarpus spp.* x *Mitracarpus frigidus*, com o auxílio dos operadores booleanos “AND” e “OR”.

Para a escolha da literatura utilizada foram levadas em consideração a relevância e a adequação do assunto abordado. Assim, foram selecionados trabalhos que abordavam as principais atividades biológicas e análises dos metabólitos secundários apresentados pela espécie. Alguns trabalhos acadêmicos realizados pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Produtos Naturais Bioativos (LPNB) também foram utilizados, apesar da indisponibilidade dos mesmos nas bases de dados e no repositório da Universidade Federal de Juiz de Fora.

3 Resultados

Durante a pesquisa pelos termos indexados *Mitracarpus spp.* x *Mitracarpus frigidus* foram recuperados 381 trabalhos acadêmicos no Periódicos Capes, 292 na base de dados Google Acadêmico, oito no PubMed e 157 no ScienceDirect. Os trabalhos acadêmicos recuperados foram selecionados com base na sua relevância e adequação ao assunto abordado, obtendo no total 25 trabalhos. Dentre os trabalhos, alguns foram encontrados em mais de uma base de dados. Essa seleção está presente na Tabela 1

Tabela 1. Número de trabalhos acadêmicos selecionados em cada base de dados

Palavras-chave	Capes	Google Acadêmico	PubMed	Science Direct	Trabalhos LPNB
<i>Mitracarpus</i> spp. x	13	19	5	5	7
<i>Mitracarpus frigidus</i>					

4 Revisão de literatura e Discussão

4.1 Composição química

Mitracarpus frigidus apresenta-se como uma espécie promissora, devido a sua composição química, na qual possui diversos metabólitos secundários de importância farmacológica, como alcaloides, triterpenos, esteróides, saponinas, fenóis, taninos, flavonoides, antraquinonas, leucocianidinas, catequinas e flavononas presentes no extrato bruto da planta (FABRI et al., 2009).

No óleo essencial das partes aéreas de *M. frigidus* obtido por hidrodestilação, e submetido a Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de massas (CG/EM) revelou a presença das classes de hidrocarbonetos e monoterpenos, além de identificar 12 compostos, sendo o linalol (29,29%) e o acetato de eugenol (15,85%) os majoritários, seguido por isobutirato de 5-hidroxi-isobornil, 5-metil-1-undeceno e salicilato de metila. Também, identificaram 2,6-nonadienal; 7-octen-4-ol; álcool β- feniletílico; damascenona; isobutirato de 8-isobutiriloxi-isobornil e trans-2-nonenal (FABRI et al., 2012b).

O extrato hexânico das partes aéreas de *M. frigidus* (MFH) e suas frações, apresentaram esteroides, triterpenos, cumarinas, fenóis, flavonoides, flavononas e alcaloides. Além disso, foi relatado pela primeira vez, a presença das classes de cumarinas e triterpenos no extrato (FABRI et al., 2009; 2014a). Ademais, dois triterpenóides pentacíclicos (ácido ursólico e ursolato de metila) foram isolados nesse extrato por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (FABRI et al., 2014d).

No estudo de Fabri et al (2009; 2020), foi possível identificar por meio do protocolo de Matos (1997) e de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) diversas classes de metabólitos secundários, após submeter o extrato em diclorometano e suas frações obtidos a partir das partes aéreas de *M. frigidus*. Tais classes são: triterpenos, esteróides, antraquinonas, alcaloides, flavonoides, glicosídeos flavônicos, fenóis, flavononas, taninos, saponinas e antronas. Ademais, dois fitocompostos foram isolados por meio de CLAE do extrato

diclorometânico das partes aéreas de *M. frigidus*, a psicorubrina (naftoquinona) e a escopoletina (cumarina natural) (FABRI et al., 2012a; LEMOS et al., 2020; EKALU, 2021).

Já nas partições em acetato de etila e em butanol do extrato metanólico das partes aéreas de *M. frigidus* predominaram as classes dos triterpenos, saponinas, fenóis, taninos, flavonoides, antraquinonas e flavononas. No entanto, apenas a partição em acetato de etila apresentou catequinas (FABRI et al., 2009), utilizando os protocolos descritos por Matos (1997).

O extrato metanólico das partes aéreas de *M. frigidus* (MFM) evidenciou a presença de antraquinonas livres e conjugadas (C- e O-glicosídeo), que foram quantificadas, apresentando $7,3 \pm 0,03$ e $5,4 \pm 0,05\%$ p/p, respectivamente. Também apresentaram flavonoides, taninos, alcaloides, terpenos e quinonas (FABRI et al., 2012c; 2014c). O estudo de Cunha (2017), identificou oito picos característicos de flavonoides por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Ultravioleta com arranjo de fotodiodos (CLAE- DAD).

Estudos recentes de Fabri et al (2021), detectaram pela primeira vez a presença de compostos, como ácido clorogênico, clarinosídeo, quercetina-pentosilhexosídeo, Kaempferol- ramnosilhexosídeo e 2-azaantraquinona no extrato MFM analisado por UFLC QTOF- MS (Cromatografia Líquida Ultrarrápida acoplada à Espectrometria de Massas).

Ainda no extrato MFM, em estudo anterior, Fabri et. al. (2014b) também identificou compostos flavonoides, como rutina, Kaempferol-3O-rutinosídeo e Kaempferol; psicorubrina, uma naftoquinona; e um triterpenoide pentacíclico, o ácido ursólico; por meio de análises cromatográficas (CLAE). Após análise qualitativa por CLAE, o ácido ursólico foi considerado o composto mais abundante no extrato ($275,3 \pm 0,8$ mg/g em MFM) (FABRI et al., 2014b).

E por fim, a partição hidrometanólica do extrato metanólico das partes aéreas de *M. frigidus*, revelou triterpenos, saponinas, fenóis, taninos, flavonoides, leucocianidinas e flavononas (FABRI et al., 2009).

4.2 Atividades biológicas

4.2.1 Antimicrobiana

4.2.1.1 Antifúngica

Infecções fúngicas são cada vez mais comuns na sociedade, acometendo principalmente pacientes imunocomprometidos ou hospitalizados com alguma doença subjacente grave (BONGOMIN et al., 2017). Espécies dos gêneros *Candida*, *Cryptococcus* e *Aspergillus* são as principais responsáveis por infecções fúngicas sistêmicas, as quais representam cerca de 90% das mortes por esse tipo de infecção. Apesar da relevância clínica dessas infecções, os medicamentos antifúngicos disponíveis são limitados e a prevalência de estirpes fúngicas resistentes é cada vez maior. Dessa forma, há uma demanda crescente pelo desenvolvimento de novos antifúngicos (LEE et al., 2020).

Estudos realizados com *M. frigidus* demonstraram que a espécie possui promissora atividade diante diversas infecções fúngicas que afetam comumente a população. Em um estudo de Fabri et al (2012b), o óleo essencial de *M. frigidus* mostrou forte ação antifúngica (Concentração Inibitória Mínima - CIM $\leq 100 \mu\text{g/mL}$) (HOLETZ et al., 2002) contra *C. albicans* ATCC® 18804 e *C. neoformans* ATCC® 32608, com CIM de $63 \mu\text{g/mL}$ e $8 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. O controle positivo utilizado foi a Anfotericina B, que revelou uma CIM de $0,08 \mu\text{g/mL}$ para a *C. albicans* e $0,04 \mu\text{g/mL}$ para *C. neoformans*.

Outro estudo do mesmo autor avaliou o extrato em diclorometano e suas frações diante das mesmas linhagens testadas para o óleo essencial. Ambas as cepas revelaram ser sensíveis, com valores de CIM significativos quando comparados ao controle positivo (Anfotericina B). Vale ressaltar que exibiram promissores resultados de atividade total, percentual de atividade antimicrobiana, Índice de Susceptibilidade Microbiano (ISM) e dos halos de inibição (FABRI et al., 2020). Os extratos em hexano e em acetato de etila também foram ativos para as mesmas linhagens, quando avaliados o valor de CIM e de atividade total por Fabri et al (2009).

A atividade antifúngica de MFM foi avaliada in vivo e in vitro por Fabri et al (2009); Melo (2017); Campos et al (2018) e Campos (2020), frente às linhagens de *C. albicans* ATCC® 10231, (resistente à Anidulafungina, Voriconazol, Itraconazol e Fluconazol) e ATCC® 18804; e *C. neoformans* ATCC® 32608. Os resultados revelaram que MFM obteve significativo valor de CIM (superior ao do Fluconazol). Ademais, possui efeito fungistático; capacidade de reduzir a curva de crescimento

(diminuição da fase logarítmica); diminuir o número de células fúngicas; inibir a densidade das células; promover a liberação de nucleotídeos e danos na membrana; agir em parede celular e na membrana fúngica; atuar sinergicamente quando associado à Nistatina e aumentar o conteúdo lipídico (MELO, 2017; CAMPOS et al., 2018; CAMPOS, 2020).

Quanto aos biofilmes, MFM possui ação perante os biofilmes pré-formados (inibe a formação, proliferação e adesão) com ação semelhante ao controle positivo (Nistatina), como também, diminui a densidade de células e o teor de carboidratos (CAMPOS et al., 2018; CAMPOS, 2020).

Os ensaios in vivo evidenciaram redução da carga fúngica dos camundongos tratados com MFM; ligeira inflamação e alterações histológicas com ausência de organismos fúngicos; redução do número de animais infectados e menor quantidade de hifas (dose-dependente) (CAMPOS et al., 2018; CAMPOS, 2020). É importante ressaltar que a atividade antifúngica pode estar relacionada aos compostos fenólicos e flavonoides (Kaempferol-O-rutinosídeo, rutina, psicorubrina, Kaempferol, escopoletina, ácido ursólico e ursolato de metila), previamente identificados na planta (CAMPOS et al., 2018; CAMPOS, 2020).

Nos trabalhos de Campos (2020) e Campos et al (2020), uma formulação em gel a base de quitosana contendo o extrato de MFM foi testada para atividade antifúngica in vivo diante da cepa *C. albicans* ATCC® 10231. O estudo da formulação de MFM visa avaliar qual propriedade pode ser superior ao do extrato puro e aprimorar o tratamento. Nesse caso, o extrato em uma formulação de quitosana é vantajoso, pois facilita a aplicação e adesão do produto, bem como, aumenta a conservação em prateleira, devido seu comportamento pseudoplástico e efeito antifúngico. Os resultados obtidos revelam que a formulação reduz significativamente a carga fúngica, não promove alterações histopatológicas, diminui a infiltração de células, reduz as células fúngicas no epitélio, além de não mostrar sinais de ruptura do tecido (CAMPOS, 2020; CAMPOS et al., 2020).

O composto psicorubrina também foi avaliado diante das mesmas linhagens do estudo de Fabri et al (2009), e mostrou uma CIM de $87,3 \mu\text{M}$ frente a *C. neoformans*. Mesmo esse valor sendo superior ao controle positivo utilizado (Anfotericina B CIM = $0,05 \mu\text{M}$), seu potencial antifúngico é promissor. Com relação à espécie *C. albicans*, apresentou CIM igual a $340,3 \mu\text{M}$, também superior ao controle positivo (Anfotericina B CIM = $0,09 \mu\text{M}$), mas exibiu forte ação antifúngica (FABRI et al., 2012a).

Outro composto isolado, a escopoletina, também foi avaliado quanto à atividade antifúngica frente às linhagens de *C. tropicalis* ATCC® 28707, resistente à Anfotericina B, *C. albicans* ATCC® 18804 e *C. glabrata*

ATCC® 2001. Como resultado, a escopoletina obteve significativos valores de CIM com efeito fungistático; diminuiu a curva de crescimento, o crescimento fúngico e a densidade de células; aumentou a permeabilidade fúngica ao promover extravasamento de membrana (ação semelhante ao controle positivo Fluconazol); exibiu ação em parede celular e membrana plasmática fúngica, além de inibir a bomba de efluxo, quando associada ao Fluconazol. Ademais, o composto também possui a capacidade de reduzir a área, afetar a taxa de crescimento e a formação de hifas em biofilmes (LEMOS et al., 2020).

4.2.1.2 Antibacteriana

Os antibióticos são muito importantes no combate às infecções bacterianas. No entanto, a facilidade de acesso e o emprego maciço desses compostos para fins industriais têm contribuído para o aumento progressivo da resistência aos antimicrobianos (HAYASHI, BIZERRA e DA SILVA JÚNIOR, 2013; MARMITT et al., 2015). Além disso, os microrganismos evoluíram e desenvolveram uma estratégia de crescimento a partir de comunidades celulares sésseis densamente povoadas, os biofilmes, os quais permitem a sobrevivência das células microbianas em ambientes hostis (LACERDA, 2013; CAMPOS, 2017).

Diante disso, os extratos vegetais podem ser uma alternativa na busca de novos produtos com ação antimicrobiana, pois as plantas constituem uma imensa fonte de compostos de ampla atividade biológica. Logo, o estudo dos metabólitos secundários dos vegetais pode contribuir para a descoberta de substâncias menos tóxicas e mais eficazes contra a resistência bacteriana (PINHO et al., 2012; BAPTISTA, 2017).

Fabri et al (2012b), avaliou a atividade antibacteriana in vitro do óleo essencial das partes aéreas de *M. frigidus* diante de bactérias Gram-positivas e negativas. As linhagens testadas incluíram *Staphylococcus aureus* ATCC® 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 15442, *Salmonella enterica* sorovar *Typhimurium* ATCC® 13311, *Shigella sonnei* ATCC® 11060, *Klebsiella pneumoniae* ATCC® 13866, *Escherichia coli* ATCC® 10536, *Bacillus cereus* ATCC® 11778, *Micrococcus luteus* ATCC® 10054, *Enterococcus faecalis* ATCC® 51299, *Enterobacter*

cloacae ATCC® 10699 e *Streptococcus pyogenes* ATCC® 10096. Como resultado, apresentou efeito antibacteriano moderado, principalmente devido à lipofilicidade dos constituintes do óleo.

O extrato em hexano das partes aéreas e suas frações foram avaliados por Fabri (2008) e Fabri et al (2009; 2014a) quanto à atividade antibacteriana frente a *S. aureus* ATCC® 6538, *P. aeruginosa* ATCC® 15442, *E. coli* ATCC® 10536, *S. dysenteriae* ATCC® 13313, *S. enterica* sorovar *Typhimurium* ATCC® 13311, *E. cloacae* ATCC® 10699, *S. sonnei* ATCC® 11060, *K. pneumoniae* ATCC® 13866, *B. cereus* ATCC® 11778, *M. luteus* ATCC® 10054, *E. faecalis* ATCC® 51299 e *S. pyogenes* ATCC® 10096. Como resultado, demonstraram importante atividade antibacteriana, sendo alguns dos valores superiores ao do controle positivo utilizado (Cloranfenicol). Revelou também promissores percentuais de atividade antimicrobiana e valores do ISM. De forma geral, possuem amplo espectro de ação diante de bactérias Gram-negativas (FABRI, 2008; FABRI et al., 2009; 2014a).

Já o extrato em diclorometano e suas frações, avaliados quanto à atividade antibacteriana diante das linhagens *S. aureus* ATCC® 6538, *P. aeruginosa* ATCC® 15442, *S. enterica* sorovar *Typhimurium* ATCC® 13311, *S. sonnei* ATCC® 11060, *K. pneumoniae* ATCC® 13866, *E. coli* ATCC® 10536, *B. cereus* ATCC® 11778, *M. luteus* ATCC® 10054, *E. faecalis* ATCC® 51299, *E. cloacae* ATCC® 10699 e *S. pyogenes* ATCC® 10096 apresentaram atividade contra todas as linhagens testadas e alguns obtiveram ação superior ao do controle positivo (Cloranfenicol). Revelaram ainda promissores valores de atividade total, ISM e percentual de atividade antimicrobiana. Dessa forma, assim como o extrato em hexano das partes aéreas e suas frações, também possuem amplo espectro de ação antibacteriana, tanto diante de bactérias Gram-negativas, quanto de positivas (FABRI, 2008; FABRI et al., 2009; 2020). A atividade antibacteriana também foi testada para a fração em acetato de etila e butanólica pelos mesmos autores perante os mesmos microrganismos do extrato em diclorometano e suas frações. Os resultados mostraram que a fração em acetato de etila apresentou atividade antibacteriana contra *S. pyogenes*, *S. sonnei* e *B. cereus*. Já a fração butanólica apresentou atividade apenas contra *E. cloacae* (FABRI, 2008; FABRI et al., 2009).

O extrato metanólico das partes aéreas de *M. frigidus* (MFM) foi avaliado por Fabri (2008), Fabri et al (2009), Campos (2017) e Campos et al (2019), quanto à atividade antibacteriana frente a *S. aureus* ATCC® 6538, *P. aeruginosa* ATCC® 15442,

S. enterica sorovar *Typhimurium* ATCC® 13311, *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar *Enteritidis* 1428260, *S. sonnei* ATCC® 11060, *K. pneumoniae* ATCC® 13866, *E. coli* ATCC® 10536, *B. cereus* ATCC® 11778, *M. luteus* ATCC® 10054, *E. faecalis* ATCC® 51299, *E. cloacae* ATCC® 10699 e

S. pyogenes ATCC® 10096. Como resultado, MFM mostrou expressiva ação antibacteriana, pois foi ativo para todas as linhagens testadas e exibiu os maiores halos de inibição. Revelou também promissores valores de atividade total e ISM, logo, também possui ação em amplo espectro contra bactérias Gram- negativas e positivas (FABRI, 2008; FABRI et al., 2009).

Além disso, mostrou efeito bacteriostático e capacidade de reduzir a densidade celular; inibiu o crescimento celular; reduziu a curva de crescimento (prolongamento da fase lag); promoveu mudanças na permeabilidade de membrana externa (sinergismo com eritromicina), com efeito aditivo e sinérgico quando associado ao cloranfenicol; além de promover o extravasamento de nucleotídeos e alterações morfológicas na superfície da célula (danificada/ondulada/pontos de ruptura) (CAMPOS, 2017; CAMPOS et al., 2019).

De acordo com os ensaios antibiofilme MFM também se mostrou promissor. Apresentou atividade sobre o biofilme pré-estabelecido, promovendo a redução da área proporcional ocupada por biofilme em lamelas, do número de células viáveis e do conteúdo de matriz exopolissacarídica (principalmente proteínas) (CAMPOS, 2017; CAMPOS et al., 2019).

Com relação aos trabalhos de Fabri et al (2012a) e Lemos et al (2018), foi analisada a atividade antibacteriana da psicorubrina frente a, *S. aureus* ATCC® 6538, ATCC® 25923, ATCC® 33591 e ATCC® 33592, *P. aeruginosa* ATCC® 15442 e ATCC® 9027, *S. enterica* sorovar Typhimurium ATCC® 13311, *S. sonnei* ATCC® 11060, *K. pneumoniae* ATCC® 13866 e ATCC® 4532, *E. coli* ATCC® 10536, *B. cereus* ATCC® 11778 e *S. pyogenes* ATCC® 10096. O estudo de Fabri et al (2012a), mostrou que a psicorubrina não apresentou atividade antibacteriana significativa diante das linhagens testadas. Contudo, Lemos et al (2018), evidenciou que o composto apresentou um amplo espectro de atividade antibacteriana, com clara eficácia contra bactérias Gram- negativas e positivas; ação superior à Ciprofloxacina e inferior ao Cloranfenicol; não afetou a curva de crescimento bacteriano; promoveu a diminuição do crescimento (dependente de dose) e da densidade celular, com efeito bactericida; aumentou a morte

celular e liberação de nucleotídeos (desestabilização da membrana), além de possuir ação aditiva e sinérgica quando associado ao Cloranfenicol.

Já os estudos em biofilmes evidenciaram que a psicorubrina inibe os biofilmes pré-formados; diminui a adesão; reduz os biofilmes e o conteúdo de carboidratos e proteínas (inibe a síntese do exopolissacarídeo); e por fim, afeta a parede celular (irregular/distorcida) (LEMOS et al., 2018).

4.2.2 Antiparasitária

As parasitoses são doenças tropicais e subtropicais com distribuição mundial (endêmica) causada por protozoários e/ou helmintos. Ademais, são consideradas problemas de saúde pública pela Organização Mundial da Saúde (OMS), e também apresentam manifestações com diferentes graus de severidade. Na maioria das vezes, trata-se de doenças que são negligenciadas. Poucas drogas atualmente estão disponíveis para o tratamento. Além do mais, o desenvolvimento da resistência a esses medicamentos é crescente e preocupante, associado ao baixo investimento pelas indústrias farmacêuticas, o que torna de extrema importância a descoberta e o desenvolvimento de novos medicamentos. Dessa forma, as plantas são relevantes na busca por novas drogas (TORRES-GUERRERO et al., 2017; DE PAULA et al., 2019; ROATT et al., 2020).

Fabri et al (2014c), investigaram a atividade esquistossomicida de MFM em três concentrações (100, 200 e 400 µg/mL), por meio de testes in vitro e in vivo em camundongos infectados com *S. mansoni*; parâmetros hematológicos, bioquímicos, histológicos e parasitológicos (SMITHERS e TERRY, 1965; ARAÚJO et al., 2008). Os resultados revelaram que no teste in vitro, MFM em todas as concentrações foi capaz de paralisar completamente os vermes com perda de movimento das ventosas, escurecimento do tegumento e diversas alterações morfológicas, consequentemente, morte de todos os parasitas; diferente do controle, no qual, os vermes continuaram acasalando e mostrando movimentos ativos, sem lesões no tegumento, com presença de ovos no meio de cultura. Por outro lado, no experimento in vivo, utilizou MFM na concentração de 100 e 300 mg/Kg e praziquantel 200 mg/Kg (controle positivo) e concluiu que o mesmo reduziu o peso do baço e fígado, diferente do controle negativo, e também, reduziu significativamente a densidade do granuloma, assim como o praziquantel.

A avaliação hematológica e bioquímica das amostras de sangue do teste in vivo mostraram que os animais infectados e tratados, quando comparados com o controle negativo, diminuíram significativamente a contagem total de leucócitos; aumentaram a contagem de neutrófilos e diminuíram a dos eosinófilos e monócitos; menor teor de proteína total, o

que pode ser devido ao dano hepático da infecção; aumento significativo do nível de globulina, que pode ser em virtude do mecanismo responsivo (MFM 100 mg/Kg); níveis de albumina e relação A/G normais, no entanto inferior ao controle positivo; níveis menores de AST, ALT e ALP (redução do granuloma hepático e fibrose). Já na análise histológica, observou-se um foco de células mononucleares e polimorfonucleares ao redor do ovo, as camadas laminadas de tecido conjuntivo fibroso quase desapareceram, não houve necrose dos hepatócitos, alterações microvasculares foram mínimas nas seções do fígado desses animais (FABRI et al., 2014c).

Sob a perspectiva parasitológica, MFM em ambas as concentrações reduziu a contagem total de vermes (69 e 58%, respectivamente), da mesma forma que o grupo de referência tratado com praziquantel (49%), quando em comparação com o grupo controle; e também, reduziu a carga parasitária no fígado e mesentério até 91 e 65% em 100 mg/Kg e por 65 e 58% a 300 mg/Kg, respectivamente. O praziquantel reduziu a carga parasitária no fígado e mesentério em 48 e 51%, nesta ordem. Em adição, a atividade esquistossomicida se deve aos compostos identificados no presente estudo, são eles, Kaempferol-O- rutinosídeo, rutina, Kaempferol, psicorubrina e ácido ursólico devido a relatos e estudo da literatura (FABRI et al., 2014c).

Mitracarpus frigidus também se mostrou promissor frente à parasitas do gênero *Leishmania* spp. Além disso, é a única planta do gênero com relatos de atividade leishmanicida na literatura (FABRI, 2008; FABRI et al., 2009; 2012ab; 2014ad; 2020; EKALU, 2021). O estudo de Fabri et al (2009), avaliou a atividade leishmanicida de frações de polaridades crescentes (hexano, diclorometano, acetato de etila, butanol e hidrometanólica) das partes aéreas de *M. frigidus*, frente a parasitas na forma promastigota que foram isolados clinicamente: *L. amazonensis* (MHOM/Br/75/Josefa) e *L. chagasi* (MHOM/Br/74/PP75) (M'BONGO et al., 1997; BRAGA et al., 2007). Já Fabri (2008) e Fabri et al (2020), avaliaram o extrato bruto (MFD) e suas 20 frações nas mesmas condições supracitadas. Os resultados revelaram que frente a *L. amazonensis*, as frações hidrometanólica ($9,0 \pm 2,3 \mu\text{g/mL}$), diclorometânica ($11,8 \pm 1,2 \mu\text{g/mL}$), MFD6 ($4,0 \pm 0,5 \mu\text{g/mL}$), MFD7p ($3,0 \pm 0,5 \mu\text{g/mL}$) e MFD11 ($9,0 \pm 0,7 \mu\text{g/mL}$) foram as mais ativas. Já frente a *L. chagasi*, destacou-se a fração

diclorometânica ($6,71 \pm 5,9 \mu\text{g/mL}$), hexânica ($14,84 \pm 1,09 \mu\text{g/mL}$), MFD ($7,0 \pm 0,6 \mu\text{g/mL}$), MFD6 ($5,0 \pm 0,4 \mu\text{g/mL}$) e MFD7p ($11,0 \pm 0,6 \mu\text{g/mL}$). Além disso, o extrato bruto, as frações em acetato de etila e hidrometanólica, MFD12 a MFD16 foram ativas apenas para *L. amazonensis*, já MFD5 foi ativa apenas para *L. chagasi*. E também, nenhuma das amostras testadas obteve atividade superior aos controles positivos (Anfotericina B e Timol). Vale destacar que, as atividades de MFD6 e MFD7p estão relacionadas com a composição química, presença de triterpenos, flavonoides e alcaloides com atividades já descritas na literatura (FABRI, 2009; FABRI et al., 2020).

Ainda acerca da atividade leishmanicida, Fabri et al (2014ad), analisaram o extrato hexânico e as suas nove frações das partes aéreas de *M. frigidus*, e também, dois compostos isolados do mesmo extrato, o ácido ursólico e ursolato de metila, respectivamente, contra *L. amazonensis* (IFLA/Br/67/PH8), *L. major* (MRHO/SU/59/P), *L.*

braziliensis (MHOM/Br/75/M2903) e *L. chagasi* (MHOM/Br/74/PP75). Vale ressaltar que, investigaram no primeiro estudo as duas formas, amastigotas e as promastigotas, já no segundo estudo apenas as promastigotas (BRAGA et al., 2007). Como resultado, o extrato bruto e a fração MFH9 revelaram promissora atividade frente às quatro espécies. Além disso, MFH1, MFH6, MFH7 e MFH8 também se destacaram frente a alguns parasitas. As espécies mais sensíveis ao extrato e frações foram *L. major* e *L. braziliensis*, respectivamente. Em adição, todas as amostras testadas para a forma amastigota evidenciaram efeitos leishmanicida significativos, com destaque para a fração MFH7 ($1,3 \pm 0,2 \mu\text{g/mL}$). Em adição, ambos compostos se destacaram frente a espécie *L. major* tanto para a forma promastigota, quanto para a amastigota. Para todas as espécies na forma promastigota, os resultados de ursolato de metila foram superiores ao do ácido ursólico, acredita-se que se deve a maior lipofilicidade do ursolato de metila.

O óleo essencial das partes aéreas de *M. frigidus* também foi avaliado por Fabri et al (2012b), e exibiu atividade frente às formas promastigotas de três espécies de *Leishmania* spp.: *L. chagasi* (MHOM/Br/74/PP75), *L. amazonensis* (MHOM/Br/75/Josefa) e *L. major* (MRHO/SU/ 59/P) através do método descrito por Braga et al (2007). Os resultados mais expressivos foram para as formas promastigotas de *L. major* ($\text{CI}_{50} = 47,2 \pm 4,0 \mu\text{g/mL}$) e *L. amazonensis* ($\text{CI}_{50} = 89,7 \pm 8,6 \mu\text{g/mL}$). Na concentração de $108 \mu\text{g/mL}$ do óleo essencial, as formas foram suscetíveis a 97 e 86%, respectivamente. E também, *L. major* apresentou maior relação dose-dependente.

Além disso, para nenhuma das espécies testadas, o óleo essencial não obteve resultados superiores ao do controle positivo (Anfotericina B).

E por fim, Fabri et al (2012a), avaliou a atividade antileishmania de psicorubrina, isolada do extrato em diclorometano de *M. frigidus*, frente às formas promastigotas de

L. amazonensis (IFLA/Br/67/PH8), *L. major* (MRHO/SU/59/P), *L. braziliensis* (MHOM/Br/75/M2903) e *L. chagasi* (MHOM/Br/74/PP75) (M'BONGO et al., 1997; BRAGA et al., 2007). A partir dos ensaios, obteve promissora atividade leishmanicida para as quatro espécies, e também, com valores de CI50 acima de 3 µM. Além disso, tal composto (1,7 µM) obteve resultado bem semelhante ao do controle positivo Anfotericina B (1,9 µM) para a espécie de *L. chagasi*.

Dessa forma, *M. frigidus* é uma potencial espécie para o tratamento da esquistossomose, pois diminuiu consideravelmente a gravidade da doença, bem como, a carga parasitária sem alterar a função hepática. Além disso, também possui ação leishmanicida contra as espécies *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. chagasi* e *L. major* e é uma importante fonte terapêutica já que há uma resistência dos parasitas às drogas convencionais, pelo fato da leishmaniose ser uma doença negligenciada que afeta a população a nível mundial. Além disso, tratamentos derivados dessa planta podem amenizar e reduzir os efeitos colaterais por agirem seletivamente nas células dos parasitas.

4.2.3 Antioxidante

O estresse oxidativo é uma condição de desequilíbrio que resulta na incapacidade do organismo em neutralizar radicais livres, levando à situações patológicas como algumas doenças metabólicas, determinados tipos de câncer, bem como o envelhecimento precoce (CONRAD et al., 2018; PHANIENDRA, JESTADI e PERIYASAMY, 2015). As substâncias antioxidantes, por sua vez, são aquelas que possuem a capacidade de agir nas reações oxidativas, dificultando ou desacelerando a oxidação das moléculas (CRUZ, 2014). A presença de antioxidantes naturais nas plantas têm despertado grande interesse, dentre eles, pode-se destacar os flavonoides, compostos fenólicos, compostos contendo enxofre, taninos, alcaloides, diterpenos fenólicos e vitaminas (YASHIN et al., 2017). Ao longo dos estudos, *M. frigidus* apresentou potencial promissor para atividade antioxidante, que foi associado a sua constituição fitoquímica, principalmente a presença de

compostos fenólicos (FABRI et al., 2009; 2012b; CUNHA, 2017; FERREIRA et al., 2021).

A capacidade do extrato bruto, óleo essencial e frações das partes aéreas de *M. frigidus*, em doar prótons como mecanismo antioxidante foi investigada por meio dos ensaios de sequestro do radical livre DPPH e do poder de redução. Neste sentido, as frações diclorometânica, acetato de etila, butanólica e hidrometanólica, revelaram potencial promissor para as atividades testadas, sendo que a fração em acetato de etila foi a mais eficiente, com maior capacidade de reduzir o radical DPPH (CI50 de 6,9 µg/mL) (FABRI et al., 2009). O óleo essencial, por sua vez, apresentou potencial de redução moderado para este radical (CI50 de 38 ± 8 µg/mL) (FABRI et al., 2012b). Os autores pressupõem que, uma das substâncias responsáveis pela atividade do óleo essencial seja o salicilato de metila, anteriormente detectado por meio de CG/EM (FABRI et al., 2012b). O extrato metanólico das partes aéreas de *M. frigidus* e suas partições de polaridade crescente (hexano - PHC, diclorometano - PDC, acetato de etila - PAC e hidroalcoólica - PAGC) também exibiram um relevante potencial redutor, sendo PAC e PAGC, os extratos com melhor atividade para a redução do radical DPPH (CI50= 2,15 ± 0,20 e 6,90 ± 0,75 µg/mL, respectivamente) (CUNHA, 2017; FERREIRA et al., 2021). Segundo os autores, a propriedade redox das amostras pode estar associada a presença de fenóis e flavonoides nos extratos, já que ambos os testes demonstraram uma correlação positiva com estes compostos (FABRI et al., 2009; CUNHA, 2017; FERREIRA et al., 2021).

A atividade antioxidante total do extrato metanólico e frações, também foi avaliada. Através do método de poder de redução do complexo fosfomolibdênio, foi medida a porcentagem antioxidante relativa aos padrões rutina, quercetina e ácido ascórbico. Desta forma, o extrato metanólico obteve resultados significativos (%AAR= 10,38 ± 0,37%; %AAR= 33,80 ± 5,88% e %AAR= 51,52 ± 1,66%, respectivamente) (CUNHA, 2017). As frações do extrato metanólico, no entanto, foram mais eficientes em reduzir o complexo fosfomolibdênio. Todas as frações apresentaram atividade antioxidante relativa a quercetina superior a 100%, destacando-se PAC e PAGC. PAC apresentou a maior atividade antioxidante relativa à rutina e quercetina (%AAR ácido ascórbico= 45,71 ± 3,74; %AAR quercetina= 312,72 ± 25,59; %AAR rutina= 120,35 ± 9,85). Enquanto PAGC, obteve a maior atividade relativa ao ácido ascórbico (%AAR ácido ascórbico= 85,50 ± 3,01; %AAR quercetina= 222,16 ± 7,82 e %AAR rutina= 32,47 ± 1,14) (FERREIRA et al., 2021).

A fim de avaliar o perfil de inibição da peroxidação lipídica para MFM, os autores realizaram o método de oxidação do sistema β-caroteno/ácido linoleico para o extrato metanólico e frações das partes aéreas de *Mitracarpus frigidus*. Os resultados obtidos demonstraram que MFM inibiu 45,10 ± 1,79% da oxidação do ácido linoleico. Além disso, a curva

de decaimento do extrato apresentou inclinação semelhante à rotina (controle positivo), com proteção do sistema contra oxidação, durante todo o teste. Dessa forma, é possível dizer que MFM promove o bloqueio da peroxidação lipídica. Quanto à eficiência antioxidante, MFM foi eficiente apenas na etapa de reação em cadeia para formação de peróxidos ($F1 = 0,49 \pm 0,04$), mas não participa de outras reações durante o processo oxidativo ($F2 = 1,34 \pm 0,01$). Assim, age no processo inicial da oxidação (CUNHA, 2017).

Em relação às frações de MFM, PAC ($70,31 \pm 0,48\%$) e PDC ($57,06 \pm 6,74\%$) foram tão eficientes quanto aos padrões rotina ($53,47 \pm 1,07\%$) e quercetina ($57,51 \pm 2,45\%$) em inibir a oxidação do ácido linoleico, sem diferença estatística ($p < 0,05$). Para a curva de decaimento, todas as amostras testadas apresentaram perfil de decaimento significativamente diferente do controle negativo. Além disso, PHC e PDC apresentaram uma curva similar à rotina, enquanto PAC apresentou menor decaimento em relação aos controles positivos até 75 minutos. Portanto, pode-se dizer que as frações são potencialmente capazes de retardar/inibir a reação de oxidação do β -caroteno, induzida pelos produtos de degradação oxidativa do ácido linoleico. No que diz respeito à eficiência antioxidante, todas as partições apresentaram valores significativos para $F1$, sendo estatisticamente semelhante a rotina ($p < 0,05$) ($F1 = 0,52 \pm 0,04$), portanto, foram capazes de bloquear a reação em cadeia por meio da interação com os radicais peróxilas. As amostras também foram ativas para a segunda fase da peroxidação lipídica, exceto PDC e PAC, além disso, PAGC foi a fração mais eficiente em inibir outras reações da oxidação ($F2 = 0,63 \pm 0,15$) (FERREIRA et al., 2021).

4.2.4 Anti-inflamatória

A inflamação é uma resposta específica da microcirculação a lesão dos tecidos, possui cinco características (rubor, calor, edema, dor e prejuízo funcional), e também, pode ser classificada em diferentes fases: fase inicial (aguda) ou fase proliferativa (crônica). Além disso, pode levar a uma cascata de

reações bioquímicas. Para o tratamento das inflamações, atualmente, utiliza-se de anti-inflamatórios não esteroidais (inibidores específicos ou não da COX) e glicocorticóides, mais utilizados nas inflamações crônicas. Entretanto, os anti-inflamatórios naturais surgem como uma alternativa, devido ao forte componente natural e cultural, além de possuírem menos efeitos colaterais e máximo de eficácia oriundo dos fitocompostos (SANTOS, 2019; RAMOS et al., 2020).

Nesse âmbito, Fabri et al (2014b), avaliou a atividade anti-inflamatória de MFM em modelo in vivo através dos ensaios de edema de pata de rato induzido por carragenina (MFM testada oralmente); determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS); atividade da enzima catalase; ensaio da atividade da ciclooxigenase (COX); peritonite em camundongos induzida por carragenina (MFM testada oralmente); edema de ouvido induzido por óleo de cróton (MFM testada oralmente e topicamente); ensaio da mieloperoxidase; edema de orelha induzido por etilfenilpropionato (EPP) (MFM testada oralmente e topicamente); granuloma de esfera de algodão (MFM testada oralmente); e por fim, a estimativa do malondialdeído plasmático. Esse estudo é o primeiro relato desses ensaios anti-inflamatórios sobre o extrato metanólico de *M. frigidus* (WINTER, RISLEY e NUSS, 1962; NAIK, AGSHIKAR e ABRAHAM, 1980; BRADLEY et al., 1982; BRATTSAND et al., 1982; AEBI, 1984; GRISWOLD et al., 1987; NAKHAI et al., 2007; ROCHA et al., 2008).

Os resultados obtidos revelaram que o extrato (100 e 300 mg/Kg) reduziu o volume do edema em relação ao veículo significativamente, como também, agiu semelhante a dexametasona e indometacina (controles positivos). Além disso, houve uma diminuição da porcentagem máxima de inibição, com o aumento da concentração do extrato (de 55 para 47%). Em adição, os níveis de MDA e a atividade da catalase foram reduzidos em ambas as concentrações do extrato, devido a redução do estresse oxidativo e inibição da inflamação, respectivamente. Já em relação a COX e as isoformas, os valores obtidos revelam que o extrato age equivalente a indometacina, assim, MFM reduziu de forma expressiva a expressão total de COX, além de, mostrarem porcentagem relativa de inibição de COX-2 ($54 \pm 1,0$ e $55 \pm 1,2\%$, respectivamente), sugerindo ação seletiva para a mesma. Além do mais, na concentração de 300 mg/Kg, o extrato agiu in vivo, semelhante a dexametasona (FABRI et al., 2014b).

Ainda, o extrato inibiu a migração peritoneal de leucócitos em ambas as concentrações de MFM na peritonite induzida por carragenina, como também, exibiu a capacidade de diminuir a migração de neutrófilos e amenizou a cascata ativada após ação da carragenina. Os ensaios de edema de orelha induzidos por óleo de cróton e por EPP evidenciaram que o extrato tem ação oral e tópica semelhante aos controles positivos. O ensaio de mieloperoxidase e o índice de infiltração de

neutrófilos em tecidos de inflamação também demonstraram que MFM é capaz de reduzir a atividade da enzima de forma relevante em relação ao controle negativo (FABRI et al., 2014b).

Posteriormente, o experimento do granuloma induzido por esfera de algodão demonstrou que o extrato possui ação em ambas as concentrações, inibição de 19 em MFM 100 mg/Kg, 25 em MFM 300 mg/Kg e 50% para dexametasona. Já após secagem, a inibição foi igual a 20, 28 e 48 %, respectivamente. Houve redução dos níveis de MDA devido a ação antilipoperoxidativa do extrato, porém não exibiu forte ação frente ao estresse oxidativo. Além disso, um ponto promissor foi que não foi evidenciado qualquer distúrbio gástrico nos animais tratados com o extrato metanólico. Em contrapartida, os controles positivos evidenciaram: mortes, hematúria e melena para indometacina, e perda de peso para dexametasona. Por fim, os autores acreditam que o potencial antioxidante do extrato se deve à presença de fitoconstituintes identificados no estudo, são eles: Kaempferol, rutina e ácido ursólico, pelo fato de estarem envolvidos na atividade anti-inflamatória e antioxidante e seus potenciais já terem sido relatados na literatura (FABRI et al., 2014b).

Outro estudo da espécie sobre a atividade anti- inflamatória foi o de Fabri et al (2014d), no qual avaliou de forma in vivo a ação do ácido ursólico e ursolato de metila (compostos isolados do extrato hexânico das partes aéreas de *M. frigidus*). Foram realizados ensaios, como, o edema de pata de rato induzido por carragenina, determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), atividade da enzima catalase e peritonite em camundongos induzida por carragenina (WINTER, RISLEY e NUSS, 1962; AEBI, 1984; GRISWOLD et al., 1987; NAKHAI et al., 2007). Este estudo foi pioneiro na identificação desses compostos, e também no estudo da ação anti-inflamatória do ursolato de metila e no relato de atividade anti-inflamatória in vivo em baixas concentrações (0,5 mg/Kg) para o ácido ursólico. Os resultados demonstraram que houve diminuição significativa dos níveis de MDA, ou seja, redução do estresse oxidativo; e também, os compostos foram capazes de reduzir a atividade da catalase no processo inflamatório induzido por carragenina.

Além disso, os fitocompostos diminuem o edema de pata, sendo que a porcentagem máxima foi 30 minutos após a formação do edema, com resultados superiores aos controles positivos utilizados (dexametasona e indometacina). Em relação ao efeito anti-inflamatório, o ácido ursólico destacou-se, uma vez que, inibiu cerca de 80 a 90% do edema durante todo o ensaio. Já no modelo bifásico, ambos compostos agiram semelhante aos controles positivos utilizados tanto na fase inicial, quanto na máxima. Foi observado ação na fase inicial apenas, do ursolato de metila na concentração de 0,5 mg/Kg após três horas, inibindo os mediadores de inflamação. Além do mais, os compostos diminuem a migração peritoneal de leucócitos. Por último, o ácido ursólico exibiu atividade anti-inflamatória superior ao ursolato de metila, pois diminuiu significativamente a migração de leucócitos e neutrófilos em ambas as concentrações testadas, em especial exibiu grande potencial na inibição na concentração de 0,5 mg/Kg (FABRI et al., 2014d).

A fim de avaliar a atividade anti-inflamatória de MFM, Cunha (2017), realizou ensaios de avaliação da produção de óxido nítrico (NO) e atividade de metaloproteinases pelo método BCA (SILVA et al., 2017). Assim, os valores obtidos nos experimentos revelaram que MFM na concentração de 25 µg/mL exibiu potente redução do NO ($13,3 \pm 1,5$ µM). Logo, o extrato controla a inflamação e a lesão tecidual. Em contrapartida, a atividade da metaloproteinase foi analisada por zimografia em eletroforese em gel de poliacrilamida com gelatina e evidenciou que, com o aumento da concentração de MFM, houve uma maior redução da atividade de MMP-9, e também, que MFM não inibiu a atividade de MMP-2.

Estudos mais recentes também avaliaram a atividade anti-inflamatória de MFM, como o de Fabri et al (2021), que investigou pela primeira vez o potencial das defesas antioxidantes no processo de inflamação aguda in vivo, nos tecidos do fígado em infecções por *Salmonella* sp., no qual realizou a determinação de malondialdeído, atividade da catalase e atividade de metaloproteinases por meio de análise de zimogramas (AEBI, 1984; NAKHAI et al., 2007; LEE et al., 2009). A partir dos experimentos, concluiu-se que o extrato tem a capacidade de reduzir os níveis de MDA e de catalases nos animais tratados com a mesma, além de auxiliar no tratamento da inflamação da salmonelose. Em adição, MFM foi capaz de reduzir o estresse oxidativo e inibir o processo inflamatório. Além disso, o extrato é capaz de diminuir as atividades das metaloproteinases MMP-2 e MMP-9 in vivo. Por fim, os autores pressupõem que o mecanismo de ação envolvido pode estar correlacionado com os fitocompostos identificados e à diminuição da expressão do gene da ciclooxigenase (COX), em especial a COX-2, uma vez que, as alterações hematológicas observadas no estudo, podem ter sido causadas pela mesma.

Dessa forma, pode-se concluir que *M. frigidus* é uma planta promissora

no que diz respeito a atividade anti- inflamatória, tanto em ensaios *in vitro*, quanto *in vivo*. Além disso, vale ressaltar que, alguns mecanismos já foram inicialmente elucidados, bem como, alguns compostos responsáveis foram isolados e identificados.

4.2.5 Antitumoral

O câncer é uma doença genética complexa, de caráter crônico, caracterizada pelo crescimento celular desordenado, invasão de tecidos e metástase, além de se apresentar como um importante problema de saúde pública, devido a sua magnitude epidemiológica, social e econômica. Visto que, atualmente, o câncer e as neoplasias são responsáveis por mais de 70% dos óbitos, o desenvolvimento de pesquisas a partir de extratos e compostos vegetais tem se tornado relevante para a obtenção de fármacos antitumorais mais efetivos (COSTA e CAVALCANTE, 2018; DUARTE et al., 2021).

Acerca da atividade antitumoral, Fabri et al (2012ca), avaliaram o potencial do extrato metanólico de *Mitracarpus frigidus* (MFM) e da psicorubrina (composto isolado do extrato em diclorometano das partes aéreas de *M. frigidus*), respectivamente, por meio dos ensaios de avaliação do efeito citotóxico contra linhas de células humanas tumorais (Jurkat, HL60 e MCF-7), utilizando MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2- il]-2,5- difeniltetrazolium) e o ensaio de fragmentação de DNA, seguindo o protocolo proposto por Mosmann (1983) e Nicoletti et al (1991).

Como resultado, MFM foi citotóxico apenas para as linhagens HL60 (89% de inibição do crescimento) e Jurkat (83% de inibição do crescimento), com valores semelhantes ao Etoposídeo (medicamento de referência), e o extrato não induziu um aumento da fragmentação de DNA para as duas linhagens supracitadas, quando comparadas ao controle negativo. Portanto, MFM induziu morte celular não apoptótica, geralmente atribuída à autofagia, pois reduziu a viabilidade celular e induziu o nível de fragmentação superior ao controle positivo (FABRI et al., 2012c).

Já a psicorubrina, demonstrou ser tóxica para as células HL60 e Jurkat, e tumores sólidos, tais como câncer de mama (MCF-7), sendo que, para a linhagem MCF-7, o composto

revelou ação significativa (CI50= 1,1 µM), superando o controle positivo (Etoposídeo) (CI50 >50 µM). Além disso, a psicorubrina induziu o aumento da fragmentação de DNA em células de HL60 e MCF-7 quando comparada ao controle negativo, exibindo efeito celular tipo dependente, bem como, demonstrou um potencial pró-apoptose melhor do que o controle negativo (Psicorubrina= 43 µM; Etoposídeo= 14 µM). Logo, os autores acreditam que o composto atua a via da apoptose (FABRI et al., 2012a).

Por último, Fabri et al (2014d), avaliou a atividade antitumoral dos compostos ácido ursólico e ursolato de metila frente à quatro linhagens celulares (Jurkat, HL60, MCF-7 e HCT), a partir dos ensaios de avaliação do efeito citotóxico contra linhas de células humanas tumorais (MTT); fragmentação de DNA e citotoxicidade contra células de mamíferos, conforme os métodos de Mosmann (1983), Nicoletti et al (1991) e Carmo et al (2011).

De acordo com o resultado, o ácido ursólico mostrou-se ativo para todas as linhagens testadas (DE50= 4,2 a 35,7 µg/mL), com destaque para a linhagem Jurkat, na qual o composto obteve ação próxima ao controle positivo. Em contrapartida, o ursolato de metila (DE50= 22,7 µg/mL) foi ativo apenas para a linhagem HL60. Além disso, ambos compostos aumentaram a fragmentação de DNA em todas as linhagens quando comparados ao controle negativo, o que sugere a ação de tais compostos na via de apoptose (FABRI et al., 2014d).

Dessa forma, os estudos apresentados aqui, demonstram relevância para as futuras terapias antitumorais com enfoque na morte celular.

4.2.6 Citotóxica

O uso de plantas medicinais para o tratamento de doenças e males sempre esteve presente em diversas culturas e populações, porém muitas plantas não possuem seus efeitos colaterais ou tóxicos descritos na literatura. A presença de alguns compostos naturais em extratos pode apresentar toxicidade ao usuário e ao meio ambiente, logo, estudos de toxicidade são imprescindíveis, pois estabelecem a atividade tóxica de metabólitos isolados e extratos de plantas, podendo revelar o tempo e/ou a concentração em que o material em estudo é potencialmente prejudicial ou benéfico à saúde. As pesquisas científicas que avaliam a citotoxicidade devem preceder a eficácia e viabilidade de um composto para a produção de um medicamento seguro (MORENO et al., 2018; DE FREITAS et al., 2019; DA HORA, 2020; DA COSTA et al., 2022).

Nesse contexto, Fabri (2008) e Fabri et al (2012b; 2020), avaliaram a atividade citotóxica frente à *Artemia salina* para o extrato bruto de MFM e suas partições (1000, 100 e 10 µg/mL), para o óleo essencial de *M. frigidus* (10 a 1000 µg/mL) e para o extrato diclorometano (MFD) e suas 20 frações (MFD1 a MFD20) (1000, 500, 250, 100 e 10 µg/mL), conforme os protocolos propostos por Meyer et al (1982), e modificada por Afonso-Neto (2003).

Como resultados, o extrato bruto de MFM e as partições, hexânica e diclorometânica, foram citotóxicas frente à *A. salina* (LC50 de 127, 61 e 111 µg/mL, respectivamente), sendo também considerável a citotoxicidade das frações diclorometânica (CH2Cl2: F2, F3, F5, F6, F7) (LC50 ≤ 20 µg/mL). O óleo essencial de *M. frigidus* apresentou citotoxicidade moderada frente à *A. salina* (LC50 de 88 ± 10 µg/mL), em comparação ao controle positivo (Timol: LC50 de 1,4 ± 0,7 µg/mL). As frações MFD2, MFD3, MFD5 a MFD7p do extrato MFD também apresentaram citotoxicidade significativa (LC50 ≤ 20 µg/mL) (FABRI, 2008; FABRI et al., 2012b; 2020).

Outro teste citotóxico realizado por Fabri et al (2009), Fabri et al (2014ad) e Cunha (2017) para *M. frigidus*, foi o ensaio de MTT contra células de mamíferos, com o intuito de avaliar a especificidade frente às espécies de *Leishmania* sp. Foram testados o extrato bruto de MFM e suas frações (15 a 250 µg/mL); o extrato hexânico (MFH) e suas nove frações (MFH1 a MFH9) (150 a 15 µg/mL); bem como o ácido ursólico e ursolato de metila (125 a 7,5 µg/mL) isolados do extrato hexano, de acordo com o método de Mosmann (1983) e Carmo et al (2011).

Em conformidade com os resultados, o extrato bruto de MFM e a fração diclorometânica apresentaram toxicidade contra as células de mamíferos (CI50 de 130 e 31 µg/mL, respectivamente) (FABRI et al., 2009). Em contrapartida, apesar de MFH ter apresentado alguma toxicidade contra células de mamíferos, suas frações MFH7 e MFH8 foram 15,6 e 17,9 vezes mais seletivas para o parasita intracelular do que às células do hospedeiro, respectivamente, com especificidade para as formas amastigotas. A citotoxicidade do MFH foi diferente do encontrado por Fabri et al (2009), que detectou CC50 de 18,2 µg/mL, logo não apresentou toxicidade. Tal fato, provavelmente ocorreu, visto que, utilizaram métodos diferentes para essa atividade (FABRI et al., 2014a). Apesar de uma certa citotoxicidade dos triterpenoides pentacíclicos frente às células de mamíferos, o ácido ursólico e

ursolato de metila foram 7,5 e 5,6 vezes mais seletivo para o parasita intracelular do que para as células hospedeiras, respectivamente, demonstrando especificidade para as formas amastigotas de *Leishmania* sp. (FABRI et al., 2014d). Com relação aos resultados de Cunha (2017), observou-se que MFM nas concentrações de 25 e 50 µg/mL resultaram na proliferação celular (119 ± 1 e 111 ± 4% de viabilidade celular, respectivamente). Já nas concentrações de 75 e 100 µg/mL, percebeu-se uma ligeira citotoxicidade, reduzindo a proliferação celular (80 ± 4% e 82 ± 5% de viabilidade celular, respectivamente). Dessa forma, o extrato não apresentou toxicidade significativa nas concentrações testadas (CUNHA, 2017).

Por último, Fabri et al (2012c), avaliou a atividade citotóxica in vivo do extrato MFM, a partir da toxicidade oral aguda, nas concentrações de 10, 100, 1000 e 2000 mg/Kg; bem como, a toxicidade subcrônica, na qual, os animais receberam MFM nas concentrações de 100, 300 e 1000 mg/Kg.

Quanto à toxicidade aguda, MFM apresentou baixa toxicidade, visto que, a dose letal mínima (DL50) de MFM para os animais foi superior a 2000 mg/Kg. Já a toxicidade subcrônica evidenciou um aumento no consumo de água nos grupos tratados com MFM, sendo diretamente proporcional à dose administrada. Por outro lado, os grupos tratados com MFM mostraram uma redução na ingestão de alimentos; e, houve uma diminuição significativa nos grupos tratados com MFM 300 e 1000 mg/Kg nas primeiras duas semanas, quando comparado ao grupo controle, porém, posteriormente, o ganho de peso corporal foi estabilizado para todos os grupos, e somente o peso do fígado dos animais tratados com MFM a 1000 mg/Kg apresentaram uma diferença significativa em relação ao grupo controle (FABRI et al., 2012c).

À vista disso, os estudos de perfil citotóxico aqui apresentados, são muito úteis para estudos futuros in vivo e clínico de *M. frigidus*, a fim de promover seu uso terapêutico de forma segura.

4.2.7 Atividade fotoprotetora

A exposição da pele à radiação ultravioleta (UV) emitida pelo sol é responsável por diversos processos patológicos, como o câncer de pele, além do envelhecimento precoce (HIRATA, SATO e SANTOS, 2004; DAMIANI et al.,

2006). O uso de filtros solares sintéticos, ao mesmo tempo que protege as células dos malefícios dos raios ultravioletas, podem causar toxicidade ou alergenidade ao indivíduo. Frente a essa informação, pesquisadores estudam alternativas para substituição ou redução da concentração dos filtros, de modo a amenizar esses efeitos nocivos (CUNHA, 2017). Dentre as alternativas, há um número significativo de pesquisas que relacionam os ativos vegetais como potenciais ativos fotoprotetores, já que, uma vez comprovado sua eficácia, podem potencializar a

fotoproteção de uma formulação (CARVALHO et al., 2015; FERREIRA et al., 2021). Neste sentido, *M. frigidus* demonstrou potencial promissor para atividade fotoprotetora, principalmente devido à presença de flavonóides (CUNHA, 2017; FERREIRA et al., 2021).

A atividade fotoprotetora do extrato metanólico e frações das partes aéreas de *M. frigidus*, foi avaliada pelo método de Mansur et al (1986). No caso de MFM, avaliou-se a atividade do extrato livre e incorporado a uma formulação “oil free” à base de silicone, onde foi possível testar a atividade do extrato em associação com um filtro solar hidrossolúvel UVA e UVB (Ácido-2-fenilbenzimidazol-5-sulfônico e ácido-2-hidróxi-4-metoxibenzofenona-5-sulfônico).

O extrato MFM apresentou maior absorbância que o filtro solar no intervalo da radiação UVA (320-400 nm), com picos em 220, 234, 304 e 316 nm, entretanto, nenhuma formulação apresentou FPS maior que seis, valor aceitável pela ANVISA para que um componente seja considerado fotoprotetor (ANVISA, 2012; CUNHA, 2017). Em relação às partições, a PAC (100 µg/mL) foi a única a apresentar atividade fotoprotetora, com FPS= 12,11, com picos de intensidade de absorção nas regiões UVA, UVB e UVC, diferentemente das outras partições, que exibiram picos de intensidade de absorção somente na região UVC. Logo, os autores sugerem que a PAC, poderia potencializar a fotoproteção do filtro solar de referência hidrossolúvel, o qual possui uma intensidade de absorção maior nas regiões UVB e UVC, produzindo assim, uma fotoproteção de amplo espectro (FERREIRA et al., 2021).

MFM também foi testado pelo método de COLIPA. Neste, a combinação do extrato com o filtro solar de referência apresentou sinergismo. As formulações compostas por filtro 10% e a associação de 5% de MFM e 5% do filtro exibiram FPS maior que seis. Além disso, a análise do FPS após a radiação, revelou que a maioria das formulações têm estabilidade fotoprotetora. No entanto, a análise da atividade fotoprotetora do extrato pelos métodos de Mansur e COLIPA evidenciaram resultados estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) (CUNHA, 2017).

4.2.8 Atividade laxativa

A constipação intestinal é uma doença funcional do intestino, podendo ser referida como fezes endurecidas, esforço excessivo no ato evacuatório, evacuações infrequentes e sensação de evacuação incompleta (GALVÃO-ALVES, 2013). Os laxativos são frequentemente utilizados nesta condição, e conforme os dados da literatura, várias plantas apresentam propriedades laxativas, como por exemplo, a espécie *Senna alexandrina* Miller, amplamente utilizada pela população brasileira na forma de fitoterápico ou chá devido às suas propriedades laxativas, atribuídas aos compostos antraquinônicos (OLIVEIRA et al., 2012). Neste sentido, a presença de antraquinonas em *Mitracarpus frigidus* despertou o interesse em determinar a atividade laxativa desta espécie, que apresentou potencial para as atividades testadas (FABRI et al., 2012c).

Para a determinação da atividade laxativa, foi realizado o método proposto por Capasso et al (1986), em que a administração oral do extrato metanólico das partes aéreas de *M. frigidus* aumentou significativamente a produção de fezes 0–8 horas após sua administração, sendo a atividade laxante do MFM semelhante à do medicamento de referência, bisacodil. Ressalta-se ainda, que os animais tratados mostraram poucas fezes pastosas, sem, no entanto, o aparecimento de fezes aquosas. Da mesma maneira, após 16 horas, embora todos os grupos tenham aumentado a quantidade de fezes produzidas, nenhuma diferença no peso das fezes foi observada entre os diferentes tratamentos, exceto para o grupo tratado com solução salina. Os autores sugerem que tal fato ocorreu, porque após 8 horas de tratamento, os animais tiveram livre acesso à alimentação (FABRI et al., 2012c).

A fim de testar o efeito do MFM na motilidade intestinal, utilizou-se o método descrito por Jansen e Jageneau (1957) e Wong e Wai (1981). Neste, os grupos tratados com MFM mostraram um aumento significativo na via do carvão em comparação com o grupo tratado com solução salina e bisacodil. Além disso, não foi observado nenhuma relação com a dose administrada. Sendo assim, a diferença significativa entre a atividade de MFM e do medicamento referência, segundo os autores, foi provavelmente devido ao fato de que o bisacodil apenas começou a exercer sua atividade entre 6 e 12 horas após a administração (FABRI et al., 2012c).

5 Conclusão

A revisão sistemática apresentada reuniu estudos científicos acerca da composição química e principais atividades biológicas de *Mitracarpus frigidus* relatadas na literatura, e ressalta que a planta exibe etnofarmacologia positiva. Diante desse cenário, *M. frigidus* apresenta um potencial farmacológico

promissor, que faz dessa espécie uma fonte natural para o desenvolvimento de futuras formulações farmacêuticas. Entretanto, são necessários mais estudos farmacológicos, clínicos e toxicológicos, para que seja comprovada sua segurança e eficácia, a fim de promover seu uso terapêutico.

6 Referências

- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in enzymology**, v. 105, p. 121-126, 1984.
- AFONSO-NETO, I. S. **Atividade moluscicida e repelente de três espécies de Euphorbia (Euphorbiaceae) sobre Leptinaria unilamellata d'Orbygni (Gastropoda: Subulinidae)**. 54 f. Dissertação - Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2003.
- ANVISA. Aprova o Regulamento Técnico Mercosul sobre Protetores Solares em Cosméticos e dá outras providências. **Resolução - RDC nº 30, de 01 de junho de 2012**, Brasília, 2012.
- ARAÚJO, N. et al Oxamniquine, praziquantel and lovastatin association in the experimental schistosomiasis mansoni. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 103, n. 5, p. 450-454, 2008.
- BAPTISTA, A. B. As bactérias multirresistentes hospitalares e as plantas medicinais. **DESAFIOS - Revista Interdisciplinar da Universidade Federal do Tocantins**, v. 4, n. 4, p. 1-2, 2017.
- BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química nova**, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.
- BISIGNANO, G. et al Antimicrobial activity of *Mitracarpus scaber* extract and isolated constituents. **Letters in Applied Microbiology**, v. 30, n. 2, p. 105-108, 2000.
- BONGOMIN, Felix et al Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases-Estimate Precision. **Journal Of Fungi**, p. 1-29. 18 out. 2017.
- BRADLEY, P. P. et al Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 78, n. 3, p. 206-209, 1982.
- BRAGA, F. G. et al Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. **Journal of ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 396-402, 2007.
- BRATTSAND, R. et al Influence of 16 α , 17 α -acetal substitution and steroid nucleus fluorination on the topical to systemic activity ratio of glucocorticoids. **Journal of Steroid Biochemistry**, v. 16, n. 6, p. 779-786, 1982.
- CAMPOS, L. M. **Atividade antifúngica in vitro e in vivo do extrato metanólico de Mitracarpus frigidus na sua forma livre e incorporado a uma formulação à base de quitosana**. 2020. 98 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia e Doenças Infectoparasitárias) - Faculdade de Farmácia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2020.
- CAMPOS, L. M. et al Development and in vivo evaluation of chitosan-gel containing *Mitracarpus frigidus* methanolic extract for vulvovaginal candidiasis treatment. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 130, p. 110609, 2020.
- CAMPOS, L. M. et al *Mitracarpus frigidus*: A promising antifungal in the treatment of vulvovaginal candidiasis. **Industrial Crops and Products**, v. 123, p. 731-739, 2018.
- CAMPOS, L. M. et al *Mitracarpus frigidus* is active against *Salmonella enterica* species including the biofilm form. **Industrial Crops and Products**, v. 141, p. 111793, 2019.
- CAMPOS, L. M. **Potencial antibacteriano de Mitracarpus frigidus frente à espécies de Salmonella spp.: estudo em células planctônicas e biofilme**. 2017. 63 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Farmácia) - Faculdade de

- Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2017.
- CAPASSO, F. et al Laxatives and the production of autacoids by rat colon. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 38, n. 8, p. 627-629, 1986.
- CARMO, A. M. L. et al Synthesis of 4-aminoquinoline analogues and their platinum (II) complexes as new antileishmanial and antitubercular agents. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 65, n. 3, p. 204-209, 2011.
- CARVALHO, J. C. S. et al Estudo do impacto da utilização de ativos vegetais em fotoprotetores. **InterfacEHS - Saúde, Meio Ambiente e Sustentabilidade**, São Paulo, v. 10, n. 2, p. 62-82, 2015.
- CONRAD, M. et al Regulation of lipid peroxidation and ferroptosis in diverse species. **Genes & Development**, v. 32, p. 602-619, 2018.
- COSTA, A. C. F.; CAVALCANTE, G. M. Atividade antitumoral in vitro de Prosopis juliflora frente a células de câncer de mama e câncer de ovário. **Acta Biomédica Brasiliensia**, v. 9, n. 1, p. 130-136, 2018.
- CRUZ, Richtier Gonçalves da. **Atividade antioxidante de extratos vegetais: estudo das condições de extração e aplicação em sistema lipídico**. 2014. 98f. Dissertação (Mestrado em Ciências, Área de concentração: Ciência e Tecnologia em Alimentos) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014. Disponível em: <http://www.sbicafe.ufv.br/handle/123456789/11993>. Acesso em: 27 set. 2021.
- CUNHA, Paula Spagnol da. **Avaliação do potencial antioxidante, anti-inflamatório e fotoprotetor in vitro do extrato metanólico das partes aéreas de Mitracarpus frigidus (Rubiaceae)**. 2017. 112 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Farmácia) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2017.
- DA COSTA, K. C. M. et al Avaliação dos potenciais antioxidante e tóxico de amidas aromáticas sintetizadas seguindo a Química Verde. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 2, p. 1-8, 2022.
- DA HORA, Natan Rodrigues Santana. **Avaliação metabólica e atividade antioxidante, citotóxica e antimicrobiana de extratos do estigma de Zea mays L.** 136 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Biologia Celular) - Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2020.
- DAMIANI, E. et al Changes in ultraviolet absorbance and hence in protective efficacy against lipid peroxidation of organic sunscreens after UVA irradiation. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 82, n. 3, p. 204-213, 2006.
- DALZIEL, John M. **Useful Plants of West tropical Africa**. London: The Crown Agents for Overseas Colonies, 1937.
- DE FREITAS, V. M. et al Avaliação da atividade tóxica e citotóxica de extratos da planta Syzygium malaccense (L.) Merr. & Perry. **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological**, v. 6, n. 1, p. 67-80, 2019.
- DE PAULA, R. C. et al In vitro antileishmanial activity of leaf and stem extracts of seven Brazilian plant species. **Journal of ethnopharmacology**, v. 232, p. 155-164, 2019.
- DUARTE, M. S. L. O. et al Atividade antitumoral de extratos obtidos do epicarpo de Plinia cauliflora (Mart.) Kausel sobre tumor sólido de Ehrlich. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 4, n. 2, p. 6090-6102, 2021.
- EKALU, A. Medicinal uses, phytochemistry, and pharmacological activities of Mitracarpus species (Rubiaceae): a review. **Elsevier. Nigeria**, v. 11, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2468227620304294#!>. Acesso em: 18 jan. 2021.
- ETIENNE, O. K. et al Chemical characterization, antioxidant and enzyme inhibitory effects of Mitracarpus hirtus extracts. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 194, p. 113799, 2021.
- FABRI, R. L. et al Antibacterial and leishmanicidal effects of the hexane extract of Mitracarpus frigidus (Rubiaceae) aerial

- parts.
- Revista Brasileira de Farmácia*
- , v. 95, n. 2, p. 695-714, 2014a.
- FABRI, R. L. et al Anti-inflammatory and antioxidative effects of the methanolic extract of the aerial parts of *Mitracarpus frigidus* in established animal models. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 66, n. 5, p. 722-732, 2014b.
- FABRI, R. L. et al Antitumor, antibiotic and antileishmanial properties of the pyranonaphthoquinone psychorubrin from *Mitracarpus frigidus*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, Rio de Janeiro, v. 84, n. 4, p. 1081-1090, 2012a.
- FABRI, R. L. et al Chromatographic fingerprint analysis and effects of the medicinal plant species *Mitracarpus frigidus* on adult *Schistosoma mansoni* worms. *BioMed Research International*, v. 2014, p. 1-10, 2014c.
- FABRI, R. L. et al Essential oil of *Mitracarpus frigidus* as a potent source of bioactive compounds. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, Rio de Janeiro, v. 84, n. 4, p. 1073-1080, 2012b.
- FABRI, Rodrigo Luiz. Estudo fitoquímico de *Mitracarpus frigidus* (Willd. ex Roem. & Schult.) K. Schum. biomonitorado pela atividade antimicrobiana e avaliação das atividades citotóxica, leishmanicida e antioxidante. 2008. 141f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas na área de Genética e Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2008. Disponível em: https://repositorio.ufjf.br/jspui/bitstream/ufjf/3848/1/rodrigolui_zfabri.pdf. Acesso em: 19 jan. 2021.
- FABRI, R. L. et al In-vivo laxative and toxicological evaluation and in-vitro antitumour effects of *Mitracarpus frigidus* aerial parts. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 64, n. 3, p. 439- 448, 2012c.
- FABRI, R. L. et al *Mitracarpus frigidus* aerial parts exhibited potent antimicrobial, antileishmanial, and antioxidant effects. *Bioresource Technology*, v. 100, n. 1, p. 428-433, 2009.
- FABRI, R. L. et al *Mitracarpus frigidus* (Rubiaceae) inhibits inflammatory and oxidative stress mediators in *Salmonella* sp. mouse infection. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 73, n. 1, p. 82-92, 2021.
- FABRI, Rodrigo Luiz. *Mitracarpus frigidus* (Rubiaceae): **Potencial farmacológico, avaliação toxicológica e identificação de substâncias bioativas**. 2013. 242 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas, Área de concentração Genética e Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2013. Disponível em: https://repositorio.ufjf.br/jspui/bitstream/ufjf/5288/1/rodrigolui_zfabri.pdf. Acesso em: 18 jan. 2021.
- FABRI, R. L. et al Pentacyclic triterpenoids from *Mitracarpus frigidus* (Willd. ex Roem. & Schult.) K. Schum: in vitro cytotoxic and leishmanicidal and in vivo anti-inflammatory and antioxidative activities. *Medicinal Chemistry Research*, v. 23, n. 12, p. 5294-5304, 2014d.
- FABRI, R. L. et al Potencial antimicrobiano, citotóxico e leishmanicida do extrato em diclorometano das partes aéreas de *Mitracarpus frigidus* (Rubiaceae). *Revista Eletrônica de Farmácia*, v. 17, n. 1, p. 1-9, 2020.
- FERREIRA, K. C. et al Avaliação das atividades antioxidante e fotoprotetora in vitro de partições do extrato metanólico de *Mitracarpus frigidus* (Rubiaceae). *HU Revista*, v. 47, p. 1-10, 2021.
- GALVÃO-ALVES, J. Constipação intestinal. *Jornal Brasileiro de Medicina*, v. 101, n. 2, p. 31-37, 2013. Disponível em: <https://files.bvs.br/upload/S/0047-2077/2013/v101n2/a3987.pdf>. Acesso em: 05 abr. 2021.
- GRISWOLD, D. E. et al SK&F 86002: a structurally novel anti-inflammatory agent that inhibits lipooxygenase-and cyclooxygenase-mediated metabolism of arachidonic acid. *Biochemical pharmacology*, v. 36, n. 20, p. 3463-3470, 1987.
- HIRATA, L. L.; SATO, M. E. O.; SANTOS, C. A. M. Radicais livres e o envelhecimento cutâneo. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, v. 23, n. 3, p. 418-424, 2004.

- HAYASHI, M. A.; BIZERRA, F. C.; DA SILVA JÚNIOR, P. I. Antimicrobial compounds from natural sources. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 195, 2013.
- HOLETZ, F. B. et al Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.
- IROBI, O. N.; DARAMOLA, S. O. Antifungal activities of crude extracts of *Mitracarpus villosus* (Rubiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 40, n. 2, p. 137-140, 1993.
- JANSEN, P. A. J.; JAGENEAU, A. H. A new series of potent analgesics: dextro 2:2-diphenyl-3-methyl-4-morpholinobutylpyrrolidine and related amides. Part I - Chemical structure and pharmacological activity. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 9, n. 1, p. 381-400, 1957.
- JOHN-AFRICA, L. B. et al Sedative properties of *Mitracarpus villosus* leaves in mice. **International Journal of Biological and Chemical Sciences**, v. 8, n. 5, p. 2132-2142, 2014.
- KERHARO, J.; ADAM, J. G. La pharmacopée sénégalaise traditionnelle: plantes médicinales et toxiques. v. 1. Paris: Vigot Frères, 1974.
- LACERDA, Géisica Lugão. **Biofilmes microbianos e resistência a antibióticos**. 2013. 49f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Farmácia) - Curso de Bacharelado em Farmácia, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro - IFRJ, Rio de Janeiro, 2013.
- LEE, Y. et al Antifungal Drug Resistance: molecular mechanisms in *Candida albicans* and beyond. **Chemical Reviews**, v. 121, n. 6, p. 3390-3411, 2020.
- LEE, Y. et al Taiwanese native plants inhibit matrix metalloproteinase-9 activity after ultraviolet B irradiation. **Molecules**, v. 14, n. 3, p. 1062-1071, 2009.
- LEMOS, A. S. O. et al Antifungal activity of the natural coumarin scopoletin against planktonic cells and biofilms from a multidrug-resistant *Candida tropicalis* strain. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. 1525, 2020.
- LEMOS, A. S. O. et al Antibacterial and antibiofilm activities of psychorubrin, a pyranonaphthoquinone isolated from *Mitracarpus frigidus* (Rubiaceae). **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. 724, 2018.
- MANSUR, J. S. et al Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 61, n. 4, p. 121-124, 1986.
- MARMITT, D. J. et al Plantas com potencial antibacteriano da relação nacional de plantas medicinais de interesse do Sistema Único de Saúde: revisão sistemática. **Revista de Saúde Pública de Santa Catarina**, v. 8, n. 2, p. 135-152, 2015.
- MARTINS, D.; NUNEZ, C. V. Secondary metabolites from Rubiaceae species. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 13422-13495, 2015.
- MATOS, Francisco José de Abreu. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. Fortaleza: Editora UFC, 1997.
- MELO, Livia de. **Avaliação da atividade anti-Candida in vitro de Mitracarpus frigidus**: estudo em células planctônicas. 2017. 58f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Farmácia) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2017.
- MEYER, B. N. et al Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, v. 45, n. 5, p. 31-34, 1982.
- M'BONGO, N. et al In vitro sensitivity of *Leishmania donovani* to organometallic derivatives of pentamidine. **Parasitology Research**, v. 83, n. 5, p. 515-517, 1997.
- MORENO, A. H. et al Avaliação da atividade antimicrobiana e citotoxicidade hemolítica em diferentes extratos vegetais. **Arquivos de Ciências da Saúde**, v. 25, n. 1, p. 11-12, 2018.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

NAIK, V. R.; AGSHIKAR, N. V.; ABRAHAM, G. J. S.

Analgesic and anti-inflammatory activity in alcoholic extracts of *Cucumis trigonus* Roxburghii. **Pharmacology**, v. 20, n. 1, p. 52- 56, 1980.

NAKHAI, L. A. et al Benefits of *Zataria multiflora* Boiss in experimental model of mouse inflammatory bowel disease. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 4, n. 1, p. 43-50, 2007.

NICOLETTI, I. et al A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Journal of Immunological Methods**, v. 139, n. 2, p. 271-279, 1991.

OLIVEIRA, A. L. S. et al Avaliação da qualidade de amostras de *Senna alexandrina* Miller comercializadas em três estabelecimentos de Feira de Santana, Bahia. **Exatas Online**, v. 3, n. 2, p. 25-30, 2012.

PEREIRA, Z. V.; CARVALHO-OKANO, R. M.; GARCIA, F.

C. P. Rubiaceae Juss. da reserva florestal mata de paraíso, Viçosa, MG, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 20, n. 1, p. 207-224, 2006.

PHANIENDRA, A., JESTADI, D.B., PERIYASAMY, L. Free radicals: Properties, sources, targets, and their implication in various diseases. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 30, n. 1, p. 11–26, 2015.

PINHO, L. et al Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos das folhas de alecrim-pimenta, aroeira, barbatimão, erva baleeira e do farelo da casca de pequi. **Ciência Rural**, v. 42, n. 2, p. 326-331, 2012.

RAMOS, L. T. T. et al Avaliação da atividade antiinflamatória do extrato etanólico de *Byrsonima sericea* em edema de pata induzido por carragenina em camundongos. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 7, p. 48734-48742, 2020.

ROATT, B. M. et al Recent advances and new strategies on leishmaniasis treatment. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, p. 8965-8977, 2020.

ROCHA, F. F. et al Evaluation of antinociceptive and anti inflammatory effects of *Croton pullei* var. *glabrior* Lanj. (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 344-349, 2008.

SANOGO, R. et al Selective antimicrobial activities of *Mitracarpus scaber* Zucc against *Candida* and *Staphylococcus* sp. **Phytomedicine**, v. 2, n. 3, p. 265-268, 1996.

SANTOS, Izabelly Bianca da Silva. **Avaliação da composição química, atividades antioxidante, antiinflamatória e antinociceptiva de extratos da casca do fruto de *Myrciaria floribunda* (H. West ex Willd.) O. Berg**. 2019. 99 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2019.

SILVA, J. B. et al New aspects on the hepatoprotective potential associated with the antioxidant, hypocholesterolemic and anti- inflammatory activities of *Vernonia condensata* Baker. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 198, p. 399-406, 2017.

SMITHERS, S. R.; TERRY, R. J. The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of the adult worms. **Parasitology**, v. 55, n. 4, p. 695-700, 1965.

TORRES-GUERRERO, E. et al Leishmaniasis: a review. **F1000Research**, v. 6, p. 750, 2017.

WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G. W. Carrageenan-induced inflammation in hind paws of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. **Proceedings for the Society of Experimental Biology and Medicine**, v. 111, p.544-547, 1962.

WONG, C. L.; WAI, M. K. Effects of aspirin and

paracetamol on naloxone reversal or morphine-induced inhibition of gastrointestinal propulsion in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 73, n. 1 p. 11-19, 1981.

YASHIN, A. et al Antioxidant activity of spices and their impact on human health: A review. **Antioxidants**, v. 6, n. 3, p. 70, 2017.

5 CAPÍTULO 2

O capítulo 2 apresenta o artigo intitulado “Multi-target antifungal mechanisms of *Mitracarpus frigidus* extract against *Candida albicans* through membrane damage, ROS overproduction, and mitochondrial dysfunction”, que será submetido à *Biomedicine & Pharmacotherapy* (e-ISSN: 1950-6007). O estudo teve como objetivo, avaliar a caracterização fitoquímica de MFM, investigar os mecanismos antifúngicos frente a linhagens de *C. albicans*, avaliando seus efeitos sobre a membrana celular, produção de espécies reativas de oxigênio e disfunção mitocondrial, bem como investigar os efeitos ultraestruturais de MFM sobre as células planctônicas e biofilme de *C. albicans*, utilizando técnicas de microscopia (MET e MEV). Os resultados obtidos contribuem para a compreensão do potencial antifúngico da espécie vegetal, bem como de seus possíveis mecanismos de ação frente à candidíase.

Multi-target antifungal mechanisms of *Mitracarpus frigidus* extract against *Candida albicans* through membrane damage, ROS overproduction, and mitochondrial dysfunction

Multi-target antifungal mechanisms of *Mitracarpus frigidus*

Thayná Gomes Ferreira^a, Thalita de Freitas Souza^a, Natasha Silva Mayrink^a, Núbia Benini Andrade^a, Julia Bertolini Farjado^a, Mariana Hauck Vianna^a, Ari Sérgio de Oliveira Lemos^a, Ana Barbara Polo^a, Irley Olivia Mendonça Diniz^a, Mariane Rocha Cordeiro Comitre^a, Gustavo Lucas da Silva Lima^a, Maria Clara Machado Resende Guedes^c, Elaine Soares Coimbra^c, Gilson Costa Macedo^c, Rafael Meyer Mariante^b, Vinícius de Monte Vidal^d, Francisco Javier Otero Espinar^d, Rodrigo Luiz Fabri^{a*}

^a Laboratory of Bioactive Natural Products, Department of Biochemistry, Institute of Biological Sciences, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil.

^b Laboratory of Structural Biology, Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil.

^c Department of Parasitology, Microbiology and Immunology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil

^d Faculty of Pharmacy, Institute of Materials iMATUS, Health Research Institute of Santiago, Santiago de Compostela University, Santiago de Compostela, Galicia, Espanha.

*rodrigo.fabri@ufjf.br

Abstract

Opportunistic infections caused by *Candida albicans*, particularly in patients with coinfections, are associated with increased morbidity and mortality. Plant-derived antimicrobials are promising alternative therapeutic strategies due to their diverse mechanisms of action. This study investigated the antifungal mechanisms of the methanolic extract of *Mitracarpus frigidus* (MFM) against clinical and multidrug-resistant *C. albicans* isolates. MFM inhibited 47 strains (MIC: 62.5–1000 µg/mL). Sorbitol protection, ergosterol effect, and membrane integrity assays indicated simultaneous effects on the fungal cell wall and membrane. MFM also significantly increased ROS production in three strains, reaching levels higher than those induced by nystatin, and reduced mitochondrial membrane potential in all tested strains, indicating mitochondrial dysfunction. TEM confirmed marked ultrastructural alterations in the cell

envelope and intracellular organelles. LC–MS analysis revealed that MFM is rich in flavonoids and phenolic acid derivatives, including quercetin-3-O-galactoside, rutin, kaempferol-3-O-glucoside, quercetin, and peltatoside, which may synergistically contribute to its antifungal activity. Accordingly, MFM delayed exponential growth, reduced cell viability over time, inhibited biofilm formation by 37–63% and decreased the metabolic activity of mature biofilms. Checkerboard assays further suggested that MFM may act as a therapeutic adjuvant by enhancing azole efficacy. Overall, MFM exhibits a multi-target antifungal mechanism involving cell envelope disruption, oxidative imbalance, and mitochondrial impairment. Further studies are required to confirm these effects *in vivo* and advance the characterization of its bioactive compounds and safety profile.

Keywords: *Mitracarpus frigidus*; *Candida albicans*; natural products; mechanism of action; oxidative stress; biofilm

1. Introduction

Candida spp. are responsible for most human infections caused by fungal pathogens. As the most frequent cause of opportunistic infections, *Candida albicans* is both a commensal and an opportunistic fungal pathogen in humans, capable of colonizing multiple body sites. During periods of immune suppression, it can overcome host immune defenses and establish a variety of infections, being the leading cause of candidiasis [1,2]. Common antifungal agents used for the treatment of *C. albicans* infections include azoles, polyenes, echinocandins, and antimetabolites. Among these, azoles, particularly fluconazole, are the most widely used and are consequently most associated with the development of antifungal resistance [3].

This issue is further aggravated in immunocompromised patients, who frequently receive immunosuppressive therapies that increase their susceptibility to co-infections. In such populations, invasive fungal infections (IFIs) may reach an incidence of up to 27.7% and are considered a well-established complication [4]. In this context, polymicrobial infections play a critical role, as interactions among co-infecting pathogens can exacerbate disease severity and contribute to multidrug resistance. Polymicrobial biofilms, for instance, exhibit increased growth and biomass, as well as greater resistance to antimicrobial agents compared to monomicrobial biofilms [3,5]. Additionally, during the COVID-19 pandemic, a significant rise in antimicrobial resistance was anticipated due to the extensive use of antibiotics, with multidrug resistance emerging as an important factor associated with increased morbidity and mortality [6].

This growing incidence of antimicrobial resistance (AMR) represents a significant global health threat, highlighting the urgent need for alternative antimicrobial strategies [7]. In this context, plant-derived antimicrobials have emerged as promising candidates for combating resistant microorganisms due to their diverse mechanisms of action and generally favorable safety profiles [7].

The use of herbal medicines has increased quickly in recent years, largely due to the diversity of bioactive compounds present in one single source [8]. In this scenario, several plant species have been clinically studied as potential sources of antifungal agents. *Mitracarpus frigidus* (Willd. Ex Roem. & Schult.) K. Shum belongs to the Rubiaceae family and is predominantly found in Brazil [9]. The methanolic extract obtained from the aerial parts of *Mitracarpus frigidus* (MFM) is known to contain a variety of secondary metabolites, including anthraquinones, flavonoids, tannins, alkaloids, terpenes and quinones [10,11]. Among these, compounds such as kaempferol-O-rutinoside, kaempferol, rutin, psychorubrin, ursolic acid and methyl ursolate have been associated with the antifungal potential of MFM, as reported in the literature [9,10,12].

Despite the documented antifungal potential of *Mitracarpus frigidus* methanolic extract (MFM) against *Candida* species, there is still a significant gap in the literature regarding the antimicrobial mechanisms of action. Understanding these mechanisms is crucial to development of new therapeutic strategies, especially in the face of increasing multidrug resistance observed in polymicrobial infections and clinical complications, such as those seen during the COVID-19 pandemic. Therefore, this study aims to investigate the antimicrobial mechanisms of action of MFM, providing a deeper insight into its interaction with fungal pathogens.

2. Materials and Methods

2.1 Plant Material

Mitracarpus frigidus aerial parts were collected in May 2021 in Juiz de Fora, State of Minas Gerais, Brazil. Geographic coordinates: -43.38223, -21.78073 (WGS84). A voucher specimen (CESJ 46076) was deposited at the Leopoldo Krieger Herbarium at the Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF).

2.2 Preparation of the Extract

The aerial parts (1 kg) of *M. frigidus* were powdered and macerated with methanol (5 × 2000 ml) for five days at room temperature. After evaporation of the solvent under reduced pressure at 45 °C, the methanolic extract was obtained (MFM), with a yield of 15%, and kept in tightly stoppered bottles under refrigeration for subsequent biological tests.

2.3 Phytochemical Profile of MFM Determined by LC–MS/MS

Samples were prepared by dissolution in methanol to a final concentration of 1000 µg/mL for the MFMs. All solutions were filtered through polytetrafluoroethylene (PTFE, 0.22 µm) membranes and maintained at room temperature until injection into the chromatographic system. Analyses were performed using a high-resolution liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) system. The setup consisted of a timsTOF Pro mass spectrometer (Bruker Daltonics, Germany) equipped with a VIP-HESI source and a tims-QTOF analyzer, located at the Universidade de Santiago de Compostela (USC, Spain). Chromatographic separation was conducted using an ELUTE system (Bruker Daltonics) coupled online to the spectrometer. Ionization was performed via electrospray ionization (ESI) in negative mode. Spectra were acquired using PASEF (Parallel Accumulation Serial Fragmentation) mode, covering a mass range from 20 to 1300 m/z. Separation was carried out on an Acquity UPLC BEH C18 column (1.7 µm, 2.1 × 50 mm; Waters). The mobile phase consisted of water with 1% formic acid (phase A) and acetonitrile with 0.1% formic acid (phase B). An isocratic elution at 80:20 (A:B) was maintained at a flow rate of 0.5 mL/min. The column temperature was set to 40 °C, and the injection volume was 5 µL for all samples. Compound annotation was performed based on accurate mass measurements, isotope pattern, MS/MS fragmentation spectra, and comparison with spectral libraries and literature data using the MetaboScape platform (version 13.0.3; Bruker Daltonics GmbH & Co., Germany). Since no authentic reference standards were analyzed under identical experimental conditions, metabolite identification should be regarded as putative annotation according to the Metabolomics Standards Initiative (MSI) level 2 criteria (Sumner et al., 2007).

2.4 Fungal Strain

The antifungal activity of the methanolic extract of *Mitracarpus frigidus* (MFM) was assessed against 52 *Candida albicans* strains. This panel comprised two reference strains—ATCC® 10231, a multidrug-resistant strain (resistant to anidulafungin, voriconazole,

itraconazole, and fluconazole), and ATCC® 24433™, a strain susceptible to conventional antifungals—along with five clinical isolates: *C. albicans* vv1, *C. albicans* vv2, *C. albicans* vv3 obtained from a vulvovaginal infection, and *C. albicans* o2, isolated from the oropharyngeal region. Additionally, 46 *C. albicans* isolates collected from critically ill COVID-19 patients with acute respiratory distress syndrome (ARDS) were subjected to an initial screening for susceptibility to MFM. Based on this screening, a single representative isolate (*C. albicans* 1015) was selected for subsequent mechanistic studies, along with two ATCC reference strains and the oral and vaginal clinical isolates (ATCC, 2018).

2.5 Determination of the Minimal Inhibitory Concentration (MIC)

The antifungal activity of MFM was performed according to CLSI (2017) [13] to determine the Minimal Inhibitory Concentration (MIC). The fungus was cultured at 35 °C for 24 h in Sabouraud Dextrose Agar (SDA). The sample stock solution of MFM was two-fold diluted from 1000.00 to 7.80 µg ml⁻¹ (final volume = 80 µl) and a final Dimethyl sulfoxide (DMSO) concentration ≤ 1%. Then, 100 µl of Sabouraud Dextrose Broth (SDB) was added onto microplates. Finally, 20 µl of 10⁶ CFU/ml (according to 0.5 McFarland turbidity standards) of standardized fungal suspension was inoculated onto microplates and the test was performed at a volume of 200 µl. Plates were incubated at 35 °C for 24 h. The same tests were performed simultaneously for growth control (SDB + fungus + MFM vehicle) and sterility control (SDB + MFM vehicle). Nystatin (100.00 to 0.78 µg/ml) was used as positive control. The MIC values were calculated as the highest dilution showing complete inhibition of tested strain. The analyses were performed in duplicate.

2.6 Reactive Oxygen Species (ROS) Production

To measure ROS levels, *C. albicans* (500 µL of RPMI-1640 with 1% glucose containing 10⁶ CFU/mL) were either untreated (negative control) or treated with 500 µL of MFM (final concentration per well = MIC value) and then incubated for 12 h at 35°C. After washing with PBS, cells were labeled with 1 mM of H₂DCFDA (Invitrogen, Waltham, MA, USA) for 30 min, and the fluorescence values were estimated in a fluorimeter (FLx800) at $\lambda_{ex/em}$ = 485/528 nm [14]. Cells treated with Nystatin (MIC value), were used as positive control. The assays were performed in three independent experiments, each in triplicate.

2.7 Determination of Mitochondrial Membrane Potential ($\Delta\Psi_m$)

C. albicans (500 μ L of RPMI-1640 with 1% glucose containing 106 CFU/mL) were either untreated (negative control) or treated with 500 μ L of MFM (final concentration per well = MIC value) and then incubated for 12 h at 35°C. After washing with PBS and labeled with 5 μ M of JC-1 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 40 min. After washing with Hank's solution, the fluorescence values were measured in a fluorimeter (FLx800) at $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ = 485/528 and $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ = 540/600 nm to estimate the fluorescence emitted by the monomers and J-aggregates, respectively [15]. Cells treated with Nystatin (MIC value), were used as positive control. The assays were performed in three independent experiments, each in triplicate.

2.8 Dynamic Detection of Cell Death Using Flow Cytometry

Membrane integrity assay using Propidium iodide (PI) was performed by Lemos et al. [16] with modifications. *C. albicans* (500 μ L of RPMI-1640 with 1% glucose containing 106 CFU/mL) were either untreated (negative control) or treated with 500 μ L of MFM (final concentration per well = MIC value) and then incubated for 12 h at 35°C. After washing with PBS. Next, PI was added at a final concentration of 5 μ g/mL, and the mixture was incubated for 20 minutes, protected from light and at room temperature. Nystatin was used as a positive control. Data acquisition was performed on a CytoFLEX flow cytometer (Beckman Coulter), with 30.000 events collected per sample. Results were analyzed using FlowJo software. The assays were performed in three independent experiments, each in triplicate.

2.9 Sorbitol Protection Assay

After the determination of MIC values for serial dilution assay, the wall assay was performed using the osmotic protector sorbitol, according to the methodology of Frost et al [17] with modifications. A serial microdilution was performed on a 96-well sterile microplate using doubly-concentrated Brain Heart Infusion (BHI) broth enriched in 0.8 M sorbitol. The stock solution of MFM was diluted in concentrations ranging from 4,000 to 31.25 μ g/ml. Amphotericin (1.00 to 0.0078 μ g/ml) was used as positive control. The MIC values were determined after 24 h of incubation at 35 °C. The assays were performed in three independent experiments, each in duplicate.

2.10 Ergosterol Effect Assay

The MIC of MFM in the presence of exogenous ergosterol was determined following the adapted methodology of Leite et al. [18]. A serial microdilution was performed on a 96-well sterile microplate using doubly-concentrated BHI broth enriched in ergosterol ($400 \mu\text{g ml}^{-1}$). The stock solution of MFM was diluted in concentrations ranging from 4,000 to $31.25 \mu\text{g ml}^{-1}$. Amphotericin (1.00 to $0.0078 \mu\text{g ml}^{-1}$) was used as positive control. The MIC values were determined after 24 h of incubation at 35°C . The assays were performed in three independent experiments, each in duplicate.

2.11 Morphological Analysis by Transmission Electron Microscopy (TEM)

C. albicans (500 μL of RPMI-1640 with 1% glucose containing 106 CFU/mL) cells were grown in a falcon tube with 500 μL of MFM (final concentration per well = MIC value) for 12 h at 35°C . Cells were fixed for 1 h at room temperature in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2) containing 3.5% sucrose and 2.5 mM CaCl_2 . After washing, they were post-fixed for 1 h in 1% osmium tetroxide with 0.8% potassium ferricyanide, dehydrated through a graded acetone series, and embedded in PolyBed 812 resin (Polysciences, UK) polymerized at 60°C for 72 h. Ultrathin sections were prepared with an Ultracut ultramicrotome (Leica, Austria), mounted on copper grids, stained with uranyl acetate and lead citrate, and examined using a Jeol 1011 transmission electron microscope (Jeol, Japan) at the Rudolf Barth Electron Microscopy Platform, Instituto Oswaldo Cruz (Fiocruz, Brazil) [19].

2.12 Growth Kinetics Assay

The fungicidal effect of the films was evaluated using a modified protocol based on Lemos, et al. [20]. MIC concentration of MFM was incubated in 96-well plates containing RPMI 1640 medium and fungal suspensions (5×10^3 CFU/mL, adjusted to 1.0 McFarland). Plates were incubated at 37°C , and absorbance was recorded at 595 nm at time points: 0, 4, 6, 8, 12, 24, and 36 hours. Growth curves were plotted to evaluate time-dependent inhibition. Nystatin was used as a positive control. RPMI medium with fungal inoculum served as the growth control. All tests were conducted in triplicate.

2.13 Biofilm Inhibition – Adhesion Phase

The ability of the films to inhibit initial fungal adhesion was assessed using a modified method from Campos, et al. [9]. MIC concentration of MFM was incubated in 96-well plates with mixed *C. albicans* cell suspensions (10^6 CFU/mL) at 35 °C for 24 hours. After incubation, non-adherent (planktonic) cells were washed away with sterile water. The adhered biofilm cells were resuspended and agitated for 5 minutes. Absorbance of the suspensions was measured at 595 nm. Nystatin served as positive control; RPMI with *Candida* served as the negative (growth) control. All experiments were performed in triplicate.

2.14 Evaluation of MFM Effect on Biofilm Formation by Scanning Electron Microscopy (SEM)

SEM was performed as previously described [20]. *C. albicans* (500 μ L of RPMI-1640 with 1% glucose containing 106 CFU/mL) cells were grown on round glass coverslips (Glasscyto®) inside 24-well plates together with 500 μ L of MFM (final concentration per well = MIC value). Sterile water and nystatin (MIC value) were used as negative and positive control groups respectively. Cells were fixed in 2.5 % glutaraldehyde (Riedel-Haen, Germany) in cacodylate buffer (0.1 M, pH 7.2). After post-fixation with osmium tetroxide, samples were dehydrated with ethanol solutions, critical points dried in carbon dioxide, mounted on aluminum holders and sputtered with gold for ultrastructural analysis (JEOL JSM- 6390 L V, Tokyo, Japan). To study ultrastructural aspects of the surface of fungal cells, electron micrographs were randomly taken at magnifications of 1000–20,000 $\times$.

2.15 Elucidation of Synergistic Activity of MFM and Itraconazole.

The stock solutions and serial two-fold dilutions of each drug were prepared to at least double the MIC. A total of 100 μ L of RPMI was used in each of the wells of 96-well microtiter plates. According to the protocol of checkerboard assay, the stock solution of MFM was diluted along the ordinate and the stock solution of Itraconazole was diluted along the abscissa. Each of the wells was inoculated with 10 μ L of the pure cell suspension of individual strains of *C.albicans* (optical density is adjusted to 0.5 McFarland unit). The plates were subjected to incubation at 35°C for 24 h. After the process of incubation, the MIC was determined according

to the broth microdilution method, following CLSI guidelines, with modifications. After incubation, 10 μ L of INT solution (0.2 mg/mL) was added to each well, and plates were further incubated for 30 minutes at 37 °C. The assays were performed in three independent experiments, each in duplicate. As per the checkerboard assay, fractional inhibitory concentrations (Σ FICs) were calculated as follows: If A is essential oils and B is nystatin [21].

$$\Sigma\text{FIC} = \text{FIC of drug A} + \text{FIC of drug B}$$

where, FIC of drug A = MIC of drug A in combination/MIC of drug A alone

FIC of drug B = MIC of drug B in combination/MIC of drug B alone

The combination is synergistic if Σ FIC is ≤ 0.5 , indifferent if Σ FIC is >0.5 to <2 , and antagonistic if Σ FIC is ≥ 2 .

All the statistical analyses were performed using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Bonferroni's multiple comparison test. Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$.

3. Results and discussion

3.1 Phytochemical Profile of MFM Determined by LC–MS/MS

The LC–MS/MS analysis of MFM revealed a complex phytochemical profile predominantly composed of flavonoid glycosides and phenolic acid derivatives, which represented the major fraction of the detected metabolites according to the relative peak area distribution (Table 1). This profile is consistent with previous phytochemical investigations of *M. frigidus* extracts, in which flavonols, glycosylated flavonoids, hydroxycinnamic acid derivatives, and other polar metabolites were reported as important chemical markers [22,23]. Among the identified metabolites, quercetin-3-O-galactoside was the major compound (19.46%), followed by peltatoside (17.35%), rutin (13.99%), kaempferol-3-O-glucoside (7.00%), and quercetin (3.87%). Other flavonoid derivatives, including quercitrin, myricetin, isokaempferide, aromadendrin, and kaempferol, were also detected, reinforcing the predominance of flavonol-related compounds in the extract.

The high relative abundance of quercetin-derived metabolites is pharmacologically relevant, since quercetin, quercetin glycosides, and hyperoside/quercetin-3-O-galactoside have been associated with antioxidant, antimicrobial, antifungal, and anti-inflammatory effects [24]. In particular, quercetin has been reported to exert activity against *Candida albicans* planktonic and biofilm cells, with additional effects in experimental vulvovaginal candidiasis models [25]. Rutin and kaempferol derivatives may also contribute to the biological profile of MFM, as rutin

has been associated with antimicrobial and antibiofilm effects, while kaempferol and its derivatives have been reported to display antibacterial, antifungal, antioxidant, and anti-inflammatory activities [26, 27, 28].

The extract also contained several phenolic acids and hydroxycinnamic acid derivatives, including caffeoylquinic acid isomers, chlorogenic acid, 3-O-p-coumaroylquinic acid, cynarin, 3,5-dicaffeoylquinic acid, ferulic acid, p-coumaric acid, salicylic acid, gentisic acid, rosmarinic acid, and methyl vanillate. These metabolites are relevant because hydroxycinnamic acid derivatives have been widely associated with antimicrobial and anti-inflammatory properties. Chlorogenic acid has been reported to display anti-Candida activity, including effects against fluconazole-resistant strains, and has been proposed as a potential adjuvant in antifungal therapy [29]. Rosmarinic acid has also demonstrated antifungal and antibiofilm activity against Candida species, involving mechanisms related to mitochondrial dysfunction, membrane alterations, and reduction of virulence-associated traits [30, 31]. In addition, dicaffeoylquinic acid derivatives have shown anti-inflammatory effects through suppression of NF- κ B and MAPK signaling pathways, while ferulic and p-coumaric acids are described as phenolic acids with antioxidant, anti-inflammatory, and antimicrobial potential [32,33, 34, 35].

Table 1: Putatively annotated metabolites identified in the methanolic extract of *Mitracarpus frigidus* by UPLC-QTOF-MS/MS (MSI Level 2). *Retention time (RT) in minutes.

Nº	Componde	RT* (min.)	Ionic mass (m/z)	Chemical class	Relative área (%)
1	Sorbose	0.66	179.056 75	Monosaccharide	2,0672659 9
2	Threonic acid	0.72	135.030 21	Sugar acid	0,9743284 2
3	Quinic acid	0.78	191.056 28	Cyclitol / organic acid	2,9623269 5
4	D-Arabinonic acid	0,78	165.041 12	Sugar acid	0,4316468 4
5	Galactonic acid	0.79	195.050 91	Sugar acid	2,0734272 6
6	Melibiose	0.83	341.109 59	Disaccharide	0,8340323 6

7	Sucrose	0.83	341.110 09	Disaccharide	6,1746657 7
8	Malic acid	0.84	133.014 29	Organic acid	1,2884024 2
9	Asperulosidic acid	0.94	431.120 07	Iridoid glycoside	0,60712054
10	Caffeoyl quinic acid (isomer of 831, 832, 834); PlaSMA ID-834	0.99	353.088 21	Phenolic acid derivative	2,5122905 1
11	Chlorogenic acid	0.99	353.088 35	Hydroxycinnamate ester	0,8507638 8
12	Cis-Melilotoside	1.00	325.092 44	Coumarin glycoside	0,0909682 2
13	Fraxin	1.01	369.083 67	Coumarin glycoside	0,7737386
14	2-Isopropylmalic acid	1.08	175.060 64	Organic acid	0,10074712
15	3-O-p- Coumaroylquinic acid	1.09	337.093 77	Phenolic acid derivative	0,2705682 8
16	3-(4-Hydroxyphenyl)- 3-oxopropyl .beta.-D- glucopyranoside	1.10	327.107 78	Phenolic glycoside	0,5185829 2
17	4-hydroxybenzoic acid	1.12	137.024 57	Phenolic acid	0,3647584 4
18	3-(4-Hydroxyphenyl)- 3-oxopropanoic acid	1.14	179.034 81	Aromatic acid	0,2575674 3
19	Rutin	1.14	609.145 7	Flavonoid glycoside	13,990904 7
20	Phthalic acid	1.16	165.019 48	Aromatic dicarboxylic acid	0,4414822 6
21	Peltatoside	1.17	595.129	Iridoid glycoside[TF1]	17,345574 5

22	Fraxetin	1.26	207.030 62	Coumarin	0,3718806 5
23	5-Carboxymellein	1.30	221.046 66	Dihydroisocoumarin derivative	0,05189032
24	Gentisic acid	1.32	153.020 23	Phenolic acid	0,04763208
25	Quercetin-3-O-galactoside	1.41	463.086 71	Flavonoid glycoside	19,4638452
26	(4E,6E)-8-(.beta.-D-Glucopyranosyloxy)-2,7-dimethylocta-4,6-dienoic acid	1.48	345.155 93	Terpenoid glycoside	0,5425496 9
27	p-Coumaric acid	1.48	163.040 45	Phenolic acid	0,2941770 5
28	6-Hydroxy-7-methoxycoumarin	1.68	191.035 55	Coumarin	3,4620680 6
29	Kaempferol-3-O-glucoside; LC-ESI-QTOF; MS2; CE	1.84	447.092 25	Flavonoid glycoside	7,0052124
30	Cynarin	1.87	515.120 3	Caffeoylquinic acid derivative	1,5950527 5
31	3,5-Dicaffeoylquinic acid	1.87	515.118 8	Phenolic acid derivative	0,0448434 9
32	Ferulic acid	1.93	193.049 7	Phenolic acid	0,0468218 8
33	quercetin-3-O-deoxyhexosyl(1-2)pentoside	1.98	579.135 78	Flavonoid glycoside	0,74918773
34	9-(2,3-dihydroxypropoxy)-9-oxononanoic acid	2.06	261.133 54	Hydroxy fatty acid derivative	0,0711843 3

35	Quercitrin	2.17	447.093 52	Flavonoid glycoside	0,8081060 4
36	Rosmarinic acid	2.50	359.077 65	Polyphenolic acid	1,1234424 4
37	(-)-Aromadendrin	2.55	287.056 21	Flavanonol	0,1102433 8
38	azelaic acid	2.55	187.097 81	Dicarboxylic acid	0,9236062 9
39	Myricetin	2.60	317.031 49	Flavonoid	0,0338587 2
40	4-Oxododecanedioic acid	2.69	243.125 07	Dicarboxylic acid derivative	0,0541890 2
41	Methyl 3-hydroxybenzoate	2.74	151.040 3	Phenolic ester	0,0977512 7
42	Isokaempferide	2.82	299.056 99	Flavonoid	0,1208513 2
43	9-Hydroxynonanoic acid	2.85	173,118 11	Hydroxy fatty acid	0,0842040 1
44	Salicylic acid	2.90	137.024 43	Phenolic acid	1,5847462 8
45	Ethyl 3,5-dihydroxybenzoate	3.00	181.050 66	Phenolic ester	0,0616503 8
46	(2-Formyl-4-methoxyphenoxy)acetic acid	3.34	209.045 5	Aromatic ether / phenolic derivative	0,2240855 5
47	Lariciresinol	3.39	359.149 69	Lignan	0,2457536 2
48	Cis-Pinonic acid	4.11	183.102 94	Monoterpenoid derivative	0,0352341 7
49	3',4'-Dimethoxy-3-hydroxy-6-methylflavone	4.31	311.092 51	Flavonoid	0,0370053

50	methyl vanillate	5.27	181.050 88	Phenolic ester	0,3845046 5
51	Quercetin; LC-ESI- QTOF; MS2; CE	5.28	301.035 41	Flavonoid	3,8785849 4
52	Ethyl trans-cafate	6.08	207.066 71	Phenolic ester	0,1943343 5
53	Kaempferol	10.35	285.040 29	Flavonoid	0,840269
54	(3E)-4-(1-Hydroxy- 2,2,6-trimethyl-4- oxocyclohexyl)but-3- en-2-yl hexopyranoside	10.88	387.202 52	Norisoprenoid glycoside	0,0240798 2
55	Undecanedioic acid	12.16	215.129 73	Dicarboxylic acid	0,0562051
56	4-hydroxy-3-(3- methylbut-2- enyl)benzoic acid	15.39	205.087 07	Prenylated phenolic acid	0,2803094 9
57	(11E,15Z)-9,10,13- Trihydroxyoctadeca- 11,15-dienoic acid	19.81	327.217 92	Oxylipin / polyhydroxylated fatty acid	0,11947587

*Retention time (Rt) in minutes.

Importantly, the pharmacological potential of MFM should not be attributed exclusively to flavonoids and phenolic acids. Coumarin-related metabolites, including fraxin, fraxetin, cis-melilotoside, and 6-hydroxy-7-methoxycoumarin, were detected in the extract. The latter represented one of the most abundant non-flavonoid constituents of MFM (3.46%), suggesting that coumarins may also contribute to the biological activity of the extract. Coumarins and hydroxylated/methoxylated coumarin derivatives have been widely described as natural compounds with anti-inflammatory, antioxidant, and antimicrobial properties, often associated with modulation of inflammatory mediators and oxidative stress [36]. Thus, the presence of these metabolites broadens the pharmacological interpretation of MFM beyond the phenolic/flavonoid fraction.

Iridoid-related compounds, including asperulosidic acid and peltatoside, were also identified, which is consistent with the occurrence of iridoids as chemotaxonomic markers frequently reported in species of the Rubiaceae family [37]. Although asperulosidic acid was detected at lower relative abundance, this iridoid glycoside has been described as an anti-inflammatory compound capable of suppressing NF- κ B and MAPK signaling pathways in LPS-stimulated macrophages [38]. Other metabolites detected in MFM, such as quinic acid and salicylic acid, may also act as complementary contributors within the phytochemical matrix. Quinic acid has been associated with antibiofilm effects in bacterial models, whereas salicylic acid-related compounds and acetylsalicylic acid have been reported to interfere with *Candida albicans* biofilm formation and to enhance the activity of antifungal drugs in combination approaches [39].

Finally, the detection of lariciresinol, a lignan derivative, further supports the chemical diversity of MFM. Although present at lower relative abundance, lariciresinol is pharmacologically relevant because lignans are recognized as bioactive natural products with antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial, and antibiofilm properties [40]. Specifically, (+)-lariciresinol has demonstrated inhibitory effects against bacterial pathogens, and lignan-containing natural products have been reported to interfere with microbial biofilm formation [41]. Therefore, the LC–MS/MS profile suggests that the biological activity of MFM likely results from the combined contribution of multiple chemical classes, including flavonol glycosides, hydroxycinnamic acid derivatives, coumarins, iridoids, lignans, salicylates, and organic acid derivatives. This chemical diversity supports the interpretation of MFM as a phytocomplex and reinforces its potential applicability as a multifunctional bioactive component for antifungal polymeric systems intended for mucosal administration.

3.2 Determination of the Minimal Inhibitory Concentration (MIC)

The minimum inhibitory concentration (MIC) assay was performed to measure the antifungal activity of the methanolic extract of *Mitracarpus frigidus* (MFM) against 52 *Candida albicans* strains, including two reference strains: one drug-susceptible (ATCC® 24433™) and one drug-resistant (ATCC® 10231™), as well as 50 clinical isolates: three vulvovaginal, one oropharyngeal, and 46 recovered from critically ill COVID-19 patients with acute respiratory distress syndrome (Table 2).

Table 2: Minimum inhibitory concentration (MIC) of the methanolic extract of *Mitracarpus frigidus* (MFM) and nystatin (positive control) against *Candida albicans* strains.

<i>Candida</i> strains	Nistatin*	MFM*
ATCC® 10231™	2.50	62.50
ATCC® 24433™	2.50	250.00
vv1	5.00	250.0
vv2	5.00	1000.00
vv3	5.00	1000.00
O.2	5.00	1000.00
149	2.50	1000.00
1021	5.00	1000.00
143	5.00	1000.00
141	2.50	1000.00
1014	2.50	250.00
1045	5.00	1000.00
26	5.00	500.00
28	2.50	500.00
89	5.00	250.00
32	5.00	500.00
1150	5.00	500.00
110	5.00	>1000.00
1154	5.00	>1000.00
1104	5.00	500.00
1028	5.00	500.00
1036	5.00	250.00
1026	5.00	>1000.00
2211	5.00	1000.00
1137	5.00	500.00
1015	5.00	125.00
1037	5.00	250.00
121	5.00	1000.00
125	2.50	1000.00
142	5.00	>1000.00
1051	5.00	500.00
1070	5.00	1000.00
1073	5.00	500.00
35	5.00	250.00
93	5.00	500.00
95	5.00	250.00
107	5.00	250.00
109	5.00	1000.00
1156	5.00	1000.00
1190	10.00	1000.00
1223	5.00	1000.00
1106	10.00	>1000.00
1139	5.00	1000.00
1083	5.00	1000.00
1084	5.00	1000.00

1090	5.00	1000.00
1085	5.00	1000.00
1101	5.00	250.00
1155	5.00	500.00
1078	5.00	500.00
1174	5.00	1000.00
1193	5.00	1000.00

*Values in µg/mL.

The inclusion of diverse strains aimed to enhance the relevance of the study. Strains obtained from COVID-19 patients were selected due to their clinical importance, as this population is highly susceptible to invasive *Candida* infections and multidrug-resistant strains [42,43]. In addition, the oral and vaginal isolates were included to represent sites commonly associated with mucocutaneous candidiasis [44]. Along with the ATCC reference strains, this strategy enabled a comprehensive evaluation of MFM activity.

MFM inhibited growth of 47 strains, with MIC values ranging from 62.50 to 1000.00 µg/mL, including 45 clinical isolates. The reference strains ATCC® 10231 and ATCC® 24433 exhibited MIC values of 62.50 µg/mL and 250.00 µg/mL, respectively.

As expected, the MIC data obtained in this study demonstrates a promising antifungal potential for MFM, as it was able to inhibit the growth of 90.6% of the tested strains. It is known that MIC values up to 1000.00 µg/mL are generally reported for bioactive plant extracts and are considered indicative of relevant in vitro antimicrobial activity [45]. Furthermore, 24 strains, including the multidrug-resistant ATCC® 10231, exhibited significant or moderate activity, with MIC values between 100 and 625 µg/mL [46].

These findings corroborate previous studies demonstrating the antifungal activity of *M. frigidus* against *C. albicans*, including strains resistant to conventional antifungals [47]. The antifungal effect of MFM can be attributed to its phytochemical composition, including polyphenols, flavonoids such as rutin, quercetin and kaempferol, phenolic acids such as chlorogenic acid, and pentacyclic triterpenoids [10,22,48]. The antimicrobial potential of these compounds is already well established in the literature, particularly through mechanisms involving action on the cell envelope and oxidative imbalance [45]. In agreement with this, the LC–MS/MS characterization performed in the present study demonstrated that MFM is mainly composed of flavonol glycosides and hydroxycinnamic acid derivatives, with quercetin-3-O-galactoside, peltatoside, rutin, kaempferol-3-O-glucoside, quercetin, caffeoylquinic acid derivatives, chlorogenic acid and rosmarinic acid among the most relevant detected metabolites. These compounds have been associated with antifungal, antibiofilm and anti-inflammatory

effects, supporting their possible contribution to the inhibitory activity observed against *C. albicans* [26, 27,28].

Importantly, the antifungal activity of MFM should not be interpreted as the result of the action of isolated constituents, but rather because of the complex interaction among multiple bioactive metabolites present within the phytocomplex. Plant extracts containing flavonoids, phenolic acids, coumarins, iridoids, and other secondary metabolites may exhibit enhanced biological effects through complementary mechanisms, including simultaneous interference with fungal membrane organization, oxidative homeostasis, and stress-response pathways. In this context, the presence of different chemical classes in MFM may contribute to a broader and more robust antifungal response than that expected from individual compounds alone. Synergistic or additive interactions among these metabolites could explain the multi-target effects observed in this study, including membrane disruption, mitochondrial dysfunction, oxidative imbalance, and biofilm inhibition. Therefore, the pharmacological potential of MFM is likely associated with the preservation of its chemical complexity rather than the activity of a single marker compound.

Moreover, the detection of non-flavonoid metabolites, including coumarin-related compounds such as fraxin, fraxetin and 6-hydroxy-7-methoxycoumarin, iridoids such as asperulosidic acid and peltatoside, and the lignan lariciresinol, reinforces the chemical diversity of MFM and suggests that the antifungal effect may result from the combined action of multiple bioactive classes [31,32,34,35,40].

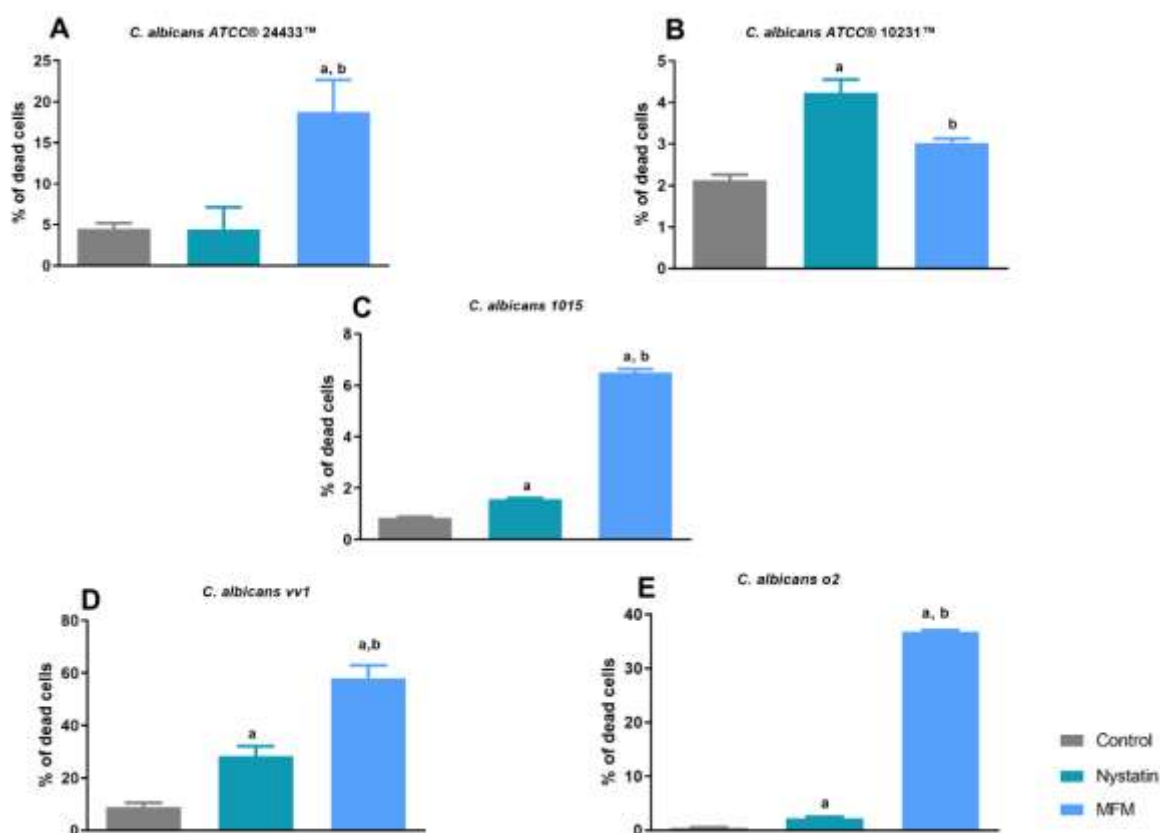
A panel of five *Candida albicans* strains was selected for detailed investigation following a susceptibility screening of 52 fungal strains. This selection comprised two reference strains—the drug-susceptible ATCC® 24433™ and the multidrug-resistant ATCC® 10231™—along with three clinical isolates: *vv1* (vulvovaginal), *o2* (oropharyngeal), and isolate *1015*. The inclusion of strains with diverse susceptibility profiles and anatomical origins ensured a robust framework for a comprehensive antifungal evaluation. Furthermore, clinical isolates exhibiting lower minimum inhibitory concentration (MIC) values were prioritized for subsequent mechanistic assays, enabling the assessment of antifungal activity across strains with distinct biological and clinical characteristics.

3.3 Membrane Integrity Assay

3.3.1 *Dynamic Detection of Cell Death Using Flow Cytometry*

The effect of MFM on fungal cell membrane integrity was evaluated by confocal microscopy using the fluorescent dye propidium iodide (PI) after 12 h of treatment. All *Candida albicans* strains treated with MFM showed a significant increase in the proportion of PI-positive cells compared with the growth control ($p < 0.05$) (Figure 1). The highest level of cell death was observed in the vulvovaginal isolate (*vv1*), with approximately 60% PI-positive cells, followed by the oropharyngeal isolate (~40%), the drug-susceptible strain ATCC® 24433™ (~20%), and the clinical isolate 1015 (~8%), whereas the lowest level was observed in ATCC® 10231™ (~3%).

Figure 1: Effect of MFM and nystatin on membrane integrity of *Candida albicans* strains assessed by propidium iodide uptake after 12 h of treatment. a) % of death *C. albicans* ATCC® 24433™ cells; b) % of death *C. albicans* ATCC® 10231™ cells; c) % of death *C. albicans* 1015 cells; d) % of death *C. albicans* *vv1* cells; e) % of death *C. albicans* *o2* cell. Statistical analysis performed by ANOVA followed by Bonferroni test: a – Statistical difference in relation to growth control ($p < 0.05$); b – Statistical difference in relation to Nystatin ($p < 0.05$).



Nystatin treatment also resulted in a significant increase in PI uptake compared with the growth control in all strains except ATCC® 24433™. However, the percentage of PI-positive

cells was consistently lower than that observed with MFM, except for ATCC® 10231™, where nystatin induced slightly higher levels (~4%) compared with MFM (~3%).

3.3.2 Sorbitol Protection and Ergosterol Effect Assay

The sorbitol protection assay and the exogenous ergosterol binding test were performed to assess the potential interaction of MFM and amphotericin B with the fungal cell envelope. MIC values for MFM and amphotericin B were determined in the presence of 0.8 M sorbitol or 400.00 µg/mL exogenous ergosterol against *Candida albicans* strains (Table 3).

Table 3: Minimum inhibitory concentration (MIC) of the methanolic extract of *Mitracarpus frigidus* (MFM) in the sorbitol protection and exogenous ergosterol binding assays against *Candida albicans* strains: susceptible *C. albicans* (ATCC® 24433™), resistant *C. albicans* (ATCC® 10231™), *C. albicans* vv1, and *C. albicans* 1015.

<i>Candida</i> strains	Minimum inhibitory concentration (MIC)					
	MFM*			Amphotericin*		
		Sorbitol	Ergosterol		Sorbitol	Ergosterol
<i>C.a.</i> Resistant	62.50	>4000.00	>4000.00	0.007	0.007	0.25
<i>C.a.</i> Susceptible	250.00	>4000.00	>4000.00	0.015	0.015	0.25
<i>C.a. vv1</i>	250.00	>4000.00	>4000.00	0.007	0.007	0.25
<i>C.a o2</i>	1000.00	>4000.00	>4000.00	0.007	0.007	0.25
<i>C.a</i> 1015	125.00	>4000.00	>4000.00	0.015	0.015	0.25

*Values in µg/mL.

For MFM, MIC values range from 62.50 to 1000.00 µg/mL under standard conditions. In the presence of sorbitol or exogenous ergosterol, MIC values increased to >4000.00 µg/mL for all tested strains.

For amphotericin B, MIC values under standard conditions ranged from 0.007 to 0.015 µg/mL. As expected, the addition of sorbitol did not alter MIC values, while the presence of exogenous ergosterol increased MIC to 0.25 µg/mL in all strains tested.

When comparing the results of propidium iodide (PI) staining with sorbitol and ergosterol assays, it is possible to observe that the cell envelope of *Candida albicans* is one of the main targets of MFM. The increase in MIC values in the presence of sorbitol shows that treatment with MFM compromises the integrity of the cell wall, since sorbitol acts as an osmotic protector that stabilizes fungal cells even in the presence of envelope damage [49,50,51]. On the other hand, the partial reversal of antifungal activity in the presence of exogenous ergosterol

suggests that MFM also acts by interacting with membrane sterols, indicating that the extract affects the fungal plasma membrane [52,53]. Taken together, these findings indicate that MFM does not act through a single target, but acts simultaneously on the cell wall and membrane, which may reduce the adaptive capacity and resistance mechanisms of fungal cells. This initial membrane destabilization may represent a triggering event that propagates secondary intracellular effects, including oxidative imbalance and mitochondrial dysfunction.

This multi-target activity is corroborated by the phytochemical composition of MFM. Flavonoids present in the extract, such as quercetin, rutin, and kaempferol, as well as phenolic compounds, including chlorogenic acid, have been described as capable of interacting with membrane proteins and lipids, increasing permeability and altering bilayer fluidity, ultimately leading to loss of ionic homeostasis and intracellular leakage [54,55]. Polyphenolic extracts, such as propolis, have been shown to promote simultaneous damage to the cell membrane and cell wall of *Candida albicans*, resulting in increased permeability and cytoplasmic leakage [56]. Similarly, extracts rich in phenolic compounds, including those derived from *Punica granatum*, have been associated with membrane disruption and oxidative stress, contributing to reduced fungal viability [57].

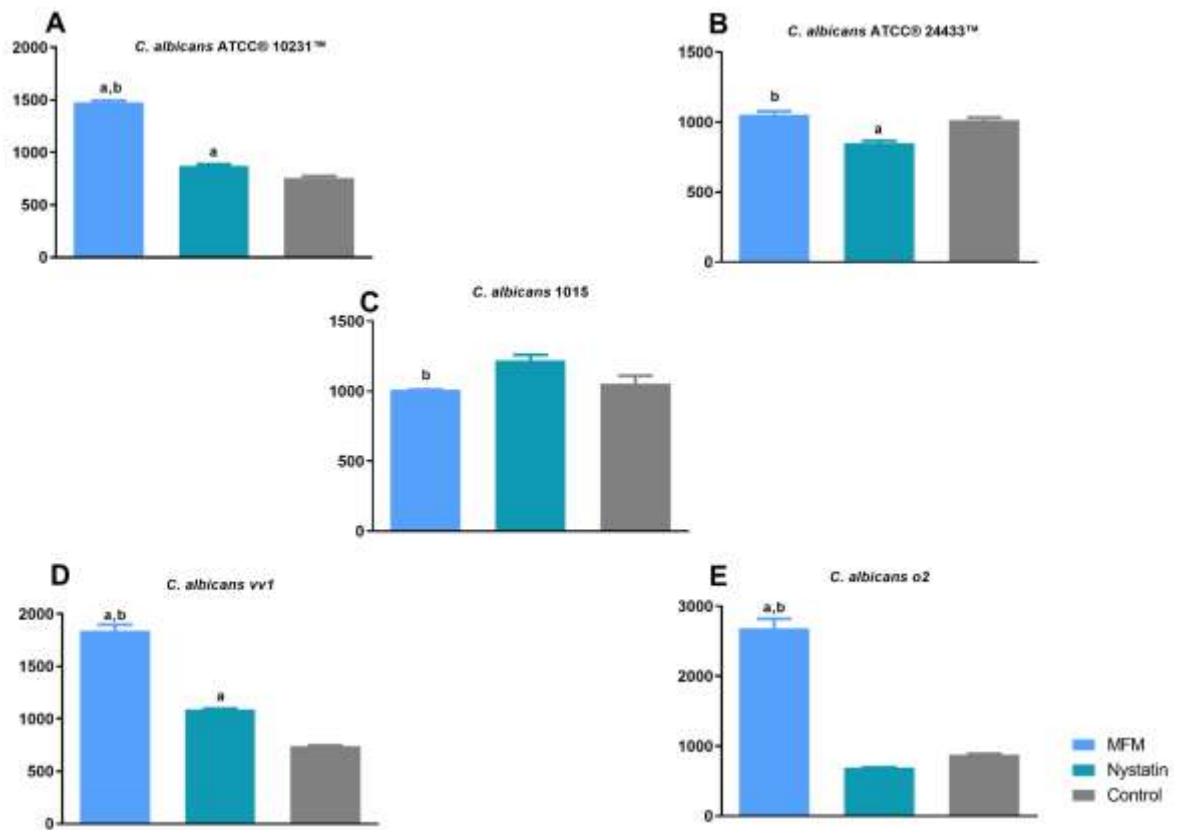
Interestingly, strains that exhibited higher tolerance during early time points, such as *C. albicans* ATCC® 10231™ and the clinical isolate 1015, showed low PI positivity after 12 h of exposure, suggesting a more effective initial response to membrane damage. However, these isolates also increase MIC values in the presence of sorbitol and ergosterol, similarly to the other strains, confirming that the cell envelope remains a relevant target. This apparent temporal discrepancy suggests that, in these isolates, damage to the cell wall and membrane may occur more gradually but still culminates in loss of viability at later time points, as supported by growth kinetics assay (Figure 8).

3.4 Reactive Oxygen Species Production and Determination of Mitochondrial Membrane Potential ($\Delta\Psi_m$)

Intracellular reactive oxygen species (ROS) production was evaluated to investigate the oxidative stress as a potential antifungal mechanism of MFM, since ROS accumulation is known to contribute to cellular damage and fungal cell death [58]. ROS levels were determined by fluorescence using the DCFH-DA probe after treatment. Three *Candida albicans* strains showed a significant increase in ROS production after treatment with MFM. *C. albicans* ATCC® 24433™ exhibited an increase of approximately 95.7%, *wl* of 148.4%, and *o2* of

205.5%. Nystatin also induced ROS production in ATCC® 24433™ (15.3%) and *vvI* (47.2%), although at significantly lower levels than MFM ($p < 0.05$). No significant changes in ROS levels were observed in ATCC® 10231™ or 1015 under either treatment ($p < 0.05$) (Figure 2).

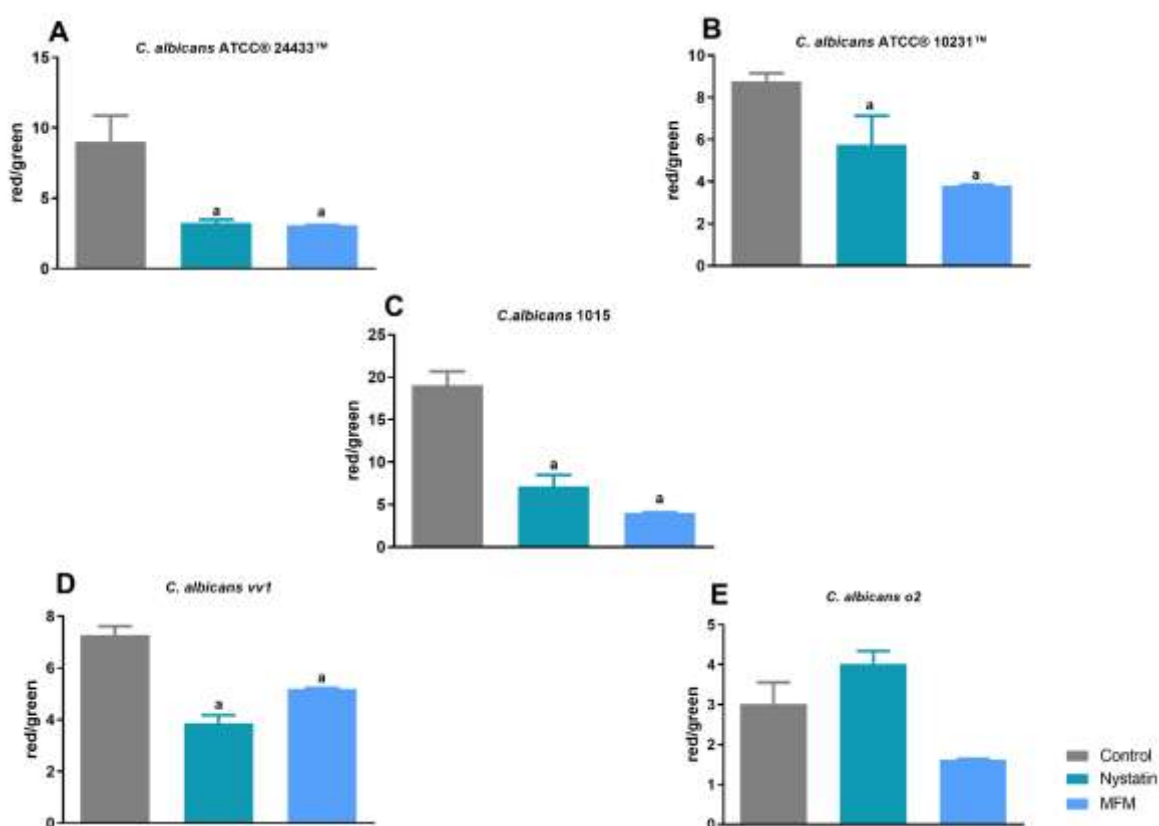
Figure 2: Effect of MFM and nystatin on intracellular ROS production in *C. albicans* strains measured by DCFH-DA fluorescence after treatment. a) ROS of *C. albicans* ATCC® 24433™ cells; b) ROS of *C. albicans* ATCC® 10231™ cells; c) ROS of *C. albicans* 1015 cells; d) ROS of *C. albicans* *vvI* cells; e) ROS of *C. albicans* *o2* cell. Statistical analysis performed by ANOVA followed by Bonferroni test: a – Statistical difference in relation to growth control ($p < 0.05$); b – Statistical difference in relation to Nystatin ($p < 0.05$).



Mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) was measured by fluorescence using JC-1 probe, to investigate mitochondrial function. Changes in the $\Delta\Psi_m$ is an indicator of mitochondrial dysfunction and an early event associated with apoptosis-like cell death in fungi [59]. MFM treatment promoted a significant reduction in $\Delta\Psi_m$ across all strains tested ($p < 0.05$), with decreases of 56.6% in *C. albicans* ATCC® 24433™, 66.7% in ATCC® 10231™, 28.5% in *vvI*, 53.6% in *o2*, and 78.9% in 1015. Nystatin produced a similar depolarization

profile, with no significant differences compared with MFM, except for *C. albicans* o2, in which only MFM induced a significant decrease relative to the growth control ($p < 0.05$) (Figure 3).

Figure 3: Effect of MFM and nystatin on mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) in *Candida albicans* strains assessed by JC-1 fluorescence. a) red/green of *C. albicans* ATCC® 24433™ cells; b) red/green of *C. albicans* ATCC® 10231™ cells; c) red/green of *C. albicans* 1015 cells; d) red/green of *C. albicans* vv1 cells; e) red/green of *C. albicans* o2 cell. Statistical analysis performed by ANOVA followed by Bonferroni test: a – Statistical difference in relation to growth control ($p < 0.05$).



ROS (DCFH-DA) and JC-1 assays were performed 12 hours after treatment with MFM. The results demonstrated a significant increase in intracellular reactive oxygen species, as well as a significant reduction in the mitochondrial membrane potential of *Candida albicans* cells. These parameters are important for identifying oxidative stress associated with mitochondrial dysfunction in yeast [54,60]. The combination of ROS accumulation and loss of mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) has been described as an important pharmacological target because it causes loss of viability and is frequently associated with apoptosis [61]. Therefore, ROS production should not be interpreted as an isolated mechanism but rather as part of a progressive

cascade initiated by fungal envelope disruption. These events could be visualized by transmission electron microscopy (Figures 4-7).

Interestingly, although phenolic compounds are widely recognized for their antioxidant properties in mammalian systems, several flavonoids and polyphenol-rich extracts exhibit a context-dependent pro-oxidant effect in fungal cells. This apparent paradox has been increasingly recognized as an important antifungal mechanism, in which phenolic metabolites promote intracellular redox imbalance, excessive ROS accumulation, and oxidative damage to essential cellular structures. The presence of flavonoids such as quercetin, kaempferol derivatives, and hydroxycinnamic acid derivatives in MFM may contribute to this effect by interfering with redox homeostasis and amplifying oxidative stress beyond the fungal antioxidant capacity. Therefore, the ROS increase observed after MFM exposure should not be interpreted as a nonspecific consequence of cellular damage, but rather as an active component of the antifungal mechanism triggered by the phytochemical complexity of the extract.

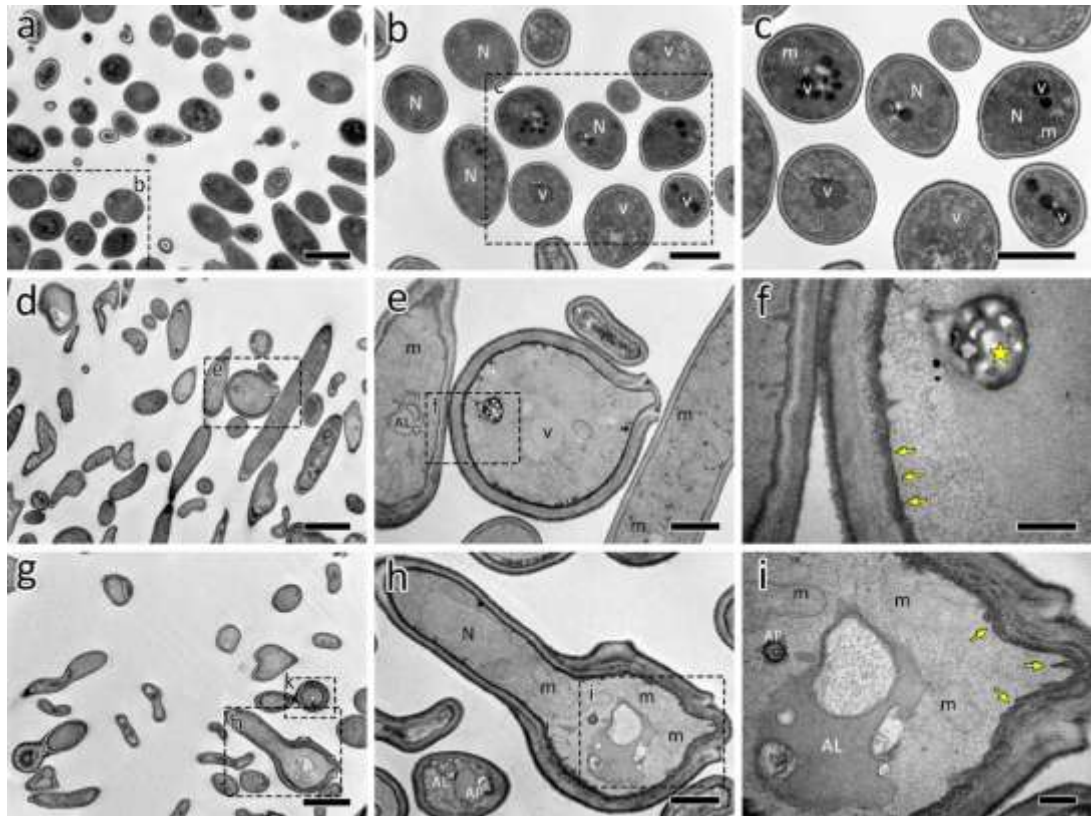
A distinct response profile was observed for *C. albicans* ATCC® 10231™ and the clinical isolate 1015. Both strains exhibited attenuated oxidative responses at 12 h compared to the other strains, suggesting a greater initial capacity to preserve membrane integrity and modulate redox imbalance. Multidrug-resistant *C. albicans* strains have demonstrated enhanced stress adaptation mechanisms, including modulation of oxidative stress responses and efflux systems, which may temporarily attenuate antifungal-induced damage [62]. Similar effects have been reported for other polyphenol-rich plant extracts. *Annona muricata* L. (soursop) extract demonstrated antifungal activity associated with membrane permeabilization and reduced viability in *Candida* spp [61]. This strain-dependent variability highlights the importance of considering fungal adaptive responses, including antioxidant defense systems and stress tolerance pathways, when evaluating the activity of complex phytochemical mixtures.

3.5 Morphological Analysis by Transmission Electron Microscopy (TEM)

Transmission electron microscopy provided important ultrastructural evidence supporting the biochemical findings obtained from ROS and mitochondrial membrane potential assays. Since mitochondrial dysfunction is considered one of the earliest events associated with fungal programmed cell death, TEM analysis allowed the visualization of structural alterations compatible with oxidative injury and apoptosis-like processes, thereby strengthening the mechanistic interpretation of MFM antifungal activity.

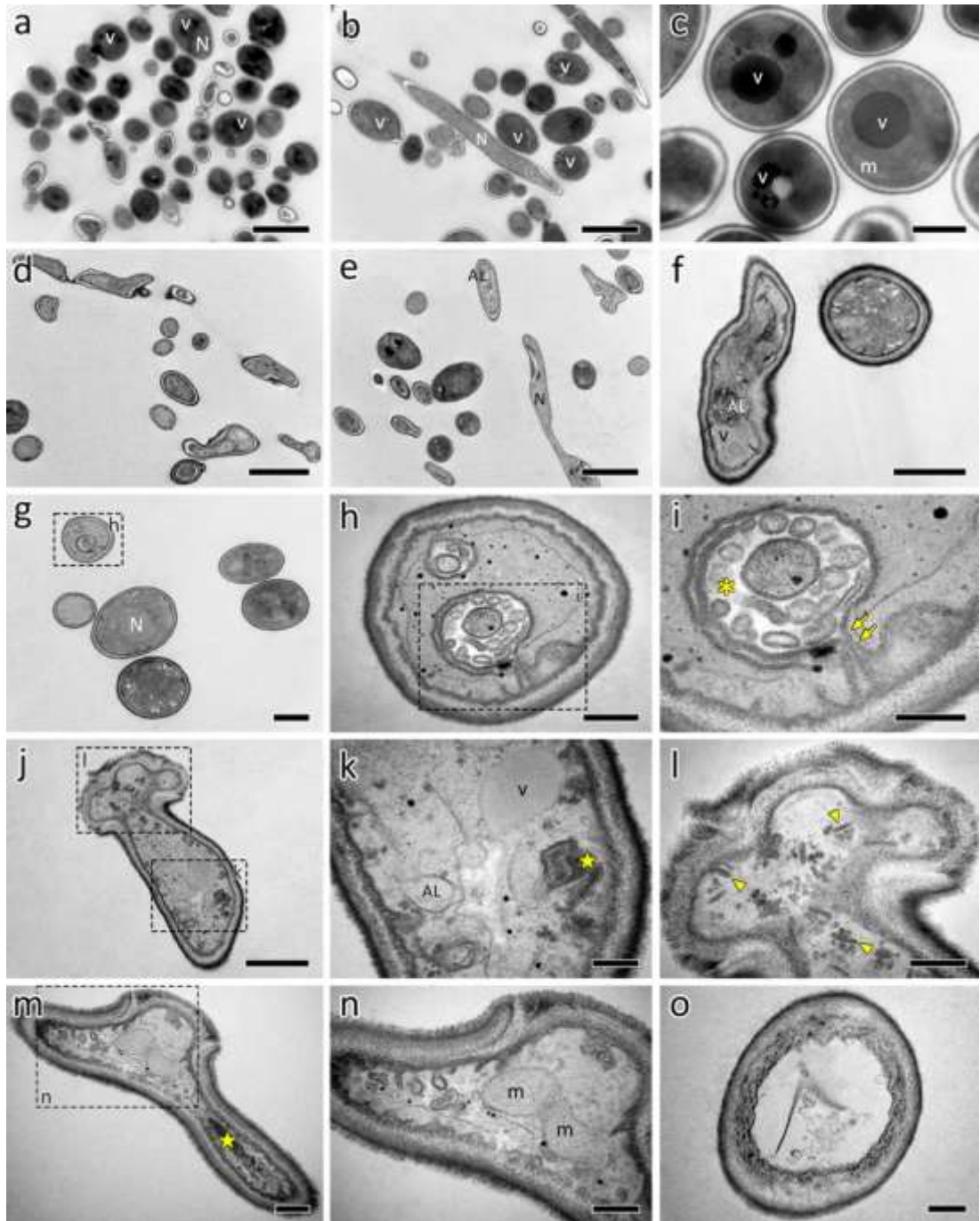
Ultrastructural alterations induced by MFM were evaluated by transmission electron microscopy (TEM) after 12 h of treatment. Untreated cells of the drug-susceptible reference strain *Candida albicans* ATCC® 24433™ (C.a.S) exhibited preserved morphology, characterized by homogeneous cytoplasm, well-defined plasma membrane and cell wall, and regularly shaped organelles, including vacuoles, nuclei, and mitochondria. The cytoplasm appeared dense, with no evidence of cellular damage or degeneration (Figure 4a–c). Post-treatment, an increase in the proportion of hyphae was observed, with numerous cells exhibiting widespread cytoplasmic rarefaction, increased vacuolization, and internal disorganization. Autophagic vacuole-like structures indicative of autophagic degeneration was frequently detected, along with fingerprint-like multilayer concentric membranous profiles and elongated or swollen mitochondria. The plasma membrane exhibited increased electron density and structural irregularities suggestive of detachment from the cell wall (Figure 4d–i). Higher-magnification analysis of treated *C. albicans* cells revealed degenerated organelles, multivesicular bodies (MVBs), and widened periplasmic spaces containing fibrillar material (Figure 5).

Figure 4: Ultrastructural aspects of *Candida albicans* sensitive strain (ATCC 24433, C.a.S) after MFM treatment. (a–c) Untreated control cells displaying intact morphology, homogeneous cytoplasm, preserved organelles, and well-defined plasma membrane and cell wall. (d–i) Treated cells presenting increase proportion of hyphae, reduced cytoplasmic density and increased vacuolization. (e, f) Cell with a large vacuole (v), electron-dense material at the plasma membrane, partial detachment of the plasma membrane from the cell wall (arrows), and a fingerprint-like multilayer concentric membranous profile (star). (h, i) Hypha with swollen mitochondria (m), autophagic vacuole-like structures (AV). N = nucleus. Scale bars = 4 μm (a, d, g), 2 μm (b, c), 1 μm (e, h), 0,3 μm (f, i).



Comparable ultrastructural alterations were identified in *C. albicans* resistance reference strain (ATCC® 10231) (Figure 6) and in all clinical isolates (C.a.o2, C.a.vv1, C.a.1015) (Figure 7). Notably, treated reference strain and clinical isolates presented cells with marked depleted cytoplasm (Figures 6o, 7q, r), some exhibiting clear loss of plasma membrane integrity, consistent with necrosis (Figures 7s, t)

Figure 5: Ultrastructural aspects of *Candida albicans* sensitive strain (ATCC 24433, C.a.S) after MFM treatment. Treated cells exhibit intense vacuolization, fingerprint-like multilayer concentric membranous profile (stars), autophagic vacuole-like structures (AV), multivesicular bodies (asterisks), degenerated organelles such as the nucleus (N) and mitochondria (m), and thickened and fibrillated cell wall (CW) (a–p). Arrow indicates a plasma membrane invagination forming a multivesicular body (n), while diamond indicates an unidentified degenerated organelle. v = vacuole. Scale bars = 1 μ m (a, d, j, o), 0,3 μ m (g, h, k–m, p), 0,1 μ m (b, c, e, f, i, n).

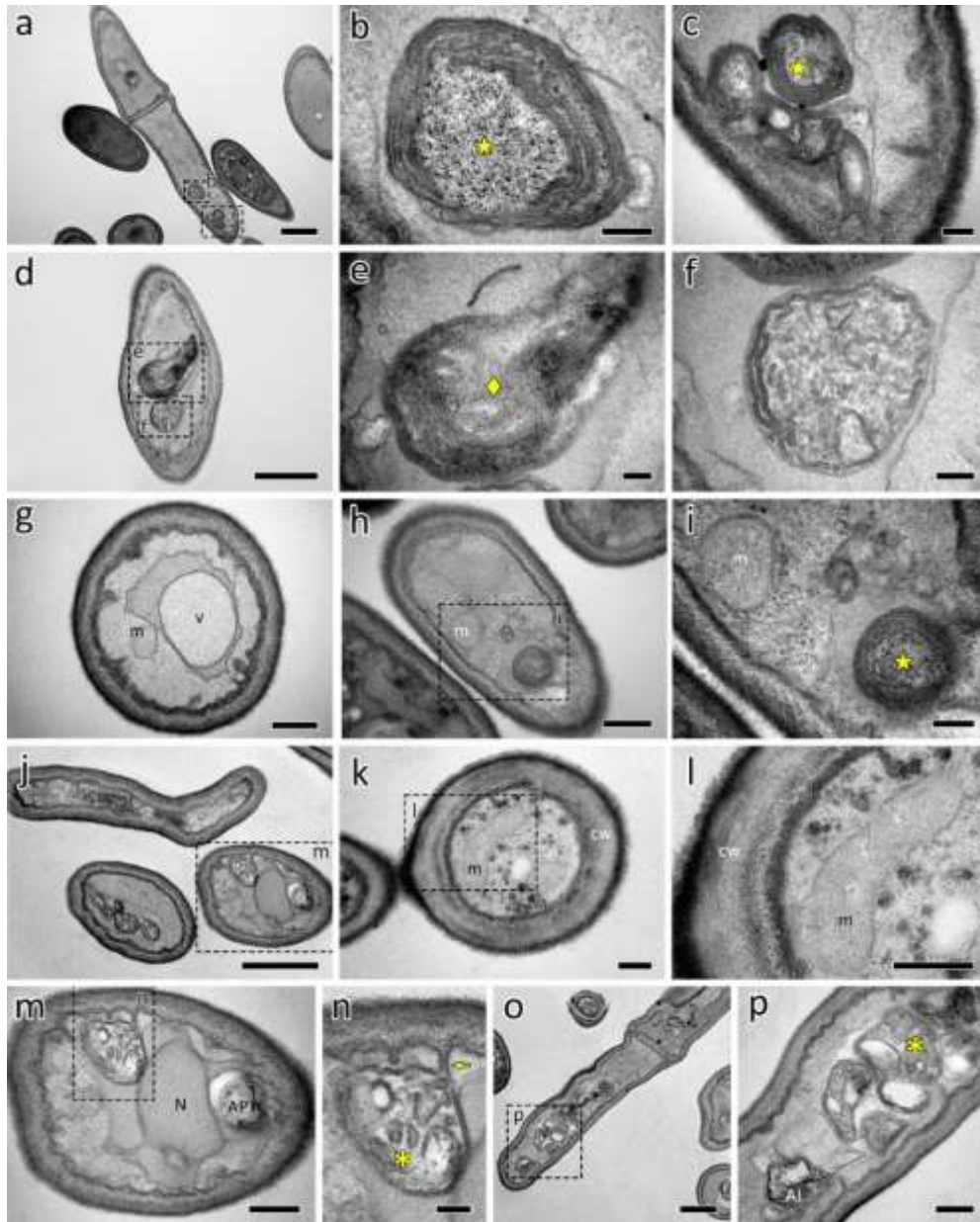


These findings are consistent with previous studies, which have shown that antifungal agents frequently act on the cell envelope, promoting wall thickening, membrane irregularities, and wall-membrane separation [63,64]. Furthermore, these results corroborate with the functional data obtained in protection assays with sorbitol and ergosterol, supporting the interpretation that MFM compromises both the integrity of the cell wall and the stability associated with membrane sterols.

In addition to envelope damage, the treated cells also presented multivesicular bodies, concentric multilamellar membrane structures ("fingerprint-shaped"), and mitochondria with

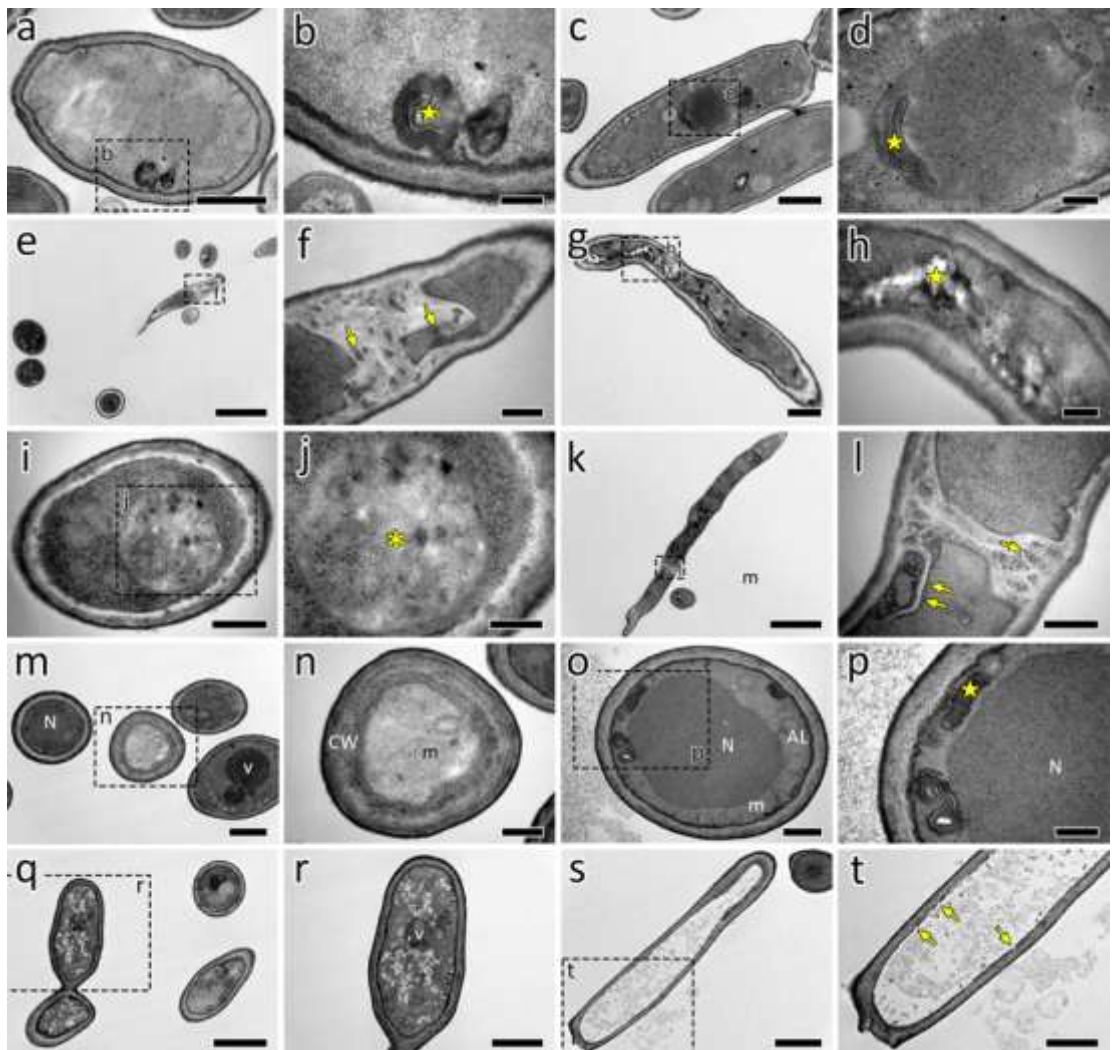
altered morphology, including swelling, elongation, and signs of structural disruption. Similar mitochondrial morphological alterations have been reported in *Candida albicans* cells exposed to oxidative conditions or antifungal agents that target mitochondrial function [65,66]. The presence of structures compatible with autophagic vacuoles further reinforces the activation of adaptive stress pathways, since autophagy is frequently reported in processes involving metabolic stress [67].

Figure 6: Ultrastructural aspects of *Candida albicans* resistance strain (ATCC 10231, C.a.R) after MFM treatment. (a–c) Untreated control cells with intact wall and membrane, normal vacuoles (v), and preserved mitochondria (m). (d–o) Treated cells showing severely altered morphology with irregular shapes, rarefied cytoplasm, extensive vacuolization, and degenerated organelles. (f–i) Cells containing autophagic vacuole-like structures (AV) and multivesicular bodies (asterisks). Arrows indicate a possible plasma membrane invagination forming a multivesicular body (i). (j–n) Cells with abnormal morphology, cytoplasmic tubular structures (arrowheads), concentric membranous profile (stars), degenerated mitochondria, and AV. (o) Cell with depleted cytoplasmic content, irregular membrane, and thick and fibrillated wall. N = nucleus. Scale bars = 4 μm (a, b, d, e), 1 μm (c, f, g, j), 0,3 μm (h, l, m, o), 0,2 μm (i, k, n).



The coexistence of autophagic vacuoles and MVBs in treated cells may reflect the convergence of autophagic and endosomal pathways, a well-documented crosstalk in eukaryotes in which autophagosomes fuse with MVBs to form amphisomes prior to vacuolar delivery [68]. In fungi, MVBs are established precursors of extracellular vehicles (EVs): upon fusion of MVBs with the plasma membrane, intraluminal vesicles are released as exosomes to the extracellular space [69]. *C. albicans* is a recognized producer of EVs carrying virulence factors and immunomodulatory cargo [70], and the plasma membrane invaginations observed in treated cells (Figure 5n and 6i) are morphologically consistent with endocytic events initiating this pathway. Whether MFM stimulates or dysregulates EV biogenesis as part of a stress response warrants further investigation.

Figure 7: Ultrastructural aspects of *Candida albicans* clinical isolates after MFM treatment. Treated cells display altered morphology, autophagic vacuole-like structures (AV), fingerprint-like multilayer concentric membranous profile (stars), multivesicular bodies (asterisks), degenerated organelles, cell wall (CW) thickening and fibrillation, and depleted cytoplasm in (a–d) vaginal (C.a.V), (e–l) COVID-19-patient (C.a.1015), and (m–t) oral isolates (C.a.O). Arrows indicate intense vesiculation in cytoplasm (f) and periplasmic spaces (l), or plasma membrane discontinuities (t). N = nucleus, m = mitochondria, v = vacuole. Scale bars = 4 μm (e, k), 2 μm (q, s), 1 μm (a, c, g, m, r, t), 0,4 μm (f, i, l, n, o), 0,2 μm (b, d, h, j, p).



The ultrastructural alterations herein observed are also consistent with functional evidence of oxidative imbalance and mitochondrial depolarization, as detected by ROS and $\Delta\Psi\text{m}$ assays (Figure 3). The ultrastructural alterations observed by TEM are fully consistent with the biochemical evidence of oxidative stress obtained in the present study (Figure 2). Excessive ROS production is known to promote oxidation of mitochondrial lipids and proteins, resulting in mitochondrial swelling, disruption of cristae architecture, loss of membrane

integrity, and collapse of the electrochemical gradient [60]. These events represent critical steps in mitochondria-mediated fungal programmed cell death and frequently precede the activation of apoptosis-like pathways. Therefore, the simultaneous detection of ROS accumulation, mitochondrial depolarization, and severe mitochondrial ultrastructural alterations provides highly complementary evidence that mitochondrial dysfunction represents one of the central targets of MFM.

Variability among strains was also seen through ultrastructural changes. The multidrug-resistant strain ATCC® 10231™ and the clinical isolate 1015 exhibited comparatively milder initial cytoplasmic depletion and partial mitochondrial preservation, aligning with the responses seen for ROS assay (Figure 2) and dynamic detection of cell death (Figure 1) at 12 h of treatment. However, the detection of autophagic structures and the progressive disorganization of organelles could indicate initial adaptive responses, which may progress to eventual cell collapse [67]. This late degeneration is reaffirmed by the fungicidal kinetics curve observed in cell death assays (Figure 8).

In addition, TEM analysis provides data that reinforces the idea that MFM exerts a multi-target antifungal effect, characterized by the simultaneous disruption of the cell envelope and mitochondrial integrity, corroborating a multifactorial mechanism of action compatible with the polyphenolic and triterpenoid composition of the extract.

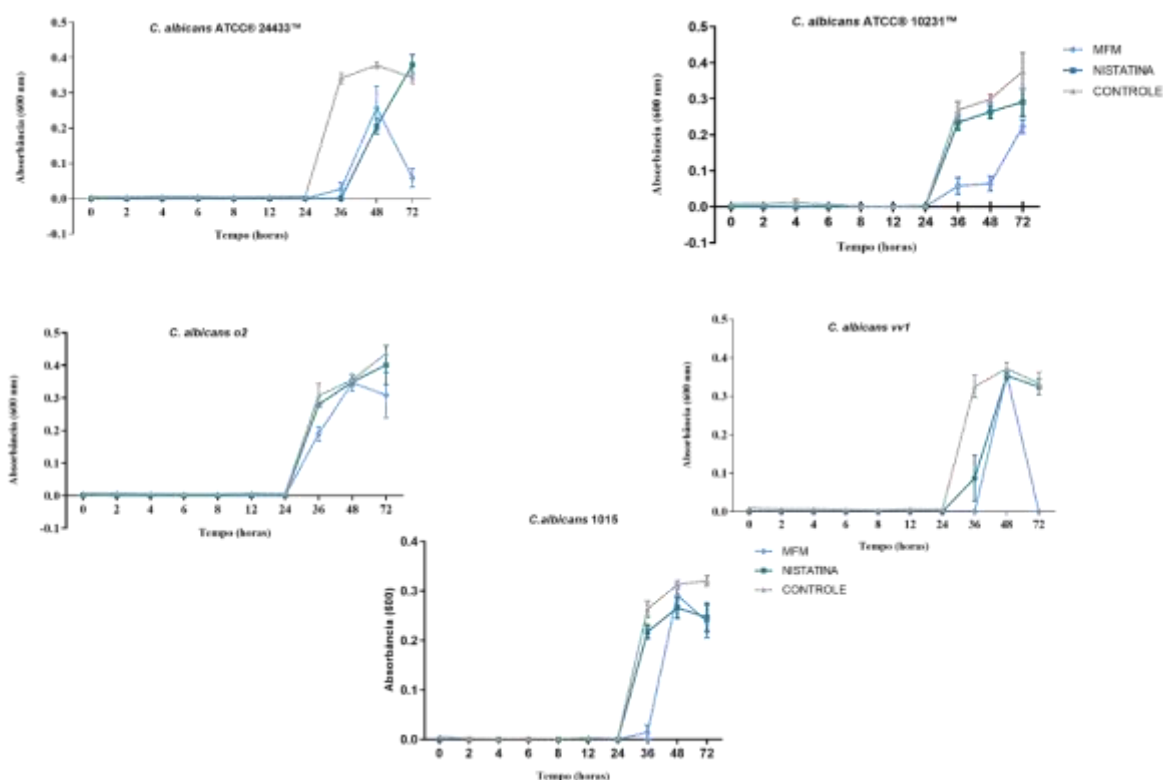
Considering all experimental observations, a mechanistic sequence can be proposed in which MFM initially disrupts fungal cell envelope integrity, promoting increased membrane permeability and oxidative imbalance. ROS accumulation subsequently induces mitochondrial depolarization and structural mitochondrial damage, leading to metabolic failure and activation of programmed cell death pathways. This cascade ultimately culminates in irreversible cellular degeneration, loss of viability, and impairment of biofilm development. Such a multitarget mechanism is particularly attractive from a pharmacological perspective because simultaneous interference with multiple essential cellular processes may reduce the probability of resistance development compared with antifungal agents acting on a single molecular target.

3.6 Growth Kinetics Assay

The growth kinetics assay was performed to characterize the antifungal activity of MFM over time. This approach allows the evaluation of both fungistatic and fungicidal effects, as well as the identification of differences in response profiles among strains. For this purpose,

MFM was compared with nystatin (positive control) and an untreated growth control. Different kinetic behaviors were observed among the five *Candida albicans* strains tested (Figure 8).

Figure 8: Time–kill kinetics of MFM and nystatin against *C. albicans*. a) Time–kill curve of *C. albicans* ATCC® 24433™ cells; b) Time–kill curve of *C. albicans* ATCC® 10231™ cells; c) Time–kill curve of *C. albicans* 1015 cells; d) Time–kill curve of *C. albicans* vv1 cells; e) Time–kill curve of *C. albicans* o2 cell.



For the drug-susceptible strain ATCC® 24433™, the lag phase was maintained across all groups. Both MFM and nystatin delayed the onset of exponential growth from 24 h in the growth control to approximately 36 h. The growth control entered into the decline phase at 48 h, while MFM promoted a significant reduction in viability by 72 h. In contrast, nystatin maintained a prolonged stationary phase, followed by a gradual decline.

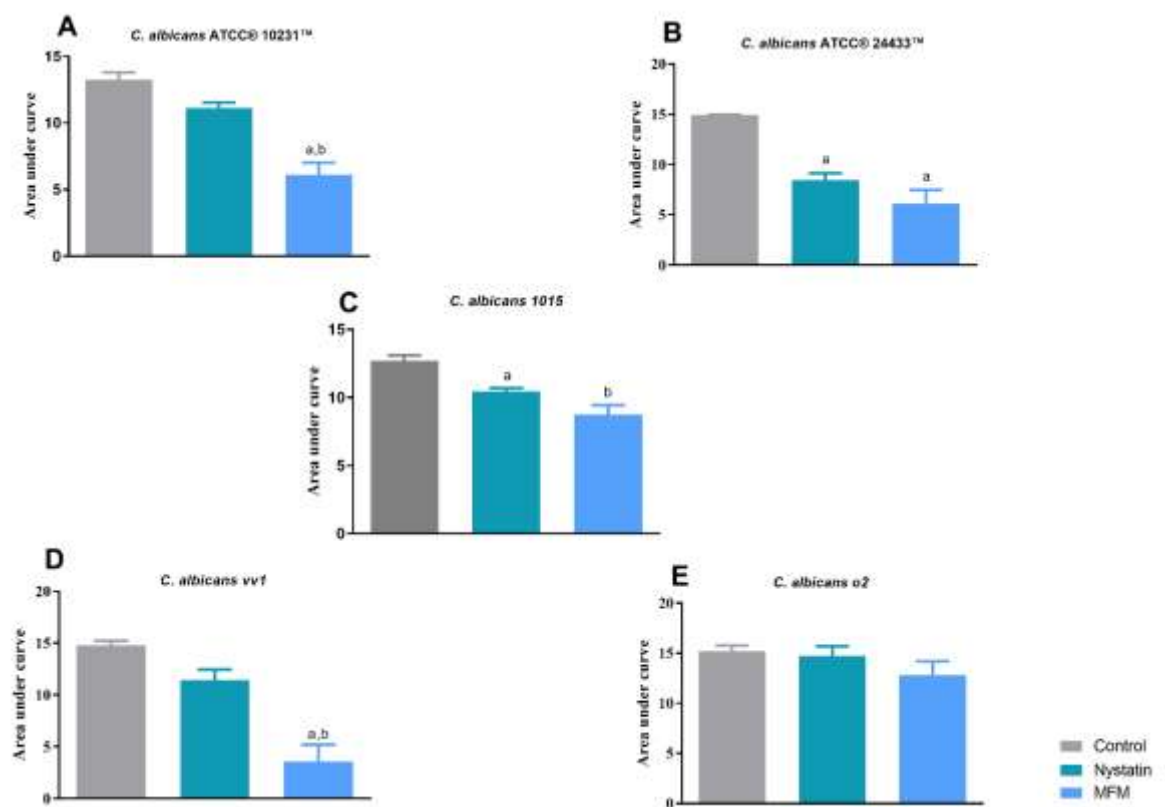
The vulvovaginal isolate (vv1) exhibited a similar behavior. MFM extended the lag phase to 36 h and reduced viability at 72 h, while nystatin caused a limited delay in growth, followed by exponential growth at 36 h and a less pronounced decline thereafter. For the oropharyngeal isolate, all treatments entered the log phase at 24 h. Only MFM induced an early decline, starting at 48 h, while the growth control and nystatin remained in the stationary phase

during this interval. For the multidrug-resistant strain ATCC® 10231™, the growth control and nystatin exhibited similar growth behavior, with exponential growth starting at 24 h. In contrast, MFM delayed exponential growth until 48 h, with minimal proliferation during the first 24 h.

The clinical isolate *C. albicans* 1015 also showed delayed log-phase initiation (~36 h) under MFM treatment, whereas the growth control and nystatin progressed from 24 h. Decline onset occurred at 48 h with MFM, while nystatin maintained stationary growth before a slight decrease.

Area under the curve (AUC) analysis confirmed these observations. Except for the oropharyngeal isolate, MFM yielded significantly lower AUC values compared with the growth control ($p < 0.05$). In the resistant and vulvovaginal isolates, AUC values for MFM were also significantly lower than those obtained with nystatin ($p < 0.05$) (Figure 9).

Figure 9: Area under the time–kill curve (AUC) of MFM and Nystatin against *C. albicans* strains. a) AUC of *C. albicans* ATCC® 24433™ cells; b) AUC of *C. albicans* ATCC® 10231™ cells; c) AUC of *C. albicans* 1015 cells; d) AUC of *C. albicans* vv1 cells; e) AUC of *C. albicans* o2 cell. Statistical analysis performed by ANOVA followed by Bonferroni test: a – Statistical difference in relation to growth control ($p < 0.05$); b – Statistical difference in relation to Nystatin ($p < 0.05$).



The antifungal effect as a function of time was evidenced in death kinetics assays. The growth kinetics observed after treatment with the methanolic extract of *Mitracarpus frigidus* is consistent with the typical mechanisms attributed to polyphenol-rich extracts, since these compounds interact with the fungal cell envelope and membrane-associated proteins, triggering an acute stress response, which explains the prolonged latency phase as the cells activate repair and detoxification pathways [54,71].

This interpretation is observed by ultrastructural analysis, since transmission electron microscopy (Figure 11) revealed that, after 12 h of treatment with MFM, the fungal cells exhibited characteristics consistent with autophagy, a common process associated with adaptation to cellular stress [72]. Furthermore, it is known that membrane disruption and mitochondrial dysfunction impair cellular ATP production and biosynthetic processes, slowing exponential growth [73]. The assays performed in this study corroborate with the literature. In addition, the membrane damage suggested by the assay using propidium iodide (PI) dye indicates premature rupture of the fungal cell envelope.

Furthermore, the increase in intracellular levels of reactive oxygen species (ROS) and the loss of mitochondrial membrane potential, evidenced by the DCFH-DA and JC-1 assays, also corroborate the prolonged latency phase in cells treated with MFM [74]. On the other hand, this oxidative stress can induce damage to membrane proteins, nucleic acids, and lipids, leading to cell death, as seen in the death curve for 4 of the tested strains [75,76].

The variability among strains in the membrane damage response profile, indicated by differences in PI uptake, may be closely correlated with the distinct death kinetics observed among the isolates. This suggests that the susceptibility of each strain to membrane rupture and oxidative stress influences the progression of the initial stress response to irreversible cell damage [77].

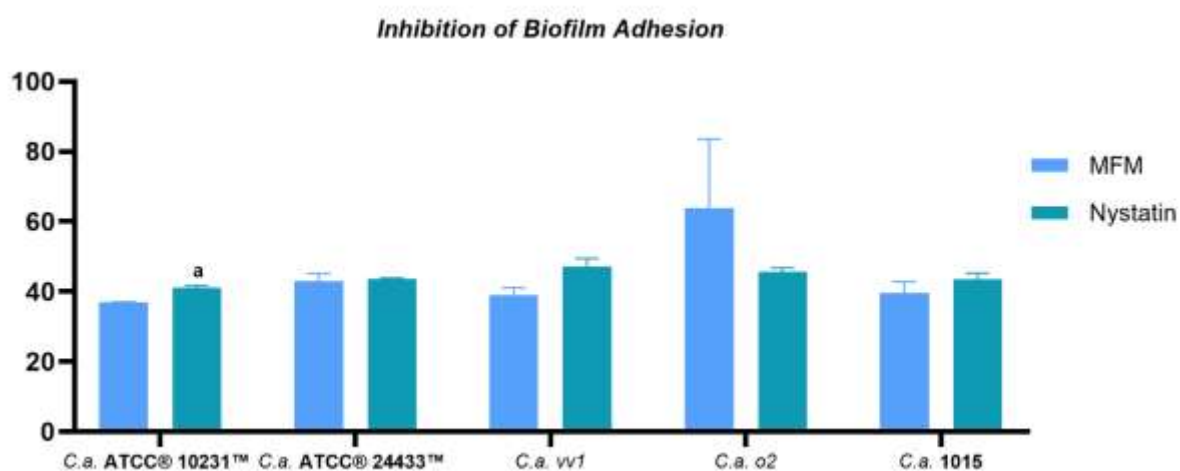
Taken together, these findings indicate that membrane rupture, mitochondrial dysfunction, and ROS-mediated damage act in a coordinated manner. This provides a coherent framework linking the experimental observations of this study to the fungicidal kinetics of MFM, reinforcing its multi-target mode of action.

3.7 Biofilm Inhibition

Two complementary approaches were applied to evaluate the effect of MFM treatment on *C. albicans* biofilms. In the first approach, spectrophotometric analysis of the adhesion phase revealed that MFM reduced biofilm formation in all tested strains. The inhibition rates were

37% for *C. albicans* ATCC® 10231™, 39% for *C. albicans* vv1 and for *C. albicans* 1015, 43% for *C. albicans* ATCC® 24433™, and 63% for *C. albicans* o2. Nystatin treatment also reduced biofilm adhesion, with significance detected only for *C. albicans* ATCC® 10231™ (41%) ($p < 0.05$) (Figure 10).

Figure 10: Effect of MFM and nystatin on the adhesion phase of *C. albicans* biofilm formation measured by spectrophotometric analysis. Statistical analysis performed by ANOVA followed by Bonferroni test: a – Statistical difference in relation to growth control ($p < 0.05$).



Scanning electron microscopy (SEM) was employed to examine the structural organization of *C. albicans* biofilms under different conditions (Figure 11 and 12). Biofilms from the growth control exhibited dense and compact architecture, characterized by a multilayered network of hyphae and pseudohyphae, with abundant extracellular matrix covering the substratum. In contrast, biofilms treated with MFM displayed a visibly reduced surface coverage, with sparse filamentous structures, disrupted three-dimensional organization, and large areas of exposed substratum. Treated samples also showed cells with collapsed or irregular morphology and the presence of cellular debris, indicating a marked loss of structural integrity compared with the growth control.

Figure 11. Scanning electron microscopy (SEM) of *C. albicans* biofilms after treatment with MFM compared with growth control 5000x.

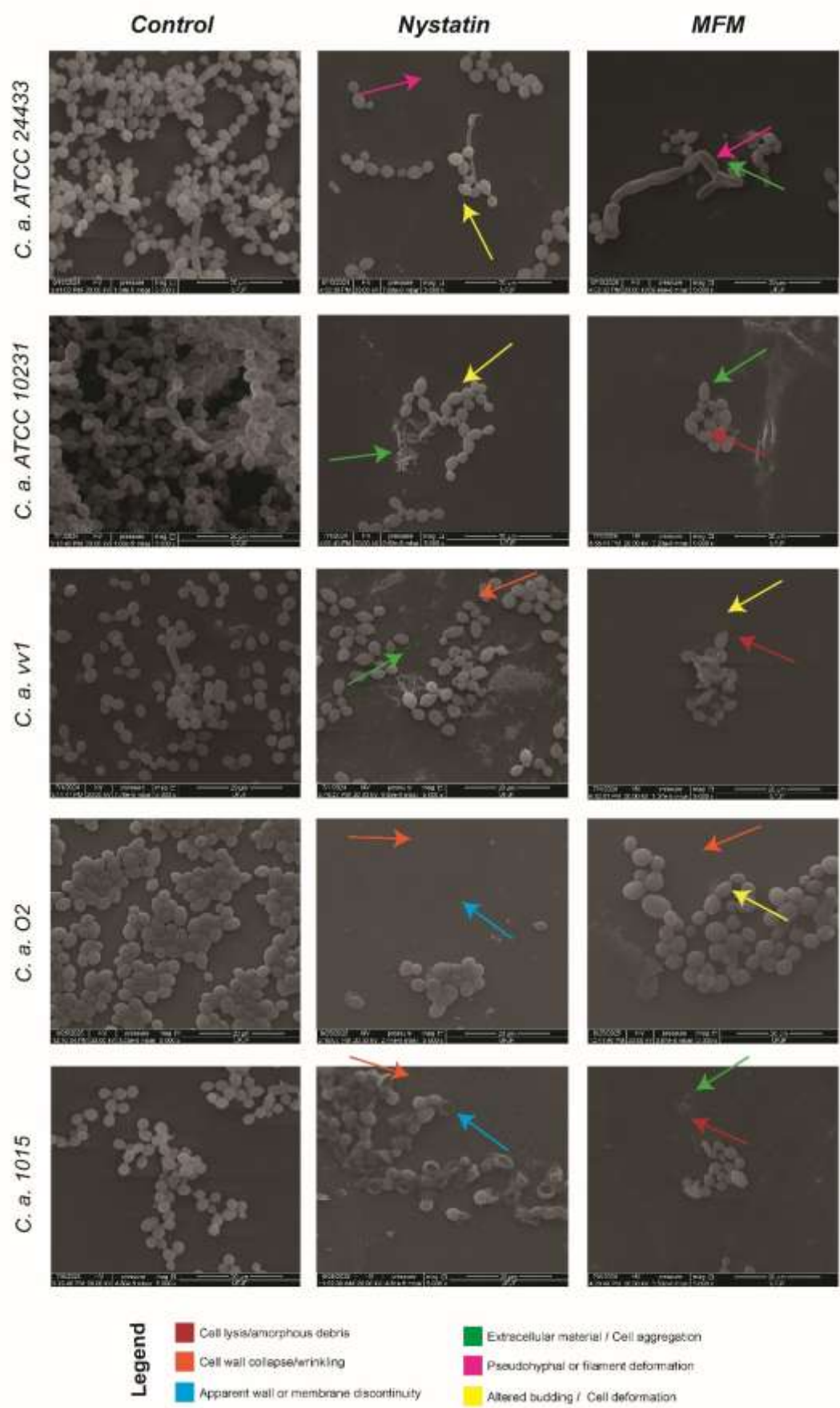
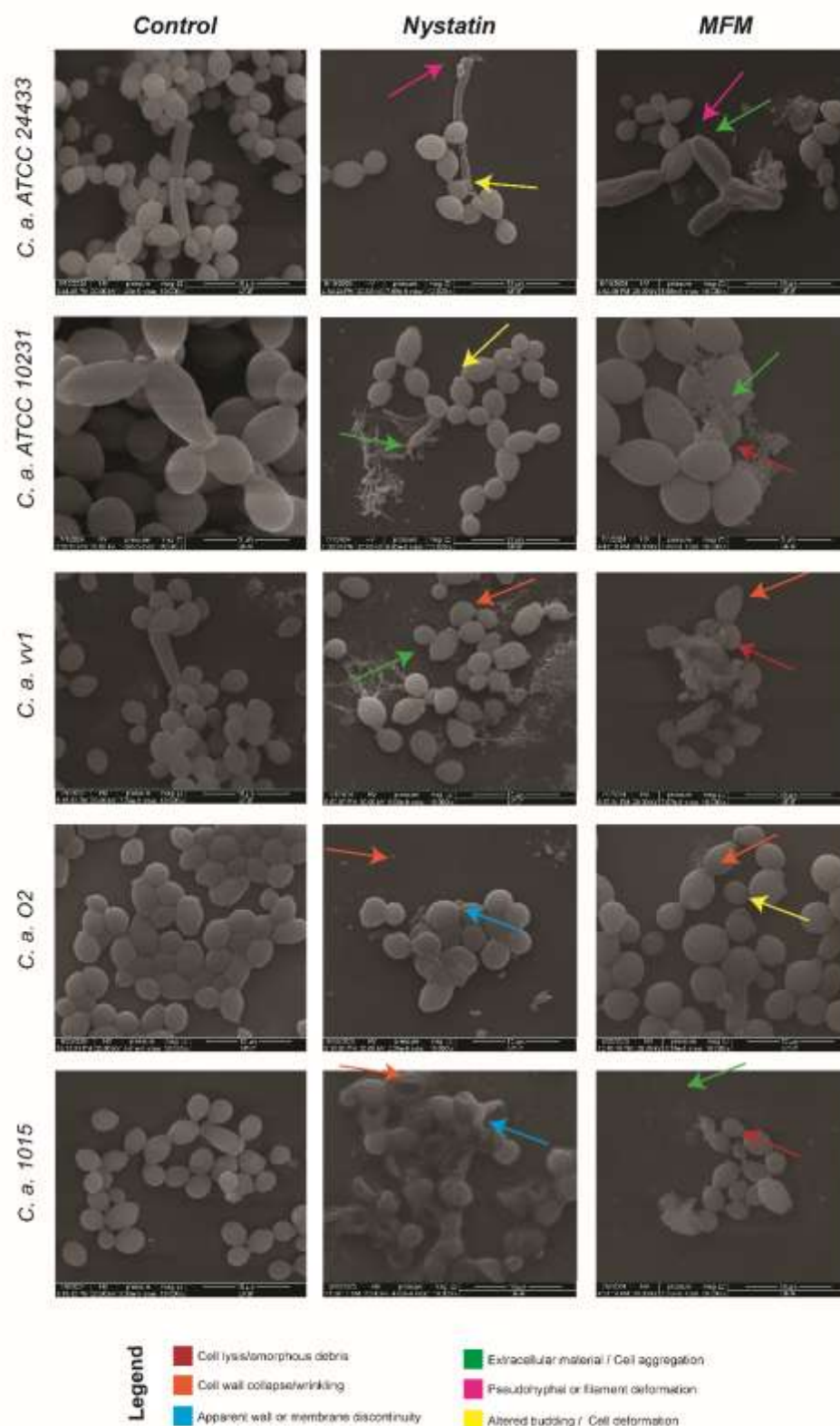


Figure 12. Scanning electron microscopy (SEM) of *C. albicans* biofilms after treatment with MFM compared with growth control 10000x.



Biofilms treated with nystatin (the positive control) exhibited structural alterations compared to the growth control. SEM analysis revealed a reduction in biofilm density, with

fewer adherent cells and less compact organization. The cells were predominantly observed in small aggregates or as isolated yeasts attached to the substrate, and there was a noticeable decrease in filamentous structures. Additionally, some cells displayed surface irregularities and signs of damage, alongside scattered cellular debris. Nevertheless, the overall biofilm architecture appeared to be partially preserved, suggesting that, while nystatin induced cellular damage, it had a less pronounced effect on the structural organization of biofilms than MFM.

The formation of biofilms is a critical virulence factor in *C. albicans*, as cells associated with biofilms exhibit increased tolerance to antifungal agents due to multiple protective mechanisms, including the production of an extracellular matrix, metabolic heterogeneity, and the emergence of persister cells [78, 79]. Persister cells are a subpopulation of highly tolerant fungal cells that survive prolonged exposure to antifungals and can contribute to therapeutic failure and recurrence of infection. Therefore, agents capable of disrupting biofilm organization and targeting different cellular processes could be valuable in overcoming antifungal tolerance. In this context, the inhibitory effects of MFM on early adhesion and mature biofilm development suggest that this phytocomplex interferes with the essential processes required for biofilm formation and maintenance.

During the adhesion phase, MFM significantly reduced biofilm formation in all strains tested (37–63% inhibition). The reduction in biofilm biomass observed after MFM exposure may also reflect interference with extracellular matrix organization, which functions as a physical barrier limiting antifungal penetration and protecting biofilm-associated cells from environmental stress. Thus, disruption of matrix-associated structures may contribute to the increased susceptibility of *Candida* populations to antifungal treatment. Changes in cell wall architecture, seen in assays using PI as a marker (Figure 1) and in sorbitol and ergosterol assays (Table 3), can compromise the exposure and functionality of adhesins, thus limiting the establishment of a stable biofilm [80].

On the other hand, mature biofilms showed significantly reduced metabolic activity after treatment. These results are particularly relevant, since established *Candida* biofilms exhibit intrinsic resistance associated with extracellular matrix barriers, metabolic heterogeneity, and activation of stress response [78].

Scanning electron microscopy corroborated these effects. Untreated controls formed dense, multilayered biofilms rich in hyphal elements, while biofilms treated with MFM showed reduced surface coverage, sparse filamentation, and collapsed cells. This morphological disruption is consistent with interference in the yeast-hypha transition, a central process in biofilm architecture regulated by pathways that include the Ras1-cAMP-PKA and MAPK

cascades [78]. Additionally, biofilm maturation in *C. albicans* is regulated by complex communication networks involving quorum sensing molecules, such as farnesol and tyrosol, which modulate yeast-to-hypha transition and biofilm architecture. Although these pathways were not directly investigated in the present study, the reduction in filamentation and biofilm organization observed after MFM treatment suggests that phytochemicals present in the extract may interfere with signaling events associated with fungal developmental transitions.

Studies indicate that flavonoids such as quercetin act as inhibitors of *C. albicans* biofilm formation and hyphal growth reduction, promoting membrane damage and intracellular leakage [81]. In addition, polyphenols can induce oxidative stress and compromise fungal membrane integrity [54]. In parallel, triterpenoids such as ursolic acid exhibit documented antifungal activity and can interfere with phenotypes associated with virulence [82,83].

By correlating these studies with the planktonic assays developed in this work, it is possible to suggest that the oxidative and metabolic stress caused by MFM may act synergistically with envelope damage to destabilize biofilm growth. Notably, even strains that showed initially attenuated responses in PI and ROS assays, such as ATCC® 10231™ and clinical isolate 1015, formed less dense biofilms after treatment. This suggests that, although adaptive mechanisms may transiently dampen initial stress, the multifactorial pressure exerted by MFM ultimately compromises the three-dimensional organization of the biofilm. Given that biofilms of resistant strains are notoriously difficult to eradicate, this observation highlights the translational potential of MFM to overcome resistance mechanisms.

3.8 Elucidation of Synergistic Activity of MFM and Itraconazole.

The synergistic interaction between the methanolic extract of *Mitracarpus frigidus* (MFM) and itraconazole was evaluated using the checkerboard assay, and the results are expressed as the fractional inhibitory concentration index (FICI). The combination exhibited a predominantly synergistic effect against most *Candida albicans* strains tested. Specifically, synergistic interactions were observed for strains C.a *vv1* (FICI = 0.156), C.a *o2* (FICI = 0.035), CAR (FICI = 0.141), and CAS (FICI = 0.067), indicating a significant enhancement of antifungal activity when both agents were used together. In contrast, an additive effect was observed for strain CA1015 (FICI = 1.0). No antagonistic interactions were detected (Table 4). These findings demonstrate that the association of MFM with itraconazole can reduce the effective concentrations required for antifungal activity, suggesting a potential synergistic therapeutic strategy.

Table 4: Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI) of *Mitracarpus frigidus* Methanolic Extract (MFM) in Combination with Itraconazole against *Candida* strains.

<i>Candida</i> strains	FICI	Interaction outcome
<i>Cavv1</i>	0.156	Synergistic
<i>Cao2</i>	0.035	Synergistic
<i>CaR</i>	0.141	Synergistic
<i>CaS</i>	0.067	Synergistic
<i>Ca1015</i>	1.000	Additive

According to Caesar and Cech [84], combination therapy has greater potential to prevent the development of resistance when compared to the isolated use of active compounds. In this context, the findings of the present study suggest that the MFM extract may act as a potential therapeutic adjuvant, increasing the efficacy of azole antifungals. This effect may be related to the presence of multiple bioactive compounds in the extract, capable of acting on different cellular targets. Considering the main mechanisms of resistance to azoles described in *Candida* spp., such as mutations and overexpression of the ERG11 gene, increased activity of efflux pumps (CDR1, CDR2, and MDR1), and alterations in the ergosterol biosynthesis pathway, simultaneous action on multiple targets may reduce the adaptive capacity of fungal cells. Thus, the combination of MFM extract with itraconazole may interfere not only with the integrity of the fungal membrane but also with cellular mechanisms associated with resistance, contributing to a reduction in the adaptive response and enhancing antifungal activity [8].

3.9 Proposed multi-target mechanism of action of MFM against *C. albicans*

Collectively, the findings obtained in this study support a multi-target antifungal mechanism of action for MFM, in which the chemical complexity of the phytocomplex contributes to simultaneous disruption of multiple cellular processes in *C. albicans*. The flavonoids, phenolic acids, coumarin derivatives, iridoids, and other bioactive metabolites identified by LC–MS/MS may act synergistically, initially promoting destabilization of the fungal cell envelope, as demonstrated by propidium iodide uptake and the increased MIC values observed in the presence of sorbitol and exogenous ergosterol. Membrane impairment may subsequently promote ionic imbalance, cellular stress, and excessive reactive oxygen species (ROS) generation, leading to mitochondrial dysfunction, as evidenced by the reduction of

mitochondrial membrane potential and the ultrastructural alterations observed by TEM (Figure 13).

The concomitant oxidative imbalance and mitochondrial damage may compromise energy metabolism, triggering adaptive responses such as autophagic processes, but ultimately resulting in irreversible cellular damage and fungal death, as demonstrated by growth kinetics and viability assays. In addition, the impairment of membrane homeostasis and metabolic fitness may affect critical virulence-associated processes, including adhesion, hyphal development, and biofilm maturation, explaining the inhibitory effects of MFM on *Candida* biofilms. Finally, the synergistic interaction between MFM and itraconazole suggests that the multitarget activity of the phytocomplex may enhance fungal susceptibility to conventional antifungal therapy, supporting its potential application as an adjuvant strategy for the management of resistant *Candida* infections.

Conclusion

This study is the first to comprehensively investigate the antifungal mechanisms of the methanolic extract of *Mitracarpus frigidus* (MFM) against clinical *Candida albicans* isolates recovered from coinfecting patients, providing new insights into its therapeutic potential. MFM exhibited broad-spectrum antifungal activity, inhibiting 90.6% of the tested strains (MIC 62.50–1000.00 µg/mL). Mechanistic assays demonstrated that MFM simultaneously targets the fungal cell wall and plasma membrane, as evidenced by increased propidium iodide uptake and the marked elevation of MIC values in the presence of sorbitol and exogenous ergosterol. In parallel, MFM induced oxidative stress, promoted mitochondrial membrane depolarization, and caused pronounced ultrastructural alterations affecting both the cell envelope and intracellular organelles, as confirmed by transmission electron microscopy.

These complementary mechanisms were associated with delayed fungal growth, reduced cell viability, inhibition of biofilm formation, and decreased metabolic activity of mature biofilms. Moreover, checkerboard assays demonstrated that MFM enhanced the activity of itraconazole, supporting its potential as an adjuvant to conventional antifungal therapy. The multitarget activity of MFM is likely associated with the combined action of its chemically complex phytocomplex, composed of flavonoids, phenolic acids, iridoids, coumarins, lignans, and other bioactive secondary metabolites, which may provide therapeutic advantages over single-target antifungal agents.

Overall, these findings establish MFM as a promising phytotherapeutic candidate for the development of novel antifungal strategies, particularly for topical treatment of mucosal *Candida* infections. Nevertheless, further in vivo studies, bioactivity-guided isolation of the major active constituents, and comprehensive safety assessments are required to support its clinical translation.

ASSOCIATED CONTENT

Data availability

All the data from this work is available on paper. The authorization for use of the plant species is registered in SISGEN/ Brazil - A032F41.

Author Contributions

T T.G.F.: Writing - original draft, Visualization, Methodology, Investigation, Conceptualization, Formal analysis, Data curation. T.F.S.: Writing - review & editing, Methodology, Investigation. N.S.M.: Methodology, Investigation, Visualization. N.B.A.: Methodology, Investigation, Visualization. J.B.A.: Methodology, Investigation, Visualization. M.H.V: Methodology, Investigation, Visualization. A.S.O.L.: Writing - review & editing, Methodology, Investigation, Visualization. A.B.P.: Methodology, Investigation, Visualization. I.O.M.D.: Methodology, Investigation, Visualization. M.R.C.C.: Methodology, Investigation, Visualization. G.L.S.L.: Methodology, Investigation, Visualization. M.C.M.R.G.: Methodology, Investigation, Visualization. E.S.C.: Formal analysis, Funding acquisition, Writing - review & editing. G.C.M.: Formal analysis, Funding acquisition, Writing - review & editing. R.M.M.: Writing - review & editing, Funding acquisition, Supervision. L.L.L.: Writing - review & editing, Funding acquisition. V.M.V.: Methodology, Investigation, Visualization. F.J.O.E.: Writing - review & editing, Funding acquisition, Supervision. R.L.F. Writing - review & editing, Funding acquisition, Supervision, Project administration, Conceptualization.

Conflict of Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments and funding

We would like to acknowledge Delfino Antônio Campos from the Department of Biochemistry at the Federal University of Juiz de Fora for their technical support. This work

was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil - Grant Number: 408700/2021-1) and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, Brazil - Grant Number: APQ-01357-21 and APQ-04195-25). Scholarships were provided by the Federal University of Juiz de Fora (UFJF/Brazil and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil). The article processing fee for publishing this research was paid by CAPES/ Brazil (ROR identifier: 00 × 0ma614). For open access purposes, the authors have assigned the Creative Commons CC BY license to any accepted version of the article.

References

- [1] E. Bojang, et al., Immune Sensing of *Candida albicans*, *J. Fungi* 7 (2021) 119.
- [2] N.B. Egger, et al., The rise of *Candida auris*: from unique traits to co-infection potential, *Microb. Cell* 9 (2022) 141–144.
- [3] M.R.R. Costacurta, et al., Are *Candida albicans* isolates from people living with HIV more resistant to antifungals? A systematic review and meta-analysis, *Microb. Pathog.* 207 (2025) 107913.
- [4] G. Segrelles-Calvo, et al., *Candida* spp. co-infection in COVID-19 patients with severe pneumonia: Prevalence study and associated risk factors, *Respir. Med.* 188 (2021) 106619.
- [5] K.R. Eichelberger, J.E. Cassat, Metabolic Adaptations During *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* Co-Infection, *Front. Immunol.* 12 (2021) 797550.
- [6] H.K.A. Ramadan, et al., Predictors of Severity and Co-Infection Resistance Profile in COVID-19 Patients: First Report from Upper Egypt, *Infect. Drug Resist.* 13 (2020) 3409–3422.
- [7] E.K. Boateng, et al., Medicinal plant extracts modulate antibiotic activity against multidrug-resistant bacteria and *Candida albicans*, *Discov. Plants* 2 (2025) 222.
- [8] M.M. Rahman, et al., Evaluation of *Senna tora* (L.) Roxb. leaves as source of bioactive molecules with antioxidant, anti-inflammatory and antibacterial potential, *Heliyon* 9 (2023) e12855.
- [9] L.M. Campos, et al., Methanolic extract of *Mitracarpus frigidus* inhibits filamentation and biofilm mode of growth from multidrug resistant *Candida albicans*, *Ind. Crops Prod.* 172 (2021) 114074.
- [10] R.L. Fabri, et al., Antitumor, antibiotic and antileishmanial properties of the pyranonaphthoquinone psychorubrin from *Mitracarpus frigidus*, *An. Acad. Bras. Cienc.* 84 (2012) 1081–1090.
- [11] R.L. Fabri, et al., Antibacterial and leishmanicidal effects of the hexane extract of *Mitracarpus frigidus* (Rubiaceae) aerial parts, *Rev. Bras. Farm.* 95 (2014) 695–714.
- [12] A.S.O. Lemos, et al., Antibacterial and Antibiofilm Activities of Psychorubrin, a Pyranonaphthoquinone Isolated From *Mitracarpus frigidus* (Rubiaceae), *Front. Microbiol.* 9 (2018) 724.

- [13] Clinical and Laboratory Standards Institute, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, Twenty-Fourth Informational Supplement M100-S24, CLSI, 2017.
- [14] J.T. Granato, et al., 4-Quinolinyldhydrazone analogues kill *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* by inducing apoptosis and mitochondria-dependent pathway cell death, *Chem. Biol. Drug Des.* 103 (2024) e14535.
- [15] E.S. Coimbra, et al., Synthesis, biological activity, and mechanism of action of new 2-pyrimidinyl hydrazone and N-acylhydrazone derivatives, a potent and new classes of antileishmanial agents, *Eur. J. Med. Chem.* 184 (2019) 111742.
- [16] A.S.O. Lemos, et al., *Lantana camara* L. induces a multi-targeted cell death process in *Leishmania amazonensis*, *J. Ethnopharmacol.* 337 (2025) 118766.
- [17] D.J. Frost, K.D. Brandt, D. Cugier, R. Goldman, Whole-cell *Candida albicans* assay for the detection of inhibitors towards fungal cell wall synthesis and assembly, *J. Antibiot.* 48 (1995) 306–310.
- [18] M.C.A. Leite, et al., Evaluation of antifungal activity and mechanism of action of citral against *Candida albicans*, *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2014 (2014) 378280.
- [19] S. Kucharíková, H. Tournu, K. Lagrou, P. Van Dijck, H. Bujdáková, Detailed comparison of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms under different conditions and their susceptibility to antifungal agents, *J. Med. Microbiol.* 60 (2011) 1261–1269.
- [20] A.S. Lemos, et al., Antifungal activity of the natural coumarin scopoletin against planktonic cells and biofilms from a multidrug-resistant *Candida tropicalis* strain, *Front. Microbiol.* 11 (2020) 1525.
- [21] M. Chraïbi, et al., Characterization, antioxidant, antimycobacterial, antimicrobial effects of Moroccan rosemary essential oil, and its synergistic antimicrobial potential with carvacrol, *J. Adv. Pharm. Technol. Res.* 11 (2020) 25–29.
- [22] R.L. Fabri, et al., Anti-inflammatory and antioxidative effects of the methanolic extract of the aerial parts of *Mitracarpus frigidus* in established animal models, *J. Pharm. Pharmacol.* 66 (2014) 722–732.
- [23] J.A. Lemos, et al., Pharmacological investigation of antioxidant and anti-inflammatory activities of aqueous extract from *Mitracarpus frigidus* (Rubiaceae), *J. Ethnopharmacol.* 289 (2022) 115021.
- [24] A. Septembre-Malaterre, et al., Focus on the high therapeutic potentials of quercetin and its derivatives, *Phytomedicine Plus* 2 (2022) 100220.
- [25] Y. Tan, et al., In vitro outcomes of quercetin on *Candida albicans* planktonic and biofilm cells and in vivo effects on vulvovaginal candidiasis: evidences of its mechanisms of action, *Phytomedicine* 114 (2023) 154800.
- [26] Y. Almuhanha, et al., Antibacterial, antibiofilm, and wound healing activities of rutin and quercetin and their interaction with gentamicin on excision wounds in diabetic mice, *Biology* 13 (2024) 676.
- [27] A. Periferakis, et al., Kaempferol: antimicrobial properties, sources, clinical, and traditional applications, *Int. J. Mol. Sci.* 23 (2022) 15054.
- [28] W. Alam, et al., Kaempferol as a dietary anti-inflammatory agent: current therapeutic standing, *Molecules* 25 (2020) 4073.

- [29] C.R. da Silva, et al., Evaluation of the antifungal effect of chlorogenic acid against strains of *Candida* spp. resistant to fluconazole: apoptosis induction and in silico analysis of possible mechanisms of action, *J. Med. Microbiol.* 71 (2022) 001526.
- [30] M. Ivanov, et al., Rosmarinic acid—modes of antimicrobial and antibiofilm activities of a common plant polyphenol, *S. Afr. J. Bot.* 146 (2022) 521–527.
- [31] M. Aydin, et al., Rosmarinic acid exhibits antifungal and antibiofilm activities against *Candida albicans*: insights into gene expression and morphological changes, *J. Fungi* 10 (2024) 751.
- [32] G. Jang, et al., Anti-inflammatory effect of 4,5-dicaffeoylquinic acid on RAW264.7 cells and a rat model of inflammation, *Nutrients* 13 (2021) 3537.
- [33] P. Wan, et al., Anti-inflammatory effects of dicaffeoylquinic acids from *Ilex kudingcha* on lipopolysaccharide-treated RAW264.7 macrophages and potential mechanisms, *Food Chem. Toxicol.* 126 (2019) 332–342.
- [34] J.R. Purushothaman, et al., Ferulic acid: a comprehensive review, *Cureus* 16 (2024) e68063.
- [35] J. Kaur, R. Kaur, p-Coumaric acid: a naturally occurring chemical with potential therapeutic applications, *Curr. Org. Chem.* 26 (2022) 1333–1349.
- [36] V. Flores-Morales, et al., Therapeutic effects of coumarins with different substitution patterns, *Molecules* 28 (2023) 2413.
- [37] A. Jaafar, et al., Therapeutic potentials of iridoids derived from Rubiaceae against in vitro and in vivo inflammation: a scoping review, *Saudi Pharm. J.* 32 (2024) 101876.
- [38] J. He, et al., Asperuloside and asperulosidic acid exert an anti-inflammatory effect via suppression of the NF- κ B and MAPK signaling pathways in LPS-induced RAW 264.7 macrophages, *Int. J. Mol. Sci.* 19 (2018) 2027.
- [39] S. Muthamil, et al., Synergistic effect of quinic acid derived from *Syzygium cumini* and undecanoic acid against *Candida* spp. biofilm and virulence, *Front. Microbiol.* 9 (2018) 2835.
- [40] E.H.M. Hassanein, et al., The promising antioxidant effects of lignans: Nrf2 activation comes into view, *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 397 (2024) 6439–6458. <https://doi.org/10.1007/s00210-024-03102-x>.
- [41] V.K. Bajpai, et al., Efficacy of (+)-lariciresinol to control bacterial growth of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7, *Front. Microbiol.* 8 (2017) 804.
- [42] E. Quiroga-Vargas, et al., Typing of *Candida* spp. from colonized COVID-19 patients reveal virulent genetic backgrounds and clonal dispersion, *Pathogens* 12 (2023) 1206.
- [43] M. Salimi, et al., Multi-state evaluation of *Candida* infections in burn patients, *Mycoses* 67 (2024) e13788.
- [44] D. Jing, G. Liang, X. Li, W. Liu, Progress in molecular diagnosis and treatment of chronic mucocutaneous candidiasis, *Front. Immunol.* 15 (2024) 1343138.
- [45] M. Simões, R.N. Bennett, E.A. Rosa, Understanding antimicrobial activities of phytochemicals against multidrug resistant bacteria and biofilms, *Nat. Prod. Rep.* 26 (2009) 746–757.
- [46] N. Zouine, N. El Ghachtouli, S. El Abed, S. Ibnsouda Koraichi, A comprehensive review on medicinal plant extracts as antibacterial agents: Factors, mechanism insights and future prospects, *J. Appl. Microbiol.* 134 (2024) lxad091.

- [47] L.M. Campos, et al., *Mitracarpus frigidus*: A promising antifungal in the treatment of vulvovaginal candidiasis, *Ind. Crops Prod.* 123 (2018) 731–739.
- [48] T.G. Ferreira, et al., Structural, physicochemical, and functional (antioxidant/anti-inflammatory) properties of β -cyclodextrin supramolecular complexation with *Mitracarpus frigidus* extract, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 84 (2023) 104431.
- [49] M.C.A. Leite, et al., Mechanism of antifungal activity of natural compounds against *Candida albicans*, *Braz. J. Pharmacogn.* 24 (2014) 204–211.
- [50] K. Rajkowska, et al., Mechanisms of antifungal activity of natural compounds evaluated by sorbitol and ergosterol assays, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100 (2016) 4595–4605.
- [51] Z. Zhang, et al., Isoflavaspodic Acid PB Extracted from *Dryopteris fragrans* (L.) Schott Inhibits *Trichophyton rubrum* Growth via Membrane Permeability Alternation and Ergosterol Biosynthesis Disruption, *BioMed Res. Int.* 2022 (2022) 6230193.
- [52] R.D. Castro, E.O. Lima, Anti-*Candida* activity and mechanism of action of thymol and carvacrol, *Braz. J. Microbiol.* 44 (2013) 1389–1393.
- [53] C.I.S. Medeiros, et al., Antifungal activity of linalool against *Candida albicans* and its mechanism of action, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 55 (2022) e12318.
- [54] S. Davidova, A.S. Galabov, G. Satchanska, Antibacterial, antifungal and antiviral activity of plant polyphenols, *Microorganisms* 12 (2024) 2502.
- [55] M. Daglia, Polyphenols as antimicrobial agents, *Curr. Opin. Biotechnol.* 23 (2012) 174–181.
- [56] J.L. Corrêa, et al., Propolis extract has bioactivity on the wall and cell membrane of *Candida albicans*, *J. Ethnopharmacol.* 256 (2020) 112791.
- [57] N.S. Ferreira, et al., Exploring the antifungal potential and mechanism of pomegranate peel extract against *Candida* species, *Microb. Pathog.* 204 (2025) 107596.
- [58] K.C. Gray, et al., Amphotericin primarily kills yeast by simply binding ergosterol, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109 (2012) 2234–2239.
- [59] H. Yaakoub, S. Mina, A. Calenda, J.P. Bouchara, N. Papon, Oxidative stress response pathways in fungi, *Cell. Mol. Life Sci.* 79 (2022) 333.
- [60] L. Li, C. Du, Fungal apoptosis-related proteins, *Microorganisms* 12 (2024) 2289.
- [61] M.S. Kwun, D.G. Lee, Quercetin-induced yeast apoptosis through mitochondrial dysfunction under the accumulation of magnesium in *Candida albicans*, *Fungal Biol.* 124 (2020) 383–391.
- [62] L.M. Campos, et al., Antifungal *Annona muricata* L. (sour sop) extract targets the cell envelope of multi-drug resistant *Candida albicans*, *J. Ethnopharmacol.* 301 (2023) 115856.
- [63] R. Prasad, M.K. Rawal, Efflux pump proteins in antifungal resistance, *Front. Pharmacol.* 5 (2014) 202.
- [64] M. Borgers, Ultrastructural correlates of antimycotic treatment, in: M.R. McGinnis (Ed.), *Current Topics in Medical Mycology*, vol. 2, Springer-Verlag, New York, 1988, pp. 1–39.
- [65] N.A. Gow, M.D. Lenardon, Architecture of the dynamic fungal cell wall, *Nat. Rev. Microbiol.* 21 (2023) 248–259.
- [66] D. Zhang, et al., ROS-induced oxidative stress and apoptosis-like event directly affect the cell viability of cryopreserved embryogenic callus in *Agapanthus praecox*, *Plant Cell Rep.* 34 (2015) 1499–1513.

- [67] Y. Qin, J. Wang, Q. Lv, B. Han, Recent progress in research on mitochondrion-targeted antifungal drugs: a review, *Antimicrob. Agents Chemother.* 67 (2023) e00003–23.
- [68] S. Liu, et al., Autophagy regulation of ATG13 and ATG27 on biofilm formation and antifungal resistance in *Candida albicans*, *Biofouling* 38 (2022) 926–939.
- [69] C.M. Fader, M.I. Colombo, Autophagy and multivesicular bodies: two closely related partners, *Cell Death Differ.* 16 (2009) 70–78.
- [70] M.L. Rodrigues, A. Casadevall, A two-way road: novel roles for fungal extracellular vesicles, *Mol. Microbiol.* 110 (2018) 11–15.
- [71] G. Vargas, J.D.B. Rocha, D.L. Oliveira, et al., Compositional and immunobiological analyses of extracellular vesicles released by *Candida albicans*, *Cell Microbiol.* 17 (2015) 389–407. <https://doi.org/10.1111/cmi.12374>.
- [72] W.S. Sung, D.G. Lee, Antifungal action of chlorogenic acid against pathogenic fungi mediated by membrane disruption, *Pure Appl. Chem.* 82 (2010) 219–226.
- [73] X. Li, et al., Autophagy alters the susceptibility of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents, *Microbiol. Spectr.* 11 (2023) e04426–22.
- [74] L. Zhang, et al., Mitochondria complex I deficiency in *Candida albicans* arrests the cell cycle at S phase through suppressive TOR and PKA pathways, *FEMS Yeast Res.* 24 (2024) foae010.
- [75] J. Lee, D.G. Lee, Novel antifungal mechanism of resveratrol: apoptosis inducer in *Candida albicans*, *Curr. Microbiol.* 70 (2015) 383–389.
- [76] M. Sharma, R. Manoharlal, N. Puri, R. Prasad, Antifungal curcumin induces reactive oxygen species and triggers an early apoptosis but prevents hyphae development by targeting the global repressor TUP1 in *Candida albicans*, *Biosci. Rep.* 30 (2010) 391–404.
- [77] S. Wu, et al., Mechanism of antifungal activity of natural compounds against *Candida albicans*, *BMC Microbiol.* 24 (2024) 333.
- [78] J. Yi, Q. Zhang, H. Zhou, W. Fei, J. Liao, Y. Huang, J. Guo, ROS-implicated apoptosis in *Candida albicans*: mechanistic insights into Aureobasidin A's antifungal activity, *Front. Microbiol.* 17 (2026) 1725921. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2026.1725921>.
- [79] M. Gulati, C.J. Nobile, *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms, *Microbes Infect.* 18 (2016) 310–321.
- [80] J. Kaur, C.J. Nobile, Antifungal drug resistance mechanisms in *Candida* biofilms, *Curr. Opin. Microbiol.* 71 (2023) 102237.
- [81] C. Tsui, E.F. Kong, M.A. Jabra-Rizk, Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm, *FEMS Pathog. Dis.* 74 (2016) ftw018.
- [82] M. Janeczko, et al., Inhibitory effect of a combination of baicalein and quercetin flavonoids against *Candida albicans* strains isolated from the female reproductive system, *Fungal Biol.* 126 (2022) 407–420.
- [83] N.A. Mahizan, et al., Terpene Derivatives as a Potential Agent against Antimicrobial Resistance (AMR) Pathogens, *Molecules* 24 (2019) 2631.
- [84] Z. Sycz, D. Tichaczek-Goska, D. Wojnicz, Anti-planktonic and anti-biofilm properties of pentacyclic triterpenes—asiatic acid and ursolic acid as promising antibacterial future pharmaceuticals, *Biomolecules* 12 (2022) 98.
- [85] L.K. Caesar, N.B. Cech, Synergy and antagonism in natural product extracts: when 1 + 1 does not equal 2, *Nat. Prod. Rep.* 36 (2019) 869–888.

[86] A.T. Nishimoto, C. Sharma, P.D. Rogers, Molecular and genetic basis of azole antifungal resistance in the opportunistic pathogenic fungus *Candida albicans*, J. Antimicrob. Chemother. 75 (2020) 257–270. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz400>.

Legend for figures

Figure 1. Effect of MFM and nystatin on membrane integrity of *Candida albicans* strains assessed by propidium iodide uptake after 12 h of treatment. a) % of death *C. albicans* ATCC® 24433™ cells; b) % of death *C. albicans* ATCC® 10231™ cells; c) % of death *C. albicans* 1015 cells; d) % of death *C. albicans* *vv1* cells; e) % of death *C. albicans* *o2* cell. Statistical analysis performed by ANOVA followed by Bonferroni test: a – Statistical difference in relation to growth control ($p < 0.05$); b – Statistical difference in relation to Nystatin ($p < 0.05$).

Figure 2. Effect of MFM and nystatin on intracellular ROS production in *Candida albicans* strains measured by DCFH-DA fluorescence after treatment. a) ROS of *C. albicans* ATCC® 24433™ cells; b) ROS of *C. albicans* ATCC® 10231™ cells; c) ROS of *C. albicans* 1015 cells; d) ROS of *C. albicans* *vv1* cells; e) ROS of *C. albicans* *o2* cell. Statistical analysis performed by ANOVA followed by Bonferroni test: a – Statistical difference in relation to growth control ($p < 0.05$); b – Statistical difference in relation to Nystatin ($p < 0.05$).

Figure 3. Effect of MFM and nystatin on mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) in *Candida albicans* strains assessed by JC-1 fluorescence. a) red/green of *C. albicans* ATCC® 24433™ cells; b) red/green of *C. albicans* ATCC® 10231™ cells; c) red/green of *C. albicans* 1015 cells; d) red/green of *C. albicans* *vv1* cells; e) red/green of *C. albicans* *o2* cell. Statistical analysis performed by ANOVA followed by Bonferroni test: a – Statistical difference in relation to growth control ($p < 0.05$).

Figure 4. Ultrastructural aspects of *Candida albicans* sensitive strain (ATCC 24433, C.a.S) after MFM treatment. (a–c) Untreated control cells displaying intact morphology, homogeneous cytoplasm, preserved organelles, and well-defined plasma membrane and cell wall. (d–i) Treated cells presenting increase proportion of hyphae, reduced cytoplasmic density and increased vacuolization. (e, f) Cell with a large vacuole (v), electron-dense material at the plasma membrane, partial detachment of the plasma membrane from the cell wall (arrows), and a fingerprint-like multilayer concentric membranous profile (star). (h, i) Hypha with swollen

mitochondria (m), autophagic vacuole-like structures (AV). N = nucleus. Scale bars = 4 μm (a, d, g), 2 μm (b, c), 1 μm (e, h), 0,3 μm (f, i).

Figure 5. Ultrastructural aspects of *Candida albicans* sensitive strain (ATCC 24433, C.a.S) after MFM treatment. Treated cells exhibit intense vacuolization, fingerprint-like multilayer concentric membranous profile (stars), autophagic vacuole-like structures (AV), multivesicular bodies (asterisks), degenerated organelles such as the nucleus (N) and mitochondria (m), and thickened and fibrillated cell wall (CW) (a–p). Arrow indicates a plasma membrane invagination forming a multivesicular body (n), while diamond indicates an unidentified degenerated organelle. v = vacuole. Scale bars = 1 μm (a, d, j, o), 0,3 μm (g, h, k–m, p), 0,1 μm (b, c, e, f, i, n).

Figure 6. Ultrastructural aspects of *Candida albicans* resistance strain (ATCC 10231, C.a.R) after MFM treatment. (a–c) Untreated control cells with intact wall and membrane, normal vacuoles (v), and preserved mitochondria (m). (d–o) Treated cells showing severely altered morphology with irregular shapes, rarefied cytoplasm, extensive vacuolization, and degenerated organelles. (f–i) Cells containing autophagic vacuole-like structures (AV) and multivesicular bodies (asterisks). Arrows indicate a possible plasma membrane invagination forming a multivesicular body (i). (j–n) Cells with abnormal morphology, cytoplasmic tubular structures (arrowheads), concentric membranous profile (stars), degenerated mitochondria. and AV. (o) Cell with depleted cytoplasmic content, irregular membrane, and thick and fibrillated wall. N = nucleus. Scale bars = 4 μm (a, b, d, e), 1 μm (c, f, g, j), 0,3 μm (h, l, m, o), 0,2 μm (i, k, n).

Figure 7. Ultrastructural aspects of *Candida albicans* clinical isolates after MFM treatment. Treated cells display altered morphology, autophagic vacuole-like structures (AV), fingerprint-like multilayer concentric membranous profile (stars), multivesicular bodies (asterisks), degenerated organelles, cell wall (CW) thickening and fibrillation, and depleted cytoplasm in (a–d) vaginal (C.a.V), (e–l) COVID-19-patient (C.a.1015), and (m–t) oral isolates (C.a.O). Arrows indicate intense vesiculation in cytoplasm (f) and periplasmic spaces (l), or plasma membrane discontinuities (t). N = nucleus, m = mitochondria, v = vacuole. Scale bars = 4 μm (e, k), 2 μm (q, s), 1 μm (a, c, g, m, r, t), 0,4 μm (f, i, l, n, o), 0,2 μm (b, d, h, j, p).

Figure 8. Growth Kinetics Assay of MFM and nystatin against *Candida* strains. a) Time–kill curve of *C. albicans* ATCC® 24433™ cells; b) Time–kill curve of *C. albicans* ATCC® 10231™ cells; c) Time–kill curve of *C. albicans* 1015 cells; d) Time–kill curve of *C. albicans* *vv1* cells; e) Time–kill curve of *C. albicans* *o2* cell.

Figure 9. Area under the time–kill curve (AUC) of MFM and Nystatin against *Candida albicans* strains. a) AUC of *C. albicans* ATCC® 24433™ cells; b) AUC of *C. albicans* ATCC® 10231™ cells; c) AUC of *C. albicans* 1015 cells; d) AUC of *C. albicans* *vv1* cells; e) AUC of *C. albicans* *o2* cell. Statistical analysis performed by ANOVA followed by Bonferroni test: a – Statistical difference in relation to growth control ($p < 0.05$); b – Statistical difference in relation to Nystatin ($p < 0.05$).

Figure 10. Effect of MFM and nystatin on the adhesion phase of *Candida albicans* biofilm formation measured by spectrophotometric analysis. Statistical analysis performed by ANOVA followed by Bonferroni test: a – Statistical difference in relation to growth control ($p < 0.05$).

Figure 11. Scanning electron microscopy (SEM) of *Candida albicans* biofilms showing structural alterations after treatment with MFM compared with growth control 5000x.

Figure 12. Scanning electron microscopy (SEM) of *Candida albicans* biofilms showing structural alterations after treatment with MFM compared with growth control 10000x.

Figure 13. Proposed multitarget mechanism of antifungal action of MFM.

6 CAPÍTULO 3

O Capítulo 3 apresenta o artigo intitulado “Localized Vaginal Drug Delivery Using Chitosan Films Incorporating *Mitracarpus frigidus* Extract: From Physicochemical Design to *In Vivo* Antifungal Efficacy”, submetido à Journal of Drug Delivery Science and Technology (e-ISSN: 2588-8943). Este estudo teve como objetivo desenvolver sistemas poliméricos mucoadesivos à base de quitosana incorporados a MFM para administração local, visando o tratamento da candidíase mucosal. Os filmes foram caracterizados quanto às suas propriedades físico-químicas, morfológicas, térmicas e mecânicas, bem como quanto ao perfil de liberação do extrato. Adicionalmente, foram realizados ensaios de biocompatibilidade e segurança preliminar, demonstrando a adequação das formulações para aplicação em mucosas. Por fim, a eficácia terapêutica dos sistemas foi avaliada em modelo experimental de candidíase vulvovaginal *in vivo*. O trabalho destaca o potencial da formulação como alternativa terapêutica promissora para o tratamento localizado da candidíase vulvovaginal.

Localized Vaginal Drug Delivery Using Chitosan Films Incorporating *Mitracarpus frigidus* Extract: From Physicochemical Design to In Vivo Antifungal Efficacy

Thayná Gomes Ferreira^a, Júlia Bertolini Fajardo^a, Mariana Hauck Vianna^a, Ana Barbara Polo^a, Ari Sérgio de Oliveira Lemos^b, Thalita de Freitas Souza^a, Lara Melo Campos^a, Núbia Benini Andrade^a, Mariane Rocha Cordeiro Comitê^a, Lucas de Araújo Carvalho^a, Maria Clara Machado Resende Guedes^b, Emmilly de Oliveira Alves^c, Elaine Soares Coimbra^b, Gilson Costa Macedo^b, Renato Dantas-Medeiros^d, Vinicius Novais Rocha^e, Francisco Alexandrino Júnior^f, Luiz Fernando Cappa de Oliveria^g, Marcelo Gonzaga de Freitas Araujo^c, Guilherme Diniz Tavares^h, Thaís Nogueira Barradasⁱ, Ângelo Márcio Leite Denada^j, Rodrigo Luiz Fabri^{a}*

^a Laboratory of Bioactive Natural Products, Department of Biochemistry, Institute of Biological Sciences, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil.

^b Department of Parasitology, Microbiology, and Immunology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil.

^c School of Pharmacy, Federal University of São João del-Rei, Divinópolis, Minas Gerais, Brazil.

^d Laboratory of Pharmacognosy, Department of Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brazil.

^e Department of Veterinary Medicine, Faculty of Medicine, Federal University of Juiz de Fora, Campus, Juiz de Fora, MG, Brazil

^f Micro- and Nanotechnology Laboratory, Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

^g Center for Spectroscopy and Molecular Structure, Department of Chemistry, Institute of Exact Sciences, Federal University of Juiz de Fora, Campus Juiz de Fora, MG, Brazil.

^h Faculty of Pharmacy, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil.

ⁱ Faculty of Pharmacy, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

^j Department of Pharmacy, Institute of Life Sciences, Federal University of Juiz de Fora, Campus Governador Valadares, Governador Valadares, Minas Gerais, Brazil.

*Corresponding author: E-mail: rodrigo.fabri@ufjf.br

ABSTRACT

Innovative mucoadhesive, chitosan-based films were developed as a drug delivery platform for the controlled release of a plant-derived bioactive compound to treat vulvovaginal candidiasis.

Mitracarpus frigidus, a medicinal plant renowned for its antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory properties, was chosen as a source of therapeutic compounds. However, its use in advanced pharmaceutical formulations has not yet been explored. The aim of this study was to formulate and characterize films containing 0.5–2.5% (w/v) methanolic extract of *M. frigidus* (QMFM), and to evaluate their physicochemical performance, release profile, biocompatibility, anti-inflammatory activity, wound-healing potential and antifungal efficacy against *Candida albicans*, including resistant isolates. Rheological analysis of the precursor dispersions revealed predominantly viscous behavior ($G'' > G'$), with increased structuring at intermediate concentrations, suggesting interactions between the extract and polymer. The films exhibited positive zeta potential values ranging from +41.6 to +52.3 mV, which supports colloidal stability. Particle size distribution and electron microscopy revealed aggregate formation at 2.5%, which was associated with increased thickness and reduced weight uniformity. FTIR analysis indicated hydrogen bonding between the phenolic compounds and the chitosan, and thermogravimetric analysis showed stability up to approximately 120 °C. Higher extract loading reduced tensile strength, consistent with matrix rigidification. The films enabled sustained and complete extract release over 8 hours. Biological assays confirmed high cytocompatibility and the suppressed NO, IL-6, and IL-12 production. They also revealed enhanced fibroblast migration and 90–100% inhibition of *C. albicans* growth and biofilm formation. In vivo, treatment significantly reduced vulvovaginal fungal burden. These results demonstrate the potential of this natural, controlled-release system for use in antifungal therapy.

KEYWORDS: Polymeric films; Bioactive plant extract; Antifungal activity.

1. INTRODUCTION

Candidiasis is an opportunistic fungal infection caused by species of the genus *Candida*, with *Candida albicans* being the most prevalent etiological agent. Under normal physiological conditions, *C. albicans* reside harmlessly as a commensal organism within the human microbiota. However, disruptions such as dysbiosis, immunosuppression, or hormonal changes can facilitate its overgrowth and morphological transition into invasive forms, resulting in infections across various mucosal and systemic sites [1] [2].

The oral cavity and the vulvovaginal region are among the most frequently affected sites. Epidemiological data suggest that 70–75% of women experience at least one episode of vulvovaginal candidiasis (VVC), and approximately 5–10% suffer from recurrent vulvovaginal candidiasis [3]. Oral candidiasis affects between 30–55% of healthy adults and is particularly prevalent among denture wearers and immunocompromised individuals [4]. In hospitalized populations, the prevalence may reach 44.4%, with pseudomembranous candidiasis representing the most frequent subtype [5].

The management of candidiasis remains challenging due to increasing resistance to conventional antifungal agents and the toxicity associated with some therapeutic options. Consequently, the search for alternative antifungal therapies is of critical importance. Natural products have gained significant traction due to their structural diversity and bioactive potential [6]. Recent studies have highlighted promising plant-derived therapeutic approaches, such as a Carbopol®-based hydrogel containing ethanolic extract of *Annona muricata* L. leaves, which demonstrated significant antifungal and anti-inflammatory activity in an *in vivo* VVC model [7]. Furthermore, other plant extracts, such as those from *Curcuma longa* L., *Allium sativum* L., *Camellia sinensis* L., and *Punica granatum* L., have demonstrated antifungal properties, including the ability to impair fungal growth, reduce virulence factors and modulate host inflammatory responses [8].

Mitracarpus frigidus (Willd. ex Roem. & Schult.) K.Schum. (*Rubiaceae*), a plant known for its broad-spectrum pharmacological properties, including antimicrobial, antioxidant, and anti-inflammatory activities, has emerged as a candidate for antifungal applications. Phytochemical analyses of the methanolic extract obtained from the aerial parts of *M. frigidus* (MFM) revealed the presence of bioactive metabolites such as phenolic compounds, triterpenes, saponins, steroids, flavonoids, and tannins [9]. The presence of these compounds, particularly

phenolics and triterpenoids, has been associated with the *in vitro* efficacy of MFM against *C. albicans*, including strains resistant to conventional antifungal agents. MFM has been shown to impair fungal metabolism, alter cell morphology, reduce fungal burden *in vivo*, and modulate host inflammatory responses [10,11].

The incorporation of *M. frigidus* extract into chitosan-based polymeric films could improve the delivery of therapeutic compounds and provide a novel drug delivery platform, particularly for the treatment of VVC. Chitosan, a biopolymer composed of N-acetyl-D-glucosamine and β (1 $\rightarrow$ 4)-D-glucosamine units obtained through the deacetylation of chitin, exhibits notable antimicrobial, bioadhesive, and biodegradable properties. Its mucoadhesive nature facilitates prolonged retention at mucosal surfaces, thereby enabling sustained drug release and improving patient compliance [12]. Given its broad applicability, chitosan has been employed in various sectors, including the pharmaceutical industry, medical supplies, tissue engineering, food production, cosmetics, and agriculture. [13,14].

Importantly for biomedical applications, chitosan exhibits good cytocompatibility with mammalian cells and favorable mucoadhesive properties that prolong residence time at mucosal sites, enhance local bioavailability and facilitate sustained release of co-loaded actives — features that are highly desirable for topical antifungal therapy and wound care. When formulated as films or coatings, chitosan can act simultaneously as a structural matrix that controls diffusion and protects labile phytochemicals, a bioadhesive carrier that improves local retention, and an active antifungal agent that may act synergistically with incorporated natural compounds [15]

Several recent studies illustrate the translational potential of chitosan films for anticandidal use. Chitosan membranes and edible films enriched with plant extracts or essential oils have demonstrated enhanced antifungal and antibiofilm activity compared with either component alone, evidencing synergistic interactions and improved control of release kinetics of phenolic and terpenoid actives. For instance, chitosan films loaded with botanical extracts show increased inhibition of *C. albicans* biofilms and prolonged antimicrobial action; while cross-linking or complexation strategies (e.g., polyphenol-mediated crosslinking) have been used to tune mechanical properties and slow the release of entrapped drugs, thereby improving local availability and therapeutic window [16].

Finally, chitosan has also been shown to act synergistically with conventional antifungals (e.g., azoles), lowering effective doses and overcoming resistance phenotypes *in vitro* — an effect that supports combination approaches where a chitosan film serves both as a structural delivery platform and as a potentiator of co-administered antifungal agents. These

attributes make chitosan-based films a promising platform for the incorporation of *M. frigidus* methanolic extract (MFM), potentially enabling synergistic antifungal activity against *C. albicans*, sustained local release, enhanced mucosal retention, and improved clinical translatability for candidiasis applications [17]

Therefore, this study aimed to develop and characterize chitosan-based films incorporated with methanolic extract of *M. frigidus*, combining the intrinsic antifungal and wound-healing properties of chitosan with the bioactive potential of phenolics, flavonoids, and triterpenes from the extract. For the first time, a mucoadhesive polymeric film platform is proposed to enhance bioavailability, sustain bioactive release, and provide a multifunctional biomaterial with promising application in mucosal inflammation control and the treatment of candidiasis.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Plant Material

The aerial parts of *Mitracarpus frigidus* were collected in May 2021 in Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil (coordinates: -43.38223, -21.78073; WGS84) (SISGEN/Brazil A032F41). A voucher specimen (CESJ 46076) was deposited at the Leopoldo Krieger Herbarium, Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF).

2.2 Extract Preparation

Powdered aerial parts of *M. frigidus* (1 kg) were macerated in analytical-grade methanol ($5 \times 2,000$ mL/day) for five days at room temperature to fully exhaust the plant material. Methanol was selected as the extraction solvent due to its high polarity and efficiency in recovering a broad spectrum of bioactive secondary metabolites, particularly phenolic compounds and terpenoids of pharmacological interest. The solvent was subsequently evaporated under reduced pressure at 45 °C using a rotary evaporator (V-700, BUCHI Labortechnik AG), yielding the methanolic extract of *M. frigidus* (MFM). The extract was stored in tightly sealed bottles at 5 °C until further biological assays.

2.3 Preparation of Films Containing MFM

Chitosan-based films were prepared using the solvent casting technique, adapted from Farjado, et al. [18], with specific modifications. A 2.0% (w/v) chitosan solution was formulated by dissolving low molecular weight chitosan (low molecular weight: 50,000–190,000 Da, degree of deacetylation $\geq 75\%$, solubility: dilute aqueous acid, soluble; Sigma-Aldrich®) in 1.0% (v/v) acetic acid under constant mechanical stirring (Fisatom®) until complete dissolution was achieved. Subsequently, 7.5% (v/v) glycerol was added as a plasticizer, and the mixture was stirred for an additional 30 minutes.

The resulting solution was then divided into multiple fractions for the incorporation of MFM, which had been pre-dissolved in analytical-grade methanol (2.33 mL). MFM was added at concentrations of 0.5, 1.0, and 2.5% (w/v), following a modified protocol based on Yoshida, et al. [19]. A blank film (QBR) was also prepared, containing only chitosan, glycerol, and methanol without the extract.

All film-forming solutions were degassed using an ultrasonic bath for 1 hour at ambient temperature to eliminate air bubbles. Subsequently, 12 mL of the solutions were cast into Petri dishes (63.59 cm²) and dried in a convection oven at 45 °C for 18 hours. The dried films were carefully peeled, cut into 0.5 cm x 2.5 cm (1.25 cm²) specimens and stored at 5 °C under refrigeration until further use. The films were labeled as shown in Table 1.

Table 1. Composition of chitosan-based films containing different concentrations of *Mitracarpus frigidus* extract.

Film Code	Chitosan (% w/v)	Glycerol (% v/v)	<i>M. frigidus</i> Extract (% w/v)
QBR	2.0	7.5	0.0
QMFM 0.5%	2.0	7.5	0.5
QMFM 1%	2.0	7.5	1.0
QMFM 2.5%	2.0	7.5	2.5
QMFM 5%	2.0	7.5	5.0

2.4 Determination of Total Phenolic Content

The total phenolic content of the MFM extract was determined using the Folin–Ciocalteu colorimetric method with minor adaptations [20]. Tannic acid was used as the

reference standard for the calibration curve, prepared at concentrations ranging from 7.5 to 350 $\mu\text{g/mL}$ from a stock methanolic solution (500 $\mu\text{g/mL}$).

The extract samples were prepared at a concentration of 1 mg/mL in methanol. In a 96-well microplate, 120 μL of 20% Folin–Ciocalteu reagent, 30 μL of sample solution, and 100 μL of 4% sodium carbonate (Na_2CO_3) solution were added sequentially. For sample blanks, the Folin–Ciocalteu reagent was replaced with methanol. After incubation for 30 min protected from light, absorbance was measured at 770 nm using a UV–Vis spectrophotometer.

The assay was performed in triplicate, and results were expressed as mean $\pm$ standard deviation. Total phenolic content was expressed as milligrams of tannic acid equivalents per gram of extract (mg TAE/g extract).

2.5 Characterization of Film Precursor Solutions

2.5.1 Zeta Potential and Hydrodynamic Diameter

The zeta potential (ZP) and hydrodynamic diameter (Dh) of the film precursor solutions were analyzed using dynamic light scattering (DLS) with phase analysis light scattering (M3-PALS) technology at a fixed backscatter angle of 173° . Measurements were conducted using a Malvern Zetasizer Nano Series instrument (model Nano-ZS90, Malvern Instruments, UK).

Samples were loaded into disposable polyethylene capillary cuvettes equipped with integrated electrodes to facilitate electrokinetic measurements. For each formulation, five independent measurements were performed, with each consisting of five consecutive readings ($n = 5 \times 5$). The final ZP and Dh values were reported as the average of these readings. Data acquisition and statistical processing were carried out using Microcal Origin 9.0[®] software.

2.5.2 Rheological Parameters

The rheological behavior of the film precursor solutions was characterized using both steady-state and oscillatory rheological tests, performed on a TA Instruments DHR-1 automated rotational rheometer (TA Instruments, USA). Flow and viscosity profiles were obtained in continuous shear mode to evaluate shear-dependent behavior. Additionally, temperature-dependent viscosity measurements were carried out under controlled rotational conditions. Oscillatory rheological analysis was conducted to determine the viscoelastic properties of the

formulations by amplitude sweep tests, generating profiles of storage modulus (G') and loss modulus (G'') as a function of applied shear stress.

All experiments were performed using plate–plate geometry with a 1000 μm gap. Shear rate sweeps were conducted over a range from 0 to 1000 s^{-1} at a constant temperature of 25 $^{\circ}\text{C}$, regulated via an integrated Peltier temperature control system. For the thermal analysis, the temperature was cycled between 10 $^{\circ}\text{C}$ and 50 $^{\circ}\text{C}$. The shear rate was fixed at 5 s^{-1} to evaluate the thermal sensitivity of solution viscosity. Data acquisition and statistical processing were carried out using Microcal Origin 9.0[®] software.

2.6 Characterization of Films

2.6.1 Thermogravimetric Analysis

The thermal stability and decomposition behavior of the films and their individual components, chitosan and MFM, were investigated by thermogravimetric analysis (TGA) and differential thermogravimetric analysis (DTG). Approximately 2 mg of each sample was placed in platinum crucibles and analyzed using a TGA/DTG STA-7800 instrument (HITACHI, Japan).

The analysis was performed in a dynamic air atmosphere at a flow rate of 300 mL/min, employing a heating rate of 30 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ from 30 $^{\circ}\text{C}$ to 1000 $^{\circ}\text{C}$. Thermal degradation profiles were recorded and processed using TA7000 Measurement STA7200RV software. Data acquisition and statistical processing were carried out using Microcal Origin 9.0[®] software.

2.6.2 Scanning Electron Microscopy (SEM)

The surface and cross-sectional morphologies of the chitosan-based films were examined by scanning electron microscopy (SEM) using a JEOL JSM-6390LV microscope (Tokyo, Japan). Samples were mounted on aluminum stubs with conductive carbon tape and analyzed under high vacuum conditions ($P < 0.0001$ mbar). Images were acquired at magnifications of 1000 $\times$ and 3000 $\times$, using an acceleration voltage of 20 kV and a secondary electron (SE) detector. These parameters were selected to ensure optimal resolution and contrast for assessing the homogeneity, porosity, and structural integrity of the films.

2.6.3 Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy was performed to assess potential chemical interactions between chitosan and MFM in the film matrix. Analyses were conducted using a Spectrum GX FTIR spectrometer (PerkinElmer, Boston, MA, USA), equipped with an attenuated total reflectance (ATR) accessory.

Spectral data were acquired over a wavenumber range of 4500–400 cm^{-1} , averaging 64 scans at a resolution of 4 cm^{-1} . Data acquisition and processing were performed using PerkinElmer Spectrum Two software (OXFORD Instruments).

2.6.4 Mechanical Properties

The mechanical behavior of the films was evaluated by tensile test on a TA Instruments DHR-1 Rheometer (New Castle, DE, USA) at a constant temperature of 25 °C, equipped with a linear film tension fixture, at 25 °C, according to the ASTM D882-02 standard method, with adaptations.

Rectangular samples of (30 × 4 mm) were obtained and the thickness of each film was measured in triplicate with a digital caliper (Sylvac/Fowler, model Ultra Cal V, with 0.01 mm resolution). The thickness values were within the range determined by the experiments described in the next section 2.5.5, titled “Film Weight and Thickness.”

Samples were subjected to axial tensile loading at a constant deformation speed (crosshead speed) of 60 mm/min until rupture, with a load cell of 50 N. The properties measured included tensile strength (T_r / MPa), elongation at break (ϵ_r %), and Young’s modulus (Y / MPa).

The experiments were conducted in quintuplicate ($N = 5$), generating a stress-strain curve for each film. Initially, all data were processed using the TRIOS® software version 4.5.0.42498 (T.A. Instruments) and subsequently exported to Prism for Windows 6.01®, where the statistical analysis of the data was performed using ANOVA and Tukey test at a significance level of $p < 0.05$. The results were presented as mean $\pm$ standard deviation.

2.6.5 Film Weight and Thickness

Film weight and thickness were assessed following the protocol described by Shah, et al. [16]. Each film was sectioned at different points along the petri dish into ten uniform squares (1.5 × 1.5 cm). Weight was measured using an analytical balance (Shimadzu AY220, Kyoto, Japan), and thickness was determined with a digital micrometer (Insize 3109-25, Suzhou,

China) with 0.001 mm precision and a 0–25 mm measurement range. Results were expressed as the mean $\pm$ standard deviation (SD) along with the coefficient of variation (CV) to assess homogeneity across film samples.

2.6.6 Swelling Degree

The swelling behavior of chitosan-based films was evaluated by the gravimetric method. Four specimens (1.0×1.0 cm) of each formulation were initially weighed using an analytical balance and subsequently immersed in simulated wound exudate fluid composed of 0.68 g NaCl, 0.22 g KCl, 2.5 g NaHCO₃, and 0.35 g NaH₂PO₄ dissolved in 100 mL of distilled water (pH 7.4). The assay was conducted at 32 °C for 8 hours. At predetermined time intervals (1, 2, 4, 6, and 8 hours), the samples were removed from the medium, gently blotted with filter paper for 1 min to remove excess surface fluid, and immediately weighed. The swelling degree was calculated according to equation: Swelling ratio (%) = $[(wF - dF)/dF] \times 100$, where dF corresponds to the initial dry weight of the film (g) and wF corresponds to the weight of the swollen film after immersion (g).

2.6.7 Moisture Content

Moisture content was determined gravimetrically, following the method outlined by Shah, et al. [21]. Three film squares (1.5×1.5 cm each) were initially weighed using an analytical balance (Shimadzu AY220) to obtain their wet mass. Samples were then dried in a forced-air convection oven (Quimis Q316M2, São Paulo, Brazil) at 60 °C for 24 hours. After drying, the samples were reweighed to determine the residual dry mass. Moisture content (%) was calculated using the equation: Moisture content (%) = $[(iW - fW) / iW] \times 100$. Where: iW = initial weight of the film; fW = final weight of the film.

2.6.8 Release Profile

The release kinetics of MFM from chitosan-based films were evaluated using a unidirectional diffusion model designed to simulate topical mucosal application. Film samples (1.539 cm^2) were placed in the donor compartment, while the receptor compartment was filled with 10 mM phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4). The system was maintained at 35 °C with constant stirring mucosal conditions for the entire eight-hour experiment. The volume of

the PBS solution ranged from 62.75 mL for the film with the highest extract concentration (QMFM 2.5% w/v) to 10.35 mL for the film with the lowest extract concentration (QMFM 0.5% w/v), respecting the proportional volume for the mucosal condition value of MFM in PBS (0.33 mg/mL).

Aliquots of 250 μ L were withdrawn and diluted in 1.750 mL of PBS at predetermined time intervals, after which an equal volume was immediately replaced. Sample collection and analysis intervals were 20 minutes in the first hour, 30 minutes in the second hour, and one-hour intervals from the third hour onwards until the experiment reached eight hours. The amount of MFM released was quantified by measuring the absorbance at 235 nm using a Thermo Scientific Multiskan GO UV-Vis spectrophotometer with SkanIt[®] software version 3.2. A standard calibration curve was prepared by dissolving MFM in PBS at concentrations ranging from 0.0015 to 0.0200 mg/mL and measuring it at 235 nm ($R^2 = 0.9969$). All experiments were conducted in triplicate.

To evaluate the phenomena underlying the MFM release, the mathematical models listed in Table 2 were evaluated via nonlinear regression using three complementary statistical criteria. The Adjusted Coefficient of Determination (R^2 Adj.) was used to access the proportion of variance explained by the model while penalizing unnecessary inclusion of parameters [22], with higher value indicating superior fit. Moreover, the Root Mean Square Error (RMSE) the average deviation between predicted and experimental data points [23], where lower values reflect minimized errors. Finally, the Akaike Information Criterion (AIC) was used to balance goodness-of-fit against model complexity [23] to avoid overfitting. Therefore, the lowest AIC values identify the most effective and parsimonious models.

Table 2 – Mathematical models used for fitting experimental data and their respective equations.

Model	Equation	Ref.
Zero-order with F_0	$F = F_0 + k_0 \cdot t$	[1]
First-order with F_{max}	$F = F_{max}(1 - e^{-k \cdot t})$	[3]
Higuchi	$F = k_h \cdot t$	[1]
Peppas-Sahlin	$F = k_1 \cdot t^m + k_2 \cdot t^{2m}$	[4]
Korsmeyer-Peppas	$F = k_{KP} \cdot t^n$	[5]
Korsmeyer-Peppas with F_0	$F = F_0 + k_{KP} \cdot t^n$	[4]
Gompertz	$F = F_{max} \cdot e^{-\beta \cdot e^{-k \cdot t}}$	[3]
Logistic	$F = \frac{F_{max}}{1 + e^{-k(t-\gamma)}}$	[6]

Gallagher-Corrigan	$F = F_{\max} \cdot 1 - e^{-k_0 t} + (F_{\max} - F_0) \cdot e^{-k_1 t} - k_2 t^2 \max 1 - e^{-k_2 t} - k_2 t^2 \max$	[7]
--------------------	--	-----

F the fraction (%) of drug released in time t
 F₀ is the fraction resulting from a burst release
 F_{max} is the maximum fraction released at infinite time
 k₀ is the zero-order release constant
 k₁ is the first-order release constant

2.7 Cell Viability Assay

Cytocompatibility of the films was assessed using the MTT assay [24]. Murine J774.A1 macrophages and L929 fibroblasts (ATCC[®] CCL-1, NCTC clone) were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) and seeded in 24-well plates. After 24 hours, 0.3 × 0.3 cm film fragments were placed in the wells. Cells treated with 0.06% dimethyl sulfoxide (DMSO) served as the vehicle control. After 48 hours of incubation at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂, MTT reagent was added, and the cells were incubated further. Absorbance was measured at 570 nm using a Thermo Scientific Multiskan GO spectrophotometer. Data were reported as the percentage of viable cells relative to the control group. Experiments were performed in triplicate (n = 3).

2.8 Anti-inflammatory Activity

2.8.1 Nitric Oxide (NO) Production

Nitric oxide production was quantified indirectly through nitrite concentration using the Griess assay, as described by Sun, et al. [25]. Mouse peritoneal macrophages were exposed to 0.3 × 0.3 cm film fragments diluted in 0.06% DMSO and incubated for 1 hour. Cells were subsequently stimulated with interferon-gamma (IFN-γ, 1 ng/mL) and lipopolysaccharide (LPS, 1 μg/mL), followed by 48 hours of incubation. Supernatants were collected and mixed with Griess reagent in a 96-well microplate and incubated at room temperature for 10 minutes. Absorbance was measured at 540 nm using a UV-Vis spectrophotometer (ThermoScientific Multiskan GO). Unstimulated and DMSO-treated stimulated cells served as negative and positive controls, respectively. A standard curve using sodium nitrite (NaNO₂) at a concentration of 200 μM was used for quantification. Results were expressed as

mean $\pm$ standard deviation and reported as IC₅₀ values ($\mu\text{g/mL}$). Experiments were conducted in triplicate ($n = 3$).

2.8.2 Cytokine Quantification (IL-6 and IL-12)

The concentrations of pro-inflammatory cytokines IL-6 and IL-12 in culture supernatants were quantified using ELISA method, according to the manufacturer's instructions. Peritoneal macrophages were treated with 0.3×0.3 cm film fragments (diluted in 0.06% DMSO) and incubated for 6 hours. Cells were then stimulated with LPS ($1 \mu\text{g/mL}$) and IFN- γ (1 ng/mL) for an additional 24 hours. Cytokine levels were determined using BD OptEIA™ ELISA kits (BD Biosciences) following the manufacturer's protocol. Absorbance was measured at 450 nm using a Multiskan GO spectrophotometer. Cytokine concentrations (pg/mL) were calculated from standard curves. Each experiment was conducted in triplicate.

2.9 Scratch Assay

The effect of the films on cell migration was assessed using an in vitro scratch assay, as adapted from Silva, et al. [26]. L929 fibroblasts (5×10^4 cells/well) were seeded in 24-well plates and incubated for 24 hours to allow monolayer formation. A linear scratch was made with a sterile 200 μL pipette tip, and a 0.1×0.1 cm film piece was placed over the scratched area. Control wells received fresh DMEM only. Microscopic images were captured at 0, 24, and 48 hours using a FLx800 microscope (BioTek Instruments, USA) at $10\times$ magnification. Cell migration into the scratched area was analyzed using ImageJ software (v1.54), and fibroblast migration (%) was calculated based on the reduction of scratch width over time. Experiments were performed in triplicate. Migration rate (%) = $[(\text{Scratch area } (t_0) - \text{Scratch area } (t_f)) / \text{Scratch area } (t_0)] \times 100$. Where: Scratch area (t_0) = scratch area at time 0 h; Scratch area (t_f) = scratch area at 24 or 48 h.

2.10 Antifungal Activity

2.10.1 Fungal Strains

The antifungal efficacy of the chitosan-based films containing MFM was evaluated against four *C. albicans* strains: (i) ATCC® 10231: A multi-drug resistant strain (resistant to

anidulafungin, voriconazole, itraconazole, and fluconazole); (ii) ATCC® 24433™: A strain susceptible to conventional antifungals; (iii) *C. albicans* VV1: A clinical isolate from the vulvovaginal region, (iv) *C. albicans* O2: A clinical isolate from the oropharyngeal region.

2.10.2 Growth Inhibition Assay

Film samples containing MFM (QMFM) at concentrations of 1.0% and 2.5% (w/v) were cut into 3 mm² pieces and placed in 96-well microplates containing 180 µL of sterile RPMI 1640 medium. QBR was also included under the same conditions. Subsequently, 20 µL of *C. albicans* inoculum (3×10^3 CFU/mL), standardized to 1.0 McFarland, was added to the appropriate wells. The experimental design included a growth control consisting of RPMI with fungal inoculum only, a blank control with RPMI and QBR film without fungus, and a medium control with RPMI only. Plates were incubated at 35 °C for 24 hours, after which 150 µL from each well was transferred to a new plate and absorbance was measured at 600 nm using a Thermo Scientific Multiskan GO spectrophotometer. The percentage of fungal growth inhibition was calculated relative to the growth control, according to the method described by Balkrishna et al. [27]. All experiments were performed in triplicate.

2.10.3 Time-Kill Assay

The fungicidal activity of the films was evaluated using a time–kill curve assay adapted from Lemos et al. [28]. Circular discs (0.5 cm in diameter) of each film were UV-sterilized and incubated in 96-well plates containing 180 µL of sterile RPMI 1640 medium inoculated with fungal suspensions (5×10^3 CFU/mL, standardized to 1.0 McFarland). The plates were maintained at 37 °C, and optical density (OD) at 595 nm (Thermo Scientific Multiskan GO, Software 3.2) was recorded at 0, 4, 6, 8, 12, 24, and 36 hours to monitor fungal growth kinetics and determine time-dependent inhibitory effects. Wells containing RPMI with fungal inoculum were included as growth controls. All assays were performed in triplicate to ensure reproducibility.

2.10.4 Biofilm Inhibition – Adhesion Phase

The ability of the films to inhibit initial fungal adhesion was evaluated using a modified protocol based on Sadan et al. [29]. Circular discs of each film (0.5 cm diameter) were UV-

sterilized and placed in 96-well plates containing 180 μ L of sterile RPMI 1640 medium supplemented with 1% glucose. *C. albicans* suspensions (1×10^6 CFU/mL) were added to each well to ensure uniform inoculum. Plates were incubated at 35 °C for 24 h under static conditions. After incubation, films were carefully removed, and non-adherent planktonic cells were washed away with sterile distilled water. Adhered biofilm cells were resuspended by adding 200 μ L of sterile distilled water and agitating for 5 min to detach cells uniformly. The OD of the resulting suspensions was measured at 595 nm using a Thermo Scientific Multiskan GO spectrophotometer (Software 3.2). Nystatin was used as a positive control, and wells containing only RPMI with *C. albicans* served as negative (growth) controls. All experiments were performed in independent triplicates to ensure reproducibility. The percentage of biofilm inhibition was calculated using the following equation: $[(\text{OD}_{\text{control}} - \text{OD}_{\text{treatment}}) / \text{OD}_{\text{control}}] \times 100$.

2.10.5 Biofilm Inhibition – Proliferation Phase

The disruption of established *C. albicans* biofilms was assessed using a modified protocol based on Nostro et al. [30]. Biofilms were formed by incubating fungal suspensions (1×10^6 CFU/mL) in 96-well plates containing RPMI 1640 medium supplemented with 1% glucose at 35 °C for 24 hours under static conditions. After biofilm formation, wells were washed three times with sterile distilled water to remove non-adherent planktonic cells. Subsequently, Circular discs of each film (0.5 cm diameter) were added to each well, and plates were incubated for an additional 24 hours at 35 °C. Biofilm biomass was quantified by measuring the OD at 600 nm using a Thermo Scientific Multiskan GO spectrophotometer. Nystatin was included as a positive control, and untreated wells served as negative controls. All assays were conducted in independent triplicates to ensure reproducibility. To calculate the percentage of biofilm inhibition, the OD values of the growth control group for each strain were compared with that of the treated group using the following equation: $[(\text{OD}_{\text{control}} - \text{OD}_{\text{treatment}}) / \text{OD}_{\text{control}}] \times 100$.

2.10.6 Experimental in vivo model of vulvovaginal candidiasis (VVC)

To establish an in vivo model of VVC, 30 female Wistar rats weighing 150–200 g were immunosuppressed by administration of cyclophosphamide (CPA) at a dose of 50 mg/kg. The

estrous phase was induced by subcutaneous injection of estradiol cypionate (0.2 mg/mL) once daily for four days prior to infection.

The animals were randomly divided into six experimental groups: non-infected control group; infected group treated with 0.85% saline solution; infected group treated with nystatin (25,000 UI/g) (positive control); infected group treated with QBR; and infected groups treated with QMFM 1.0% and 2.5% QMFM 2.5%.

For infection induction, the animals received an intravaginal inoculation of 0.1 mL containing 10^6 fungal cells of *C. albicans* (ATCC® 10231) using a micropipette with disposable sterile tips. On the second day post-inoculation, the vaginal fungal burden was assessed by collecting vaginal fluid with 0.1 mL of sterile saline solution. Colony-forming units (CFU) were determined by culturing the samples on Sabouraud Dextrose Agar (SDA) plates. Infection confirmation was established based on an average fungal burden of at least 10^3 CFU/mL in vaginal wash cultures from each rat [25].

To evaluate the therapeutic potential of QBR, QMFM 1.0%, and QMFM 2.5% for the treatment of VVC, chitosan films measuring 1×1 cm were administered intravaginally. The film dimensions were standardized according to the anatomical size of the rat vaginal cavity to ensure adequate administration and contact with the vaginal mucosa. The infection and positive control groups received 0.1 mL of saline solution or nystatin formulation, respectively. Treatments were administered once daily for three consecutive days. Vaginal fungal burden was evaluated on the first and third days after treatment initiation to assess antifungal efficacy. On day 4, animals were euthanized, and vaginal and vulvar tissues were collected for histopathological evaluation. Samples were fixed in 10% buffered formalin, longitudinally trimmed, embedded in paraffin, and sectioned at 5 μ m thickness. Sections were stained with Hematoxylin and Eosin (HE) to assess tissue responses to both *Candida* infection and the different treatment regimens.

Throughout the study, the rats were housed in the Pharmacology Laboratory of the Federal University of São João del-Rei (UFSJ – Centro-Oeste Campus). All experimental procedures were conducted in accordance with national and international guidelines for animal experimentation and were approved by the Institutional Animal Ethics Committee (CEUA/UFSJ; Protocol No. 5338280325).

2.11 Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using OriginPro 9.0® and GraphPad Prism 8.0.1

software. ANOVA followed by the Bonferroni post-test ($p < 0.05$) was applied. Results are expressed as mean $\pm$ standard deviation.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Determination of Total Phenolic Content

The total phenolic content of the MFM extract determined by the Folin–Ciocalteu [20] method was $177,4246 \pm 8,533$ mg TAE/g extract, demonstrating a high concentration of phenolic constituents in the methanolic extract. This finding reinforces the phenolic-rich phytochemical profile previously reported for *Mitracarpus frigidus* and provides an important parameter for the quantitative standardization of the extract incorporated into the developed chitosan-based films.

Previous studies involving methanolic extracts of *M. frigidus* aerial parts have already demonstrated elevated flavonoid contents, with values of approximately 108 mg rutin equivalents/g extract [31], indicating that flavonoids represent a major fraction of the bioactive metabolites present in the species. In addition, aqueous extracts of *M. frigidus* were reported to contain 84.19 ± 2.10 mg TAE/g extract [32]. The higher phenolic content observed in the present study may be associated with the extraction solvent employed, since methanol is recognized as a highly efficient solvent for the extraction of medium- and low-polarity phenolic compounds, especially flavonoids and phenolic acids.

The elevated phenolic content obtained for MFM is consistent with previous chromatographic and spectrometric investigations of methanolic extracts of *M. frigidus*. HPLC and UFLC-QTOF-MS analyses previously identified several phenolic and flavonoid-related constituents in MFM, including rutin, kaempferol, kaempferol-3-O-rutinoside, chlorogenic acid, quercetin derivatives, clarinoside, and other glycosylated flavonoids, in addition to triterpenes such as ursolic acid and the bioactive naphthoquinone psychorubrin [31, 32]. These compounds are widely recognized for their antioxidant, anti-inflammatory, and antimicrobial activities and may contribute directly to the biological performance observed for the developed formulations.

Furthermore, previous studies using HPLC fingerprinting of MFM proposed rutin, kaempferol derivatives, ursolic acid, and psychorubrin as chemical markers for extract standardization, supporting the reproducibility and phytochemical consistency of methanolic extracts obtained from this species. Therefore, the determination of total phenolic content

associated with literature chromatographic data strengthens the phytochemical characterization and standardization of the extract used in the present study.

3.2 Characterization of Film Precursor Solutions

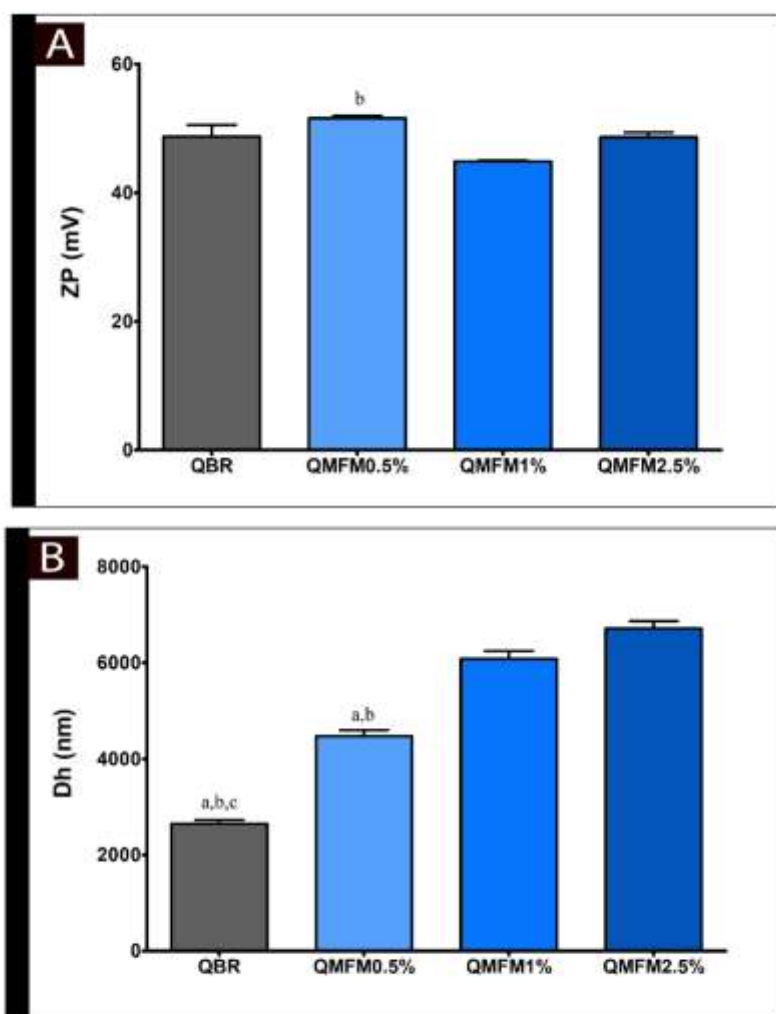
3.2.1 Zeta Potential and Hydrodynamic Diameter

The ZP of the film precursor solutions were measured to evaluate the surface charge and colloidal stability of the suspended particles. ZP is a critical physicochemical parameter that reflects the electrostatic interactions among dispersed particles, directly influencing their stability, aggregation behavior, and homogeneity in suspension [33].

In acidic environments, the amino groups of chitosan undergo protonation, resulting in a net positive charge and an overall positive ZP. This ZP varied between 41.6 and 52.3 mV for all precursor formulations (Figure 1A) [29]. These positively charged ionic species are attributed to the protonated amino functionalities present on the chitosan backbone [34,35].

The incorporation of MFM into the chitosan matrix did not significantly alter the ZP values compared to QBR ($p \geq 0.05$) (Figure 1A).

Figure 1. Characterization of film precursor solutions of the chitosan films containing the extract of *M. frigidus* (QMFM 0.5-2.5% w/v) and the blank film (QBR). Figure A: zeta potential (ZP) values. Figure B: hydrodynamic diameter (Dh). b – significant difference compared to QMFM 2.5% (w/v); c – significant difference compared to QMFM 1% (w/v); d – significant difference compared to QMFM 0.5% (w/v). Statistical analysis performed using ANOVA followed by Bonferroni's test ($p < 0.05$).



ZP values greater than +30 mV or less than −30 mV are appropriate because they maintain electrostatic repulsion, which is essential to avoid particle aggregation and ensure uniform dispersion throughout the polymer solution. These values are critical not only for reproducible film formation, but also for optimizing therapeutic efficacy and manufacturing robustness. Furthermore, MFM's surface charge may modulate its interaction with the chitosan matrix, influencing the final film's structural organization and functional properties, such as permeability, bioadhesion, and drug release [35, 36,37]. The hydrodynamic diameter (Dh) is a fundamental parameter for characterizing suspended species, especially for determining the average particle size in colloidal systems such as precursor film solutions. The size of particles dispersed in a solution can significantly impact the physicochemical properties of the final product [38].

Chitosan, when in acidic aqueous media, exhibits a strong tendency to form entangled polymeric chains through intra- and intermolecular interactions, especially in the presence of

other solutes [34]. The incorporation of MFM into the chitosan matrix led to an observable increase in particle size, with a concentration-dependent profile (Figure 1B). This size increase is likely due to the formation of extract-rich aggregates that either weakly interact with the chitosan matrix or remain unincorporated.

Ferreira, et al. [9] observed that, when MFM was subjected to DLS analysis by titration, the probability of intermolecular interactions between phytochemicals increased as the MFM concentration increased. This resulted in larger and less uniform particle populations. MFM contains high levels of phenolic compounds and weak acids, such as kaempferol-3-O-rutinoside, rutin, ursolic acid, and scopolentin [39,40]. In an acidic medium, these compounds lose their degree of ionization and undergo self-association and aggregation [9,41]. Considering the acidic behavior of the precursor solutions (pH ~4) and the self-association behavior of the extract compounds, larger clusters are expected to form at high MFM concentrations. Furthermore, previous studies have shown that polyphenols associate with the chitosan matrix, resulting in an increase in overall particle size [42].

Understanding the hydrodynamic diameter is essential to developing chitosan-based films because particle size can significantly affect the physicochemical properties of the final product. For example, larger particles can reduce transparency, alter surface roughness, and compromise structural integrity. Additionally, particle size is closely associated with the release kinetics of embedded actives. Smaller, well-dispersed particles typically promote more controlled and homogeneous release, whereas larger aggregates may hinder or delay release profiles [38].

3.2.2 Rheological Parameters

The rheological behavior of the film precursor solutions was comprehensively investigated to evaluate their flow and viscoelastic properties, with the aim of determining their suitability for large-scale pharmaceutical processing. Viscosity is a critical parameter in formulation quality control, directly influencing film thickness, uniformity, and reproducibility [34,36]. Oscillatory rheological measurements were employed to determine the storage modulus (G') and loss modulus (G''), with both axes represented on a logarithmic scale to reflect the power-law behavior typical of polymer systems. G' reflects the elastic components, whereas G'' reflects the viscous components. In all formulations, G'' values exceeded G' , indicating a predominantly liquid-like viscoelastic profile (Figure 2A), characteristic of weakly structured

polymer solutions that display limited elasticity but may form transient structural domains under shear [43].

Comparison between QBR and MFM-containing formulations revealed that QMFM 0.5% (w/v) exhibited a notably lower G' , suggesting reduced intermolecular interactions and increased fluidity at low extract concentrations. In contrast, formulations containing 1% or 2.5% (w/v) MFM displayed higher G' values, indicative of enhanced structuring and viscosity due to interactions between phenolic compounds present in the extract and the protonated amino groups of chitosan. These interactions correlate with D_h values, as higher extract concentrations increase solid particle content and overall solution viscosity [36]. Interestingly, the increase in viscosity was not strictly dose-dependent; QMFM 2.5% (w/v) exhibited G' and G'' values similar to the QBR, suggesting that higher extract concentrations did not induce significant structural changes in the polymer [44].

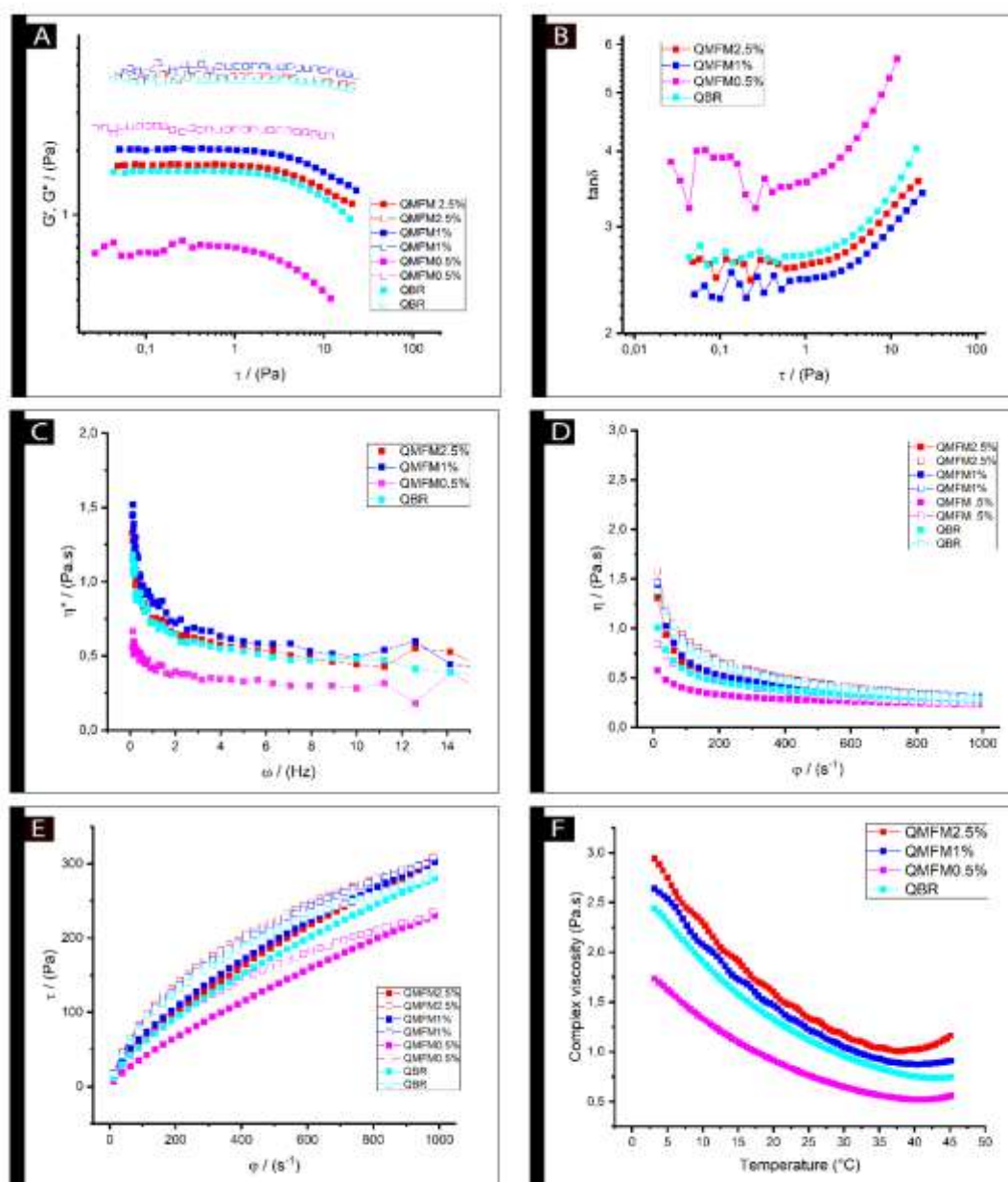
The damping factor ($\tan \delta = G''/G'$) was calculated to further characterize viscoelastic behavior. Values of $\tan \delta > 1$ confirmed predominantly viscous behavior in all formulations [45], consistent with poorly entangled chitosan chains and relatively weak interactions in the absence of crosslinking agents [46,47]. QMFM 0.5% (w/v) exhibited the highest $\tan \delta$ across the shear stress range (Figure 2B), reflecting greater fluidity and interference of low-concentration extract constituents with polymer interactions through hydrogen bond disruption and electrostatic repulsion, as previously described for gallate-functionalized chitosan [9,48]. Conversely, the 1% (w/v) MFM formulation displayed lower $\tan \delta$ values, indicative of stronger elastic contributions, likely due to intermolecular interactions and cross-bridging between phenolic compounds in the extract and the polymer, which promoted a more interconnected network that restricted chain mobility [18,26]. The 2.5% (w/v) formulation exhibited an intermediate profile, likely due to increased formation of extract aggregates that reduced effective polymer interactions, maintaining structural integrity comparable to the QBR [10].

Complex viscosity ($|\eta^*|$) decreased with increasing shear frequency (Figure 2C), reflecting pseudoplastic (shear-thinning), non-Newtonian behavior, consistent with the alignment of polymer chains in the flow direction [47]. The QMFM 0.5% (w/v) formulation exhibited the lowest $|\eta^*|$ values, confirming its higher fluidity, while QMFM 1% (w/v) displayed elevated viscosity, and QMFM 2.5% (w/v) showed values comparable to QBR, consistent with the trends observed for G' and $\tan \delta$. Flow curves under increasing and decreasing shear rates (Figure 2D) revealed thixotropic behavior in all samples, with smaller hysteresis loops for QMFM 1% (w/v), reflecting more structured and elastic networks, whereas

wider loops in QMFM 0.5% and 2.5% (w/v), similar to QBR, indicated greater fluidity and weaker intermolecular interactions [18,49,50].

Thermal sensitivity was assessed by viscosity–temperature curves (Figure 2F). Viscosity showed a consistent decline from 10 to approximately 25 °C and stabilized up to 40 °C, reflecting increased polymer mobility and reduced intermolecular interactions [51]. The QMFM 0.5% (w/v) formulation exhibited a more gradual decline, likely due to disruption of the polymer matrix, but maintained thermal stability in the 25–40 °C range, demonstrating favorable robustness even at low extract concentrations [52].

Figure 2. Reological analysis of the precursor solutions of the chitosan films containing the extract of *M. frigidus* (QMFM 1-2.5% w/v) and the blank film (QBR). A: viscoelastic properties by amplitude sweep curve. B: damping factor curve. C: Complex viscosity curve. D and E: analysis.steady-state viscosity and flow curves. F: viscosity versus temperature curve (10-50°C).



The non-linear rheological behavior observed upon MFM incorporation can be explained by concentration-dependent mechanisms. At low concentrations (QMFM 0.5%), phenolic and weak acidic constituents of the extract are likely act as plasticizers, disrupting intermolecular hydrogen bonding among chitosan chains, thereby increasing molecular mobility and reducing apparent viscosity. At intermediate concentrations (QMFM 1%), a significant viscoelastic structuring was observed—evidenced by higher G' —consistent with polyphenol–polymer interactions (multiple hydrogen bonding and ionic complexation), promoting greater transient entanglement of the network. At higher concentrations (QMFM 2.5%), the system appeared to enter a saturation/heterogenization regime, where extract particle

aggregation and possible phase separation limited further interactions, resulting in rheological properties comparable to the control. These findings corroborate Dh and SEM analyses, which revealed increased aggregate formation at higher extract concentrations. Such non-monotonic trends between additive and polymeric matrix have been previously described in polysaccharide systems enriched with phenolic extracts and in chitosan-based formulations, reporting concentration windows with plasticizing effects followed by aggregation or saturation phenomena [44].

3.3 Characterization of Films

The films were developed as innovative delivery systems aimed at enhancing the antifungal efficacy of MFM. This formulation strategy seeks to overcome microbial resistance commonly observed with conventional antifungal therapies, while improving patient compliance through ease of application and treatment comfort.

Macroscopically, the films exhibited a dark green coloration, whose intensity increased proportionally with the MFM concentration. A mild, characteristic herbal odor was also noted. All films were homogeneous in texture, with no visible phase separation or particulate aggregates. Slight surface irregularities were observed but were minimal and did not compromise film integrity.

3.3.1 Thermogravimetric Analysis (TGA/DTG)

Thermal stability and degradation profiles of the films were evaluated using thermogravimetric analysis (TGA) and derivative thermogravimetric analysis (DTG). The results are shown in Figure 3. For the control chitosan (CH), the DTG curve (Figure 3B) revealed two prominent thermal events at approximately 240 °C and 450 °C, corresponding to distinct stages of polymer degradation. These thermal transitions are attributed to the breakdown of the pyranose ring and the cleavage of glycosidic linkages between glucosamine and N-acetylglucosamine units, which are key structural features of chitosan [53].

These findings are further supported by the TGA curves (Figure 3A), which reveal an initial weight loss of approximately 10% occurring between 170 °C and 270 °C (Table 3). This early mass reduction is likely attributed to the evaporation of moisture and the onset of structural destabilization. A more significant weight loss of around 32% is observed between

330 °C and 480 °C, corresponding to the primary thermal degradation phase of the chitosan backbone, in line with its characteristic thermal decomposition behavior.

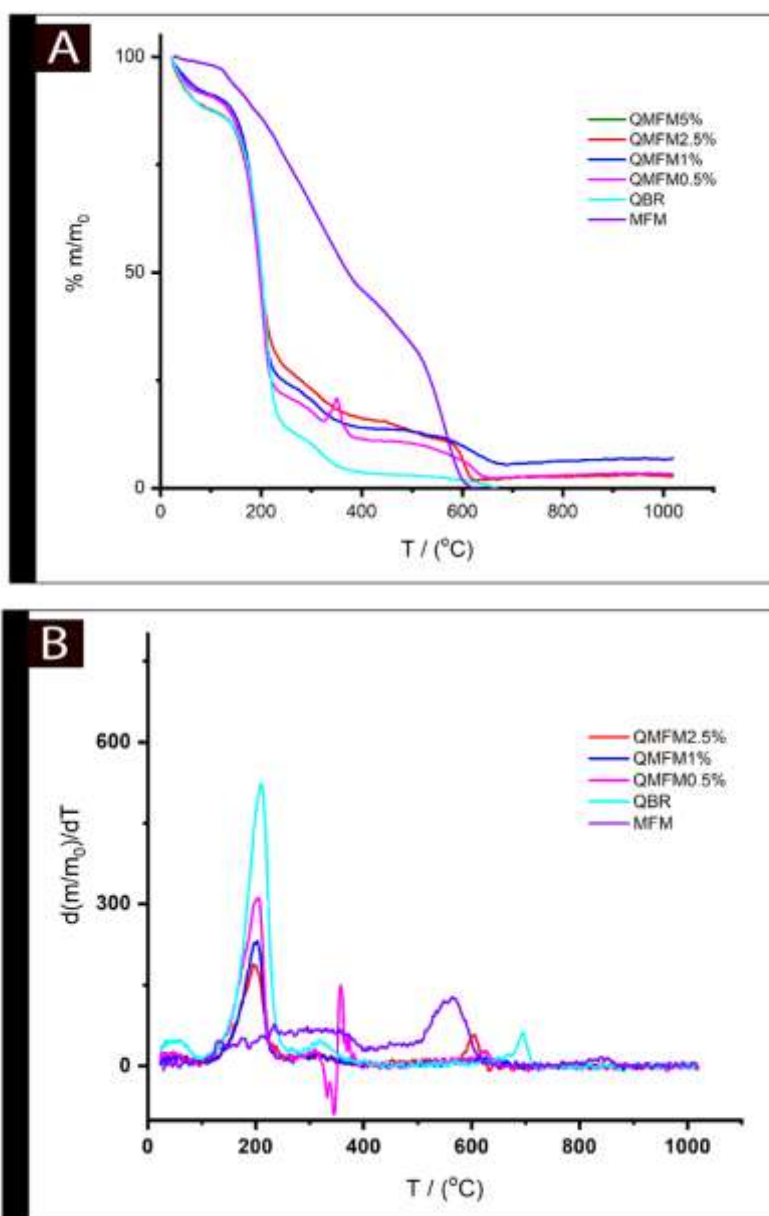
Table 3: Temperature intervals and corresponding thermal degradation (Td) and mass loss (Δm) of chitosan, methanolic extract of *Mitracarpus frigidus* (MFM) and polymer films.

	$\Delta 1$		$\Delta 2$		$\Delta 3$	
	Td ₁ (°C)	Δm_1	Td ₂ (°C)	Δm_2	Td ₃ (°C)	Δm_3
Chitosan	170 -270	10%	330 - 480	32%	500 – 650	20%
MFM	0-100	10%	240-475	10%	670-730	60%
QMFM 5%	30-120	11%	120-290	55%	330-650	60%
QMFM 2.5%	30-120	12%	120-290	66%	-	-
QMFM 1%	30-120	9%	120-290	70%	-	-
QMFM 0,5%	30-120	9%	120-290	71%		
QBR	30-120	12%	120-290	75%	-	-

A comparative assessment of CH and the QBR film formulation revealed that the film processing method significantly altered the thermal degradation profile of the chitosan. Both samples exhibited prominent mass loss events around 190 °C and 400 °C, which are related to depolymerization and polysaccharide backbone decomposition, respectively. However, while the CH sample lost approximately 40% of its mass at 400 °C, the QBR film sample exhibited nearly complete mass loss (100%) at the same temperature.

DTG curves further highlighted this difference. The polymeric films displayed a dominant thermal event at ~200 °C. In contrast, powdered chitosan exhibited two distinct peaks at ~200 °C and ~350 °C, indicating a more complex thermal response [21]. Both profiles shared an initial decomposition event near 200 °C, which aligns with the first degradation step of chitosan.

Figure 3. Thermogravimetric analysis of chitosan films containing the extract of *M. frigidus* (QMFM 0.5-2.5% w/v) and the blank film (QBR). A: TGA curves; B: DTG curves.



This behavior indicates that the film processing method, particularly the acid dissolution and solvent casting steps, induces significant structural and compositional changes in chitosan, leading to reduced thermal resistance. In its powdered form, chitosan maintains native crystalline regions and extensive interchain hydrogen bonding, both of which contribute to its higher thermal stability. However, acid-mediated dissolution, especially using acetic acid, promotes protonation of amino groups and partial depolymerization of the polymer chains [54]. These alterations create a more amorphous and flexible network, rendering the material more thermolabile and prone to earlier degradation under thermal stress.

Furthermore, the reduction in crystallinity and disruption to the intermolecular hydrogen bonding network in chitosan films increases the exposure of thermally labile sites, accelerating the onset of thermal decomposition. Similar trends have been documented in studies comparing the thermal behavior of chitosan in its powdered form with that of films processed using various acidic solvents, highlighting the influence of solvent-mediated modifications on the polymer's thermal stability [55]. For instance, Li, et al. [56] showed that film formation with acidic solvents can significantly lower the degradation onset temperature due to decreased molecular order and increased chain mobility. These findings support the hypothesis that film processing alters the physical form and internal molecular architecture of chitosan, thereby compromising its thermal resistance. The thermogravimetric profile of MFM showed continuous and progressive mass loss beginning in the early stages of heating.

This initial weight loss occurs between approximately 30 °C and 120 °C and is attributed to the volatilization of low-molecular-weight compounds. These compounds include residual solvents, physically adsorbed water, and volatile phytochemicals from the methanolic extract of *M. frigidus* (MFM). Thermal degradation then proceeded gradually until total decomposition at around 500 °C, which is consistent with previous findings [9].

All polymeric films, including QBR loaded with MFM, exhibited this initial mass loss in the 30–120 °C range. A second, more distinct degradation peak occurred between 120 °C and 290 °C. This peak corresponds to the breakdown of the chitosan matrix through depolymerization and cleavage of glycosidic bonds [54]. Notably, this thermal event was more intense in the QBR film than in the MFM-containing formulations, which displayed broader and more attenuated peaks.

Between 200 °C and 400 °C, the MFM-loaded films exhibited a more gradual and attenuated mass loss compared to the QBR control. Among the tested formulations, the QMFM 2.5% (w/v) sample displayed the greatest thermal resilience, characterized by the lowest degradation rate and a less abrupt weight reduction.

This improved thermo-oxidative stability is most likely associated with hydrogen bonding interactions between chitosan and specific phenolic constituents of MFM, such as gallic acid, chlorogenic acid, and flavonoids including quercetin and kaempferol, all of which are well-documented to establish stabilizing interactions within polysaccharide matrices. Such molecular interactions are presumed to yield a more cohesive polymer–extract network, thereby retarding the onset and progression of thermal degradation [9,57]. In addition, the intrinsically complex composition of MFM—comprising low- and high-molecular-weight compounds with

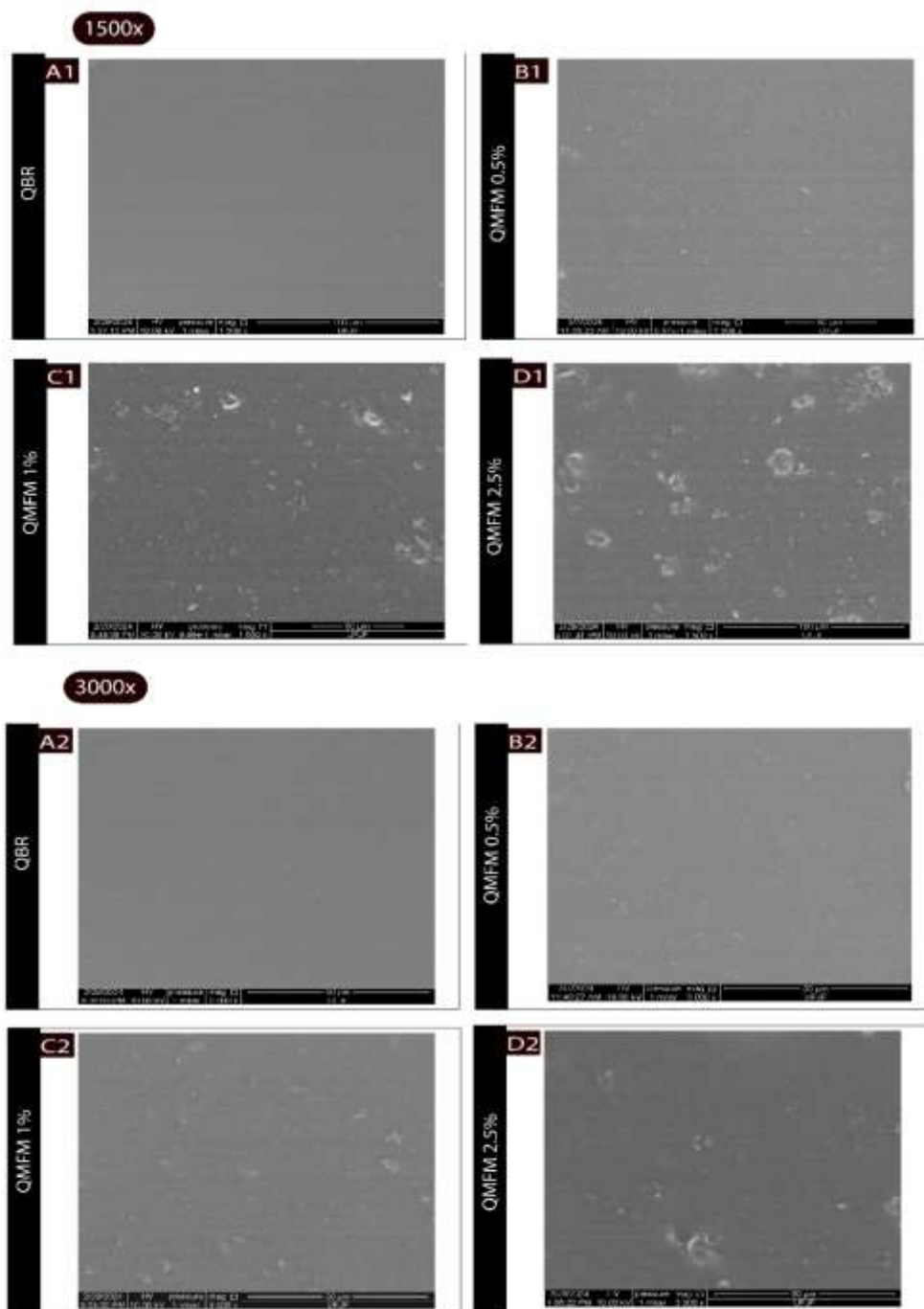
distinct volatilities and thermal behaviors—likely accounts for its broader and more heterogeneous degradation [10,39].

The thermal stability results indicate that the films maintain their structural integrity at ambient temperature, as the primary degradation events occur only above 120 °C. This behavior demonstrates that, under typical storage and handling conditions, the films exhibit high resistance to thermal fluctuations. Such stability is particularly relevant for commercial applications, as it ensures an extended shelf life, minimizes the need for specialized storage conditions, and enhances the feasibility of large-scale distribution. Furthermore, maintaining structural and functional properties at room temperature represents a critical advantage for the use of these films in packaging and biomedical materials [58]

3.3.2 Scanning Electron Microscopy (SEM)

Scanning electron microscopy (SEM) was employed to evaluate the surface morphology and internal structural organization of polymeric films. Images of the surfaces (Figure 4) and cross-sections (Figure 5) were captured at magnifications ranging from 1000× to 3000×.

Figure 4. Scanning electron microscopy of the surfaces of chitosan films containing the extract of *M. frigidus* (QMFM 0.5-2.5% w/v) and the blank film (QBR). A1: QBR 1500x A2: QBR 3000x; B1: QMFM 0,5% 1500x B2: QMFM 0,5% 3000x; C1: QMFM 1% 1500x; C2: QMFM 1% 3000x; D1: QMFM 2,5% 1500x; D2: QMFM 2,5% 3000x;



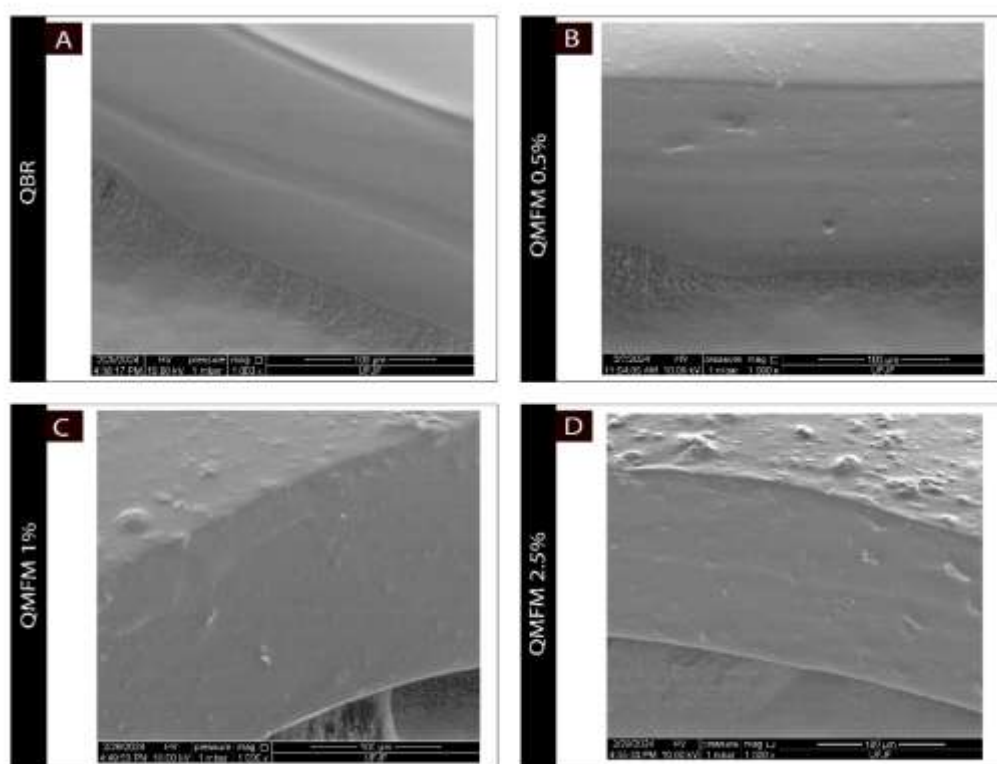
SEM micrographs revealed that the QBR film exhibited a homogeneous, smooth surface, devoid of any visible surface agglomerates or defects. In contrast, the MFM-loaded films showed a progressive increase in the formation of particulate agglomerates on the surface (Figure 5). These results directly correlate with the progressive increase in the hydrodynamic diameter of MFM-loaded films, particularly those with higher extract concentrations (MFM 1% and 2.5% w/v). This increase is likely due to the formation of agglomerates, presumed to be

clusters of extract-derived compounds that were not fully incorporated or solubilized within the polymer matrix.

The formation of these discrete domains may be attributed to partial phase separation or precipitation of low-solubility phytochemicals, especially at higher MFM concentrations. Despite this, the films retained overall structural cohesion and continuity, indicating that the presence of agglomerates did not significantly disrupt film integrity at the microscopic level.

An analysis of the film cross-sections (Figure 5) produced results that were consistent with the observations made on the surface. The QBR film had a smooth, uniform edge. In contrast, the MFM-incorporated films exhibited agglomerate formation proportional to the amount of extract added.

Figure 5. Scanning electron microscopy of the cross-sections of chitosan films containing the extract of *M. frigidus* (QMFM 0.5-2.5% w/v) and the blank film (QBR). A: QBR; B: QMFM 0,5%; C: QMFM 1%; D: QMFM 2,5%.



SEM analysis visually demonstrated the affinity between the extract and the polymer matrix, revealing morphological uniformity across the films. A recent study has shown that MFM tends to form aggregates at higher solution concentrations [9]. Thus, the agglomerates found on the surface and edges of the films indicate portions of the extract that did not

adequately interact with the polymer matrix [41]. The size and number of these aggregates increased proportionally with extract concentration, which corroborates the hydrodynamic diameter analysis of the precursor solutions.

3.3.3 Fourier-transform infrared (FTIR)

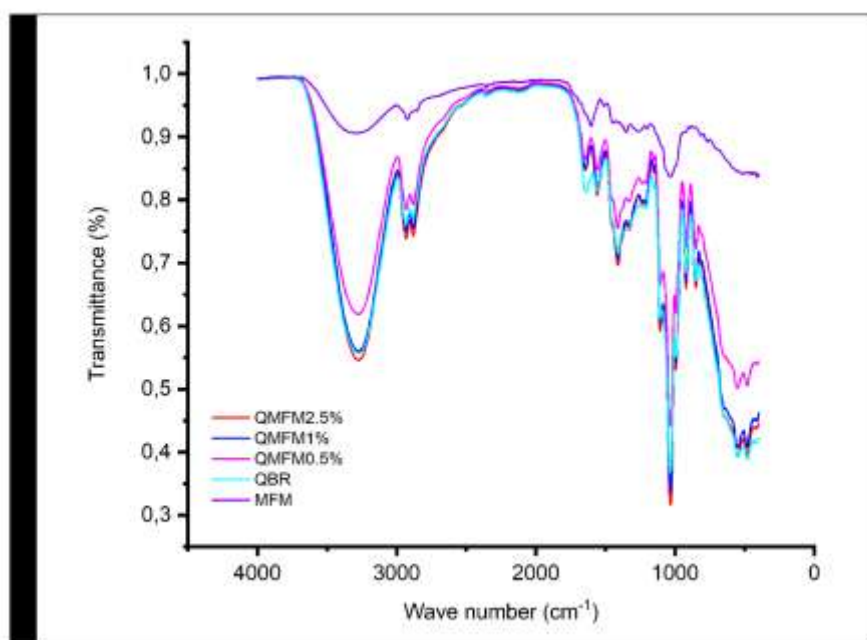
To investigate potential intermolecular interactions between the extract components and chitosan, Fourier-transform infrared (FTIR) vibrational spectroscopy was performed (Figure 6). The 1697 cm^{-1} band, which corresponds to the C=O stretching of amides, carboxylic acids, and esters, and the 1354 cm^{-1} band, which corresponds to the C=O stretching of carboxylic acids, may be associated with the presence of triterpenoids, such as ursolic acid and methyl ursolate, which are commonly reported in MFM extracts. These compounds are known for their characteristic carboxylic functional groups. The bands at 1602 cm^{-1} and 1513 cm^{-1} are assigned to C=C stretching in aromatic rings and N–H bending. These bands further support the presence of aromatic phenolic structures such as chlorogenic acid, caffeic acid, and flavonoids, which contain aromatic backbones with amino or hydroxyl substituents. Additionally, absorption at 1444 cm^{-1} (CH₂ bending) and 1039 cm^{-1} (C–O stretching of phenols) are characteristic of long-chain aliphatic compounds and phenolic hydroxyl groups, respectively. This indicates the coexistence of lipophilic terpenoids and hydrophilic phenolic compounds in the extract. Lower-wavenumber signals, such as those at 817 and 770 cm^{-1} , are indicative of out-of-plane bending vibrations of alkenes and aromatic C–H bonds, which are commonly found in flavonoids, aromatic acids, and other polyphenolic structures.

In the QBR sample, the main bands were identified at 3273 , 2935 , 2883 , 1644 , 1561 , 1410 , 1108 , and 1031 cm^{-1} (Figure 6). The broad bands between 3000 and 3500 cm^{-1} are attributed to O–H and N–H stretching associated with the chitosan backbone and glycerol, which is one of the film components. Bands at 1640 , 1561 , and 1108 cm^{-1} correspond to amide I, II, and III bands, respectively. Bands at 2935 and 2883 cm^{-1} are related to CH₂ groups in the pyranose rings. The 1410 cm^{-1} band corresponds to O–H bending vibrations [9,57,59].

Figure 6 shows that the FTIR spectra of all MFM-containing formulations significantly overlapped with QBR, indicating that incorporating the extract did not result in new detectable covalent bonds. However, noticeable changes in band intensity were observed in all extract-loaded samples. Similar results were reported by Gómez-Estaca et al. [60] in chitosan films containing rosemary extract; by Kanatt et al. [61] in films containing green tea extract; and by Jiang et al. [62] in films containing Akebia trifoliata extract. In these studies,

polyphenol-rich plant extracts promoted supramolecular interactions without drastically altering the characteristic bands of chitosan but causing noticeable changes in band intensity and broadening in the FTIR spectra.

Figure 6. Infrared spectra of extract of *M. frigidus* (MFM), chitosan films containing MFM (QMFM 0.5%-2.5% w/v), and the blank film (QBR).



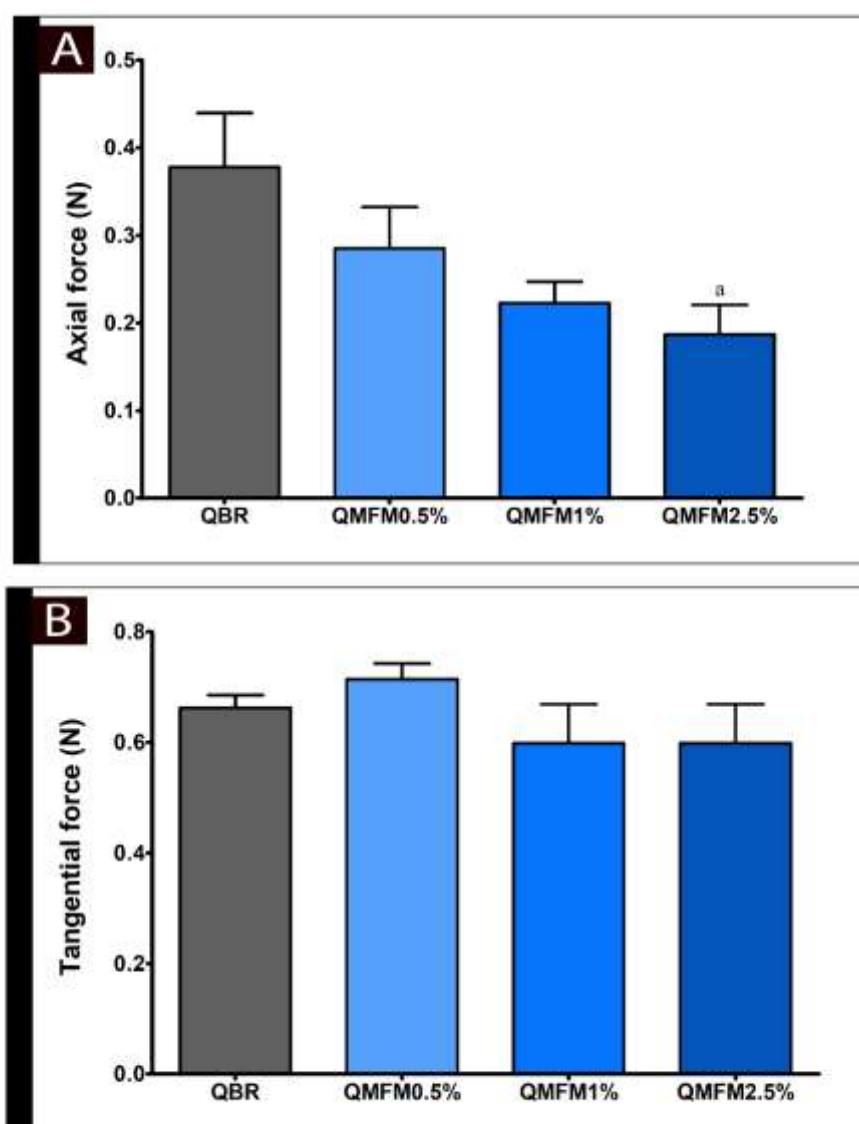
The similarity in the overall FTIR profiles between QBR films and those loaded with MFM further confirms that the interactions are predominantly physical or supramolecular, rather than covalent. Hydrogen bonding, electrostatic forces, and rearrangements in polymer chain packing can alter band intensity and broadening without introducing new characteristic peaks. This explains why the main features of chitosan remain visible after MFM incorporation, even though interaction strength varies with extract concentration. Similar findings were reported in the case of chitosan films modified with phenolic acids. While no new bands emerged, noticeable variations in intensity indicated that intermolecular interactions were affecting the organization of the polymer. [63].

3.3.4 Mechanical properties

Tensile tests (Figures 7A-C), are essential parameters for evaluating their mechanical strength and structural integrity during use, were conducted to assess the dynamic mechanical behavior of the polymeric films. It is important to highlight that the process used to produce the films at different MFM concentrations (0.5%, 1%, and 2.5% w/v) did not result in statistically significant differences in thickness among them ($p \geq 0.05$), as discussed in the following section.

In the tensile tests (Figure 7A), which evaluates tensile strength, a clear trend of progressive reduction in rupture force was observed as the concentration of MFM extract increased. Initially, it is important to highlight that the values here observed are lower than other chitosan systems described in the literature. For example, Alvarado S, et al. [64], who studied composite films of chitosan containing fish gelatin and microbial transglutaminase, found tensile strength values from 10 to 43 MPa. Mora-Lopez D, et al. [65], studying chitosan-collagen-honey composites, found T_r values from 8.6 to 71 MPa.

Figure 7. Tensile analysis of chitosan films containing the extract of *M. frigidus* (QMFM 0.5-2.5% w/v) and the blank film (QBR). A: Tensile strength B: Elongation at break C: Young's modulus a – significant difference compared to QBR. Statistical analysis performed using ANOVA followed by Bonferroni's test ($p < 0.05$).



In our work, we found T_r values from 0.25 to 0.37 MPa. However, it is important to highlight that the content of glycerol used in our samples were at least ten times greater than that used in other works [65, 66, 67].

The QBR had an average tensile strength of 0.38 MPa. Meanwhile, the QMFM formulations at 0.5%, 1% and 2.5% (w/v) showed decreasing values of 0.36, 0.29 and 0.26 MPa respectively. This indicates that increasing the extract concentration makes the material more fragile. Despite this reduction, there were no statistically significant differences compared to the control or between the samples ($p < 0.05$). Nevertheless, the reduction in tensile strength was associated with increased extract concentrations in the films.

Notwithstanding these reductions, the films retained sufficient structural integrity for topical application, demonstrating resilience to handling and application without delamination.

Similar results were reported for chitosan films incorporating plant-derived extracts, where the addition of bioactive compounds decreased tensile strength due to aggregate formation but maintained sufficient flexibility for biomedical application [18].

Elongation at break is to measure plasticity (ability of a given material to deform plastically before fracturing). As shown in Figure 7B, no clear trend was observed across the curves upon extract addition. Furthermore, no significant differences were detected among the samples.

Young's modulus is a measure of the ability of material to withstand changes in length when under lengthwise tension or compression, being a measurement of the elasticity (or rigidity) of material. Based on Figure 7C, the Young's modulus ranged from 2.62 MPa to 6.14 MPa, showing a clear tendency of increase with the extract concentration. In literature data are reported Y from magnitude of MPa to GPa [65, 68, 69]. In the present study, the tensile strength values were lower than those reported for other chitosan films described in the literature. However, Young Modulus values like the here described are described in the literature [69].

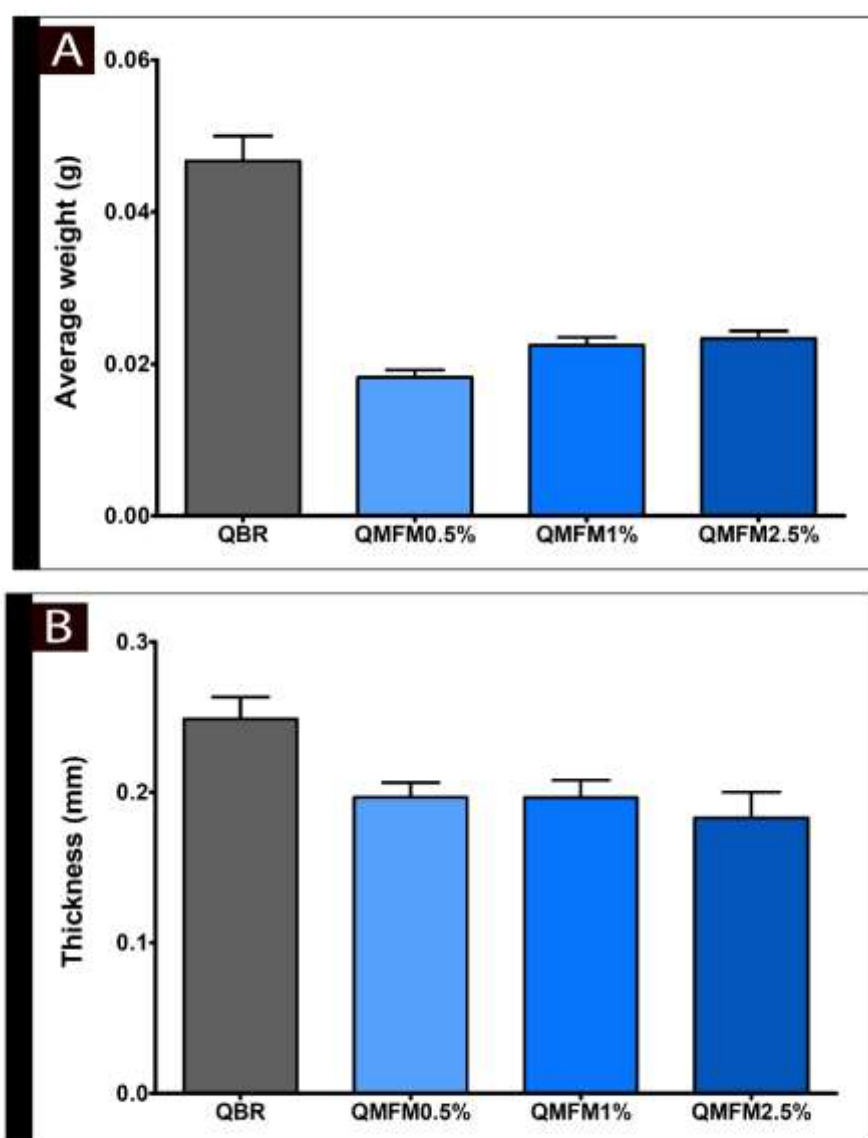
For the QMFM 0.5% and QMFM 1.0% formulations, no significant differences were observed compared with QBR, whereas QMFM 2.5% showed a significant difference, indicating that higher extract concentrations promoted increased film elasticity. The increase in Y until the concentration of 2.5% was attributed to the improvement of rigidity by the formation of specific interactions between extract and chitosan, which were not sufficiently significant for the other concentrations. Such behavior is consistent with the formation of extract-rich aggregates, which were evidenced by SEM micrographs showing heterogeneous domains on the film surface and by the increased D_h values observed in dynamic light scattering in precursor solutions. These aggregates likely disrupt the homogeneity of the chitosan matrix and generate localized stress points, restricting polymer chain mobility [70]. However, these stress points cause a slight weakening of the material, due to the slight decrease in tensile strength as described above.

3.3.5 Weight and Thickness

As shown in Figure 8, all film samples demonstrated moderate to low standard deviation (SD) values for both thickness and weight, reflecting satisfactory uniformity across the formulations. Also is observed that the insertion of the extract in the chitosan base causes a spontaneous and significant ($p < 0.05$) reduction in the thickness, suggesting contraction of polymeric lattice as result of interactions with extract components [71].

The highest SD record was 0.052 mm for thickness and ± 0.01044 mg for weight. According to Rachtanapun, et al. [72], SD values below ± 0.02 mm for thickness and ± 0.01 mg for weight are indicative of well-standardized film formation. In this study, although some formulations such as the QBR film slightly exceeded these thresholds, most samples remained within or close to these values, suggesting a relatively consistent and reproducible casting process.

Figura 8. Weight (A) and thickness (B) of chitosan films containing extract of *M. frigidus* (QMFM 0.5-2.5% w/v) and the blank film (QBR). a – significant difference compared to QBR; b – significant difference compared to QMFM 0.5%; c – significant difference compared to QMFM 1%; d – significant difference compared to Q 2.5%. Statistical analysis performed using ANOVA followed by Bonferroni's test ($p < 0.05$).

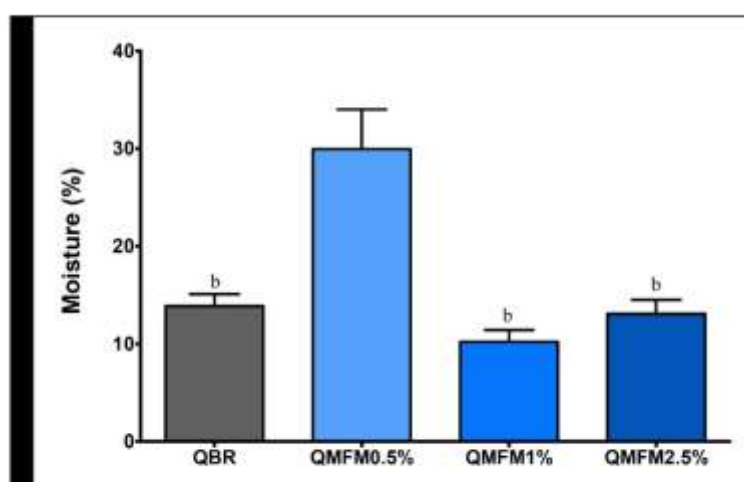


Extract addition also caused a significant reduction in weigh average as observed in Figure 8B. The average weights ranged from 0.01825 ± 0.00311 mg (QMFM 0.5% (w/v)) to 0.0467 ± 0.01044 mg (QBR). Although no significant differences were observed among the MFM-containing formulations, all of them exhibited significantly lower weights ($p < 0.05$) compared to QBR. The observed reduction in film weight following extract incorporation also may be attributed to chemical interactions, such as hydrogen bonds and electrostatic interactions, that limited mass retention during film formation [73].

3.3.6 Moisture content

Maintaining appropriate moisture retention and transport is crucial for the films to prevent desiccation while promoting migration [74]. As shown in Figure 9, the moisture content of the films ranged from 10% to 30%, with the QMFM 0.5% (w/v) formulation exhibiting a significantly higher value, reaching 30%. This indicates that the incorporation of low concentrations of MFM enhances the hygroscopic properties of chitosan. However, further increases in MFM concentration did not lead to significant changes in moisture content, suggesting a saturation point beyond which no additional moisture retention benefit is achieved.

Figure 9. Moisture content of chitosan films containing the extract of *M. frigidus* (QMFM 0.5-2.5% w/v) and the blank film (QBR). a – significant difference compared to QBR. Statistical analysis performed using ANOVA followed by Bonferroni's test ($p < 0.05$).



These results suggest that the formulation process was effective in preserving adequate moisture levels to maintain the structural integrity of the films; while also highlighting the typical hygroscopic behavior of chitosan. This property is associated with the biopolymer's ability to form hydrogen bonds with water molecules, absorbing ambient moisture. However, the variation observed in moisture content, particularly the significant increase detected in the QMFM 0.5% (w/v) formulation, indicates that the incorporation of the MFM extract interfered with the physicochemical properties of the polymer matrix [75].

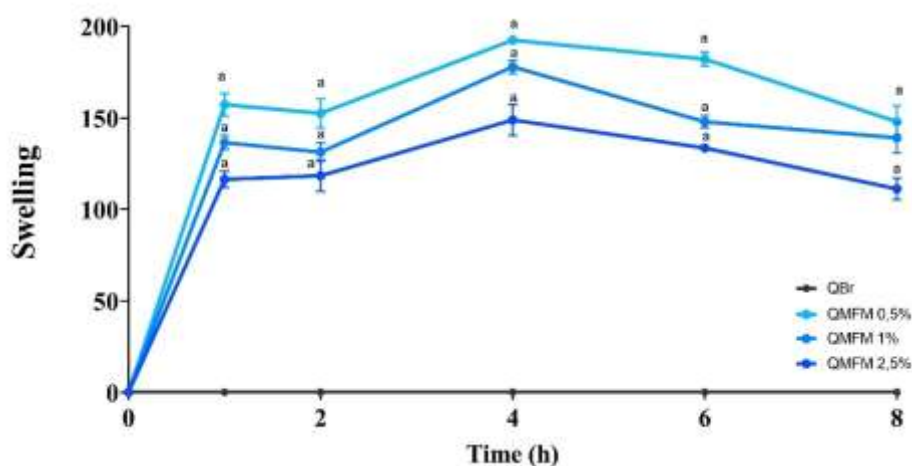
In this regard, the rheological assays of precursor solutions demonstrated a reduction in viscosity for the 0.5% extract formulation, suggesting decreased cohesion between polymer chains. This lower viscosity may reflect a reduced density of intermolecular interactions, resulting in a less compact matrix and, therefore, greater susceptibility to water molecule penetration. Furthermore, the lower compaction of the polymer network likely increases the

exposure of hydrophilic functional groups, such as amines and hydroxyls, enhancing the film's hygroscopicity [9,49,71]. Therefore, the moisture content results suggest that the QMFM 0.5% (w/v) formulation formed a less cohesive and more hydrophilic matrix, resulting in higher hygroscopicity compared to the other formulations.

3.3.7 Swelling ratio

The swelling behavior of the films is presented in Figure 10. Unlike the extract-loaded formulations, QBr did not exhibit measurable swelling throughout the experimental period. Instead, a continuous loss of mass was observed from the first hour of analysis, indicating rapid erosion and disintegration of the polymeric matrix upon contact with the aqueous medium. Consequently, swelling measurements could not be reliably determined for this formulation. This behavior suggests that the QBR lacked sufficient structural stability to maintain its integrity during hydration, a phenomenon commonly associated with polymer matrices exhibiting low intermolecular cohesion and limited resistance to aqueous dissolution [76].

Figura 10. Swelling behavior of chitosan films containing the extract of *M. frigidus* (QMFM 0.5-2.5% w/v) and the blank film (QBR). a – significant difference compared to QBR. Statistical analysis performed using ANOVA followed by Bonferroni's test ($p < 0.05$).



In contrast, all films containing the methanolic extract of *Mitracarpus frigidus* remained intact during the experiment and exhibited a characteristic swelling profile. A rapid fluid uptake

was observed within the first hour, followed by a gradual increase until approximately 4 h, when maximum swelling values were reached. Subsequently, a slight decrease in swelling was observed at longer time points, possibly reflecting matrix relaxation and the onset of erosion processes. Similar swelling kinetics have been reported for chitosan-based films, in which rapid water absorption is followed by structural rearrangement of polymer chains and stabilization of the hydrated network [76].

The swelling capacity was influenced by the concentration of the extract. The QMFM 0.5% formulation presented the highest swelling values among the extract-loaded films, reaching approximately 178% after 4 h, followed by QMFM 1% (~149%) and QMFM 2.5% (~149%). At the end of the experiment (8 h), QMFM 2.5% exhibited the lowest swelling degree, indicating greater resistance to fluid penetration and enhanced structural stability. The progressive reduction in swelling with increasing extract concentration suggests that the phytochemical constituents of the extract modified the internal organization of the polymeric network [77].

The marked difference between QBr and QMFM formulations suggests that the incorporation of the extract contributed to stabilization of the chitosan matrix. Phenolic compounds are known to interact with chitosan through hydrogen bonding between phenolic hydroxyl groups and the amino and hydroxyl groups present in the polymer chains, promoting the formation of a more cohesive and compact structure [77]. These interactions can reduce chain mobility, decrease the availability of free hydrophilic groups, and increase resistance to aqueous disintegration. Similar effects have been described for chitosan films containing tea polyphenols, gallic acid, flavonoids, and plant extracts rich in phenolic compounds [78].

Considering the phytochemical profile previously identified for *M. frigidus*, which is rich in flavonoids and phenolic derivatives such as rutin, quercetin, kaempferol glycosides, and hydroxycinnamic acid derivatives, the stabilization effect observed in QMFM films is likely associated with the ability of these compounds to establish multiple interactions with the chitosan. Similar reductions in swelling have been reported in chitosan films containing quercetin, epigallocatechin gallate, and other flavonoids capable of interacting with polymer chains through hydrogen bonding and hydrophobic interactions [79].

From a pharmaceutical perspective, these findings are particularly relevant for vaginal mucoadhesive systems. Adequate hydration is essential to promote polymer relaxation, mucus interpenetration, and intimate contact with the vaginal epithelium. However, excessive hydration and rapid disintegration may compromise residence time and formulation performance. Therefore, the ability of the extract-loaded films to maintain structural integrity

while exhibiting substantial swelling capacity represents an advantageous balance between hydration and stability, favoring prolonged retention at the application site [80]

Collectively, the results demonstrate that the incorporation of *M. frigidus* extract not only modulates the hydration behavior of chitosan films but also significantly improves their resistance to aqueous disintegration. The observed reduction in swelling, together with the increased structural stability of the extract-loaded formulations, supports the hypothesis that phenolic constituents act as natural stabilizing agents within the chitosan matrix, producing films with physicochemical characteristics suitable for mucosal drug delivery applications [81]

3.3.8 Release Profile

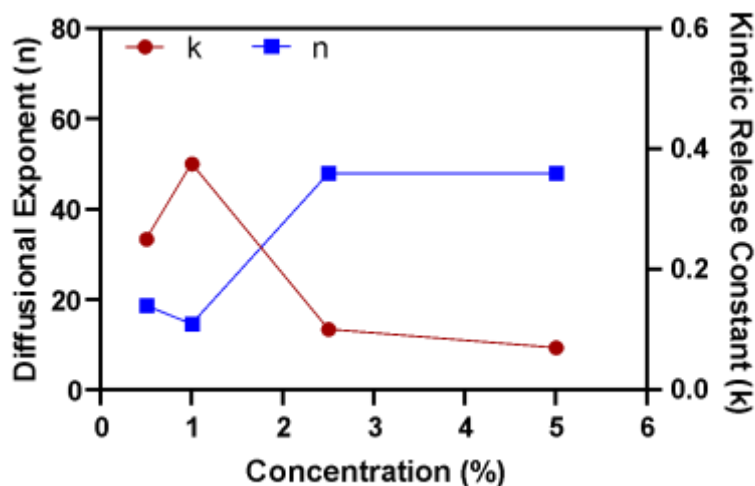
The release assay was performed in PBS buffer at 35 °C to simulate mucosal conditions [82]. Prior to the release studies, a preliminary UV–Vis spectral scanning of the extract was carried out in the 200–400 nm range to determine the wavelength of maximum absorbance intensity (Figure S1 and S2). Based on this analysis, 235 nm was selected for monitoring the release profile, as it corresponded to the most intense and reproducible absorption band of the phytoconstituents present in the extract, particularly phenolic and flavonoid-related compounds, which commonly exhibit absorption in the UV region between 230 and 290 nm. In addition, this wavelength was selected due to the absence of significant interference from the chitosan matrix, allowing more reliable quantification of the released compounds [82, 83].

PBS pH 7.4 was selected to ensure sink conditions and standardized comparative evaluation of the formulations, since the systems were proposed for both oral and vulvovaginal mucosal application. In addition, vaginal pH may increase under pathological conditions such as vaginitis, resulting in a less acidic environment [84].

MFM loaded films exhibited an initial burst release of phytoconstituents within the first 20 minutes, followed by a sustained release over time. All formulations achieved 100% release, although with distinct profiles.

The QMFM 1% (w/v) film reached complete release in approximately 40 minutes. QMFM 2.5% (w/v) peaked at 240 minutes and QMFM 0.5% (w/v) required up to 480 minutes for complete release. After the burst, all films maintained a consistent release throughout the analysis period. QBR showed no significant release, confirming that the released compounds in the test films originated from the extract (Figure 11).

Figure 11. Interrelationship between formulation concentration and Kinetic parameters obtained from the fitting of the Korsmeyer-Peppas model for MFM-loaded hydrogel films.



To elucidate the mechanisms underlying MFM release kinetics from hydrogels, several mathematical models were fitted to the experimental data. Based on their underlying assumptions, along with the goodness-of-fit (high R^2 Adj., and low RMSE and AIC values), the occurrence of specific transport phenomena within the system can be inferred.

Diffusion is anticipated to be a primary driving mechanism for MFM kinetic release, since hydrogels are matrix-based reservoirs prepared across a range of concentrations (i.e., from 0.5% to 5% of MFM). However, evaluation of the Higuchi model fit, which is rooted in Fick's law and assumes a rigid, non-swelling matrix [85], revealed a poor fit to the data (Table 4 and Figure S3), suggesting that mechanisms other than pure diffusion govern MFM release.

Table 4. Statistical goodness-of-fit indicators for the different mathematical models applied to MFM release kinetics

Model	MFM 0.5%			MFM 1%			MFM 2.5%		
	R^2 Adj.	RMSE	AIC	R^2 Adj.	RMSE	AIC	R^2 Adj.	RMSE	AIC
Gallagher-Corrigan	0.91	5.05	48.88	0.99	1.60	21.39	0.99	1.88	25.18
Korsmeyer-Peppas with F0	0.91	5.99	48.97	0.97	3.82	38.16	0.99	2.91	31.60
Korsmeyer-Peppas	0.82	8.77	56.12	0.91	7.46	52.22	0.98	4.62	40.75

Peppas-Sahlin	0.79	8.75	58.07	0.92	6.70	51.67	0.98	4.50	42.08
Gompertz	0.78	9.14	59.10	0.96	4.72	43.23	0.92	9.21	59.28
Logistic	0.78	9.26	59.41	0.95	5.34	46.23	0.91	10.07	61.44
First-order	0.71	11.09	61.74	0.90	7.82	53.35	0.87	12.55	64.71
with Fmax									
Zero-order with	0.47	15.07	69.11	0.31	20.66	76.68	0.83	14.16	67.61
F0									
Higuchi	-0.57	27.07	81.16	-0.75	34.43	86.93	0.86	13.47	64.41

Note: R^2 Adj, adjusted coefficient of determination; RMSE, root-mean-square error; AIC, Akaike information criterion

The Korsmeyer-Peppas model [86] is a well-established framework for modeling and releasing kinetics from hydrogels. This model incorporates the diffusional exponent (n), which depends on both the release mechanism and the geometry of the system. For films, which exhibit a planar geometry, the literature establishes specific reference values for [5]: $n = 0.5$: Pure Fickian diffusion (concentration gradient-controlled transport) $0.5 < n < 1.0$: Anomalous transport (coupled diffusion-relaxation mechanism) $n = 1.0$: Case II transport (polymer chain erosion/relaxation).

In practical terms, Fickian diffusion occurs when water penetration into the hydrogels proceeds at a slower rate than polymer chain relaxation, making $n = 0.5$ the hallmark of an ideal Fickian system [87]. Conversely, if the polymer chains rearrange and adjust (relaxation) faster than the solvent can advance through the hydrogel matrix, the observed values may fall below 0.5. This specific case, a variant of Fickian diffusion, is designated as "Less Fickian" behavior [87, 88].

As presented in Table 5, the observed values are substantially below 0.5, revealing a release behavior characteristic of the "Less Fickian" phenomenon.

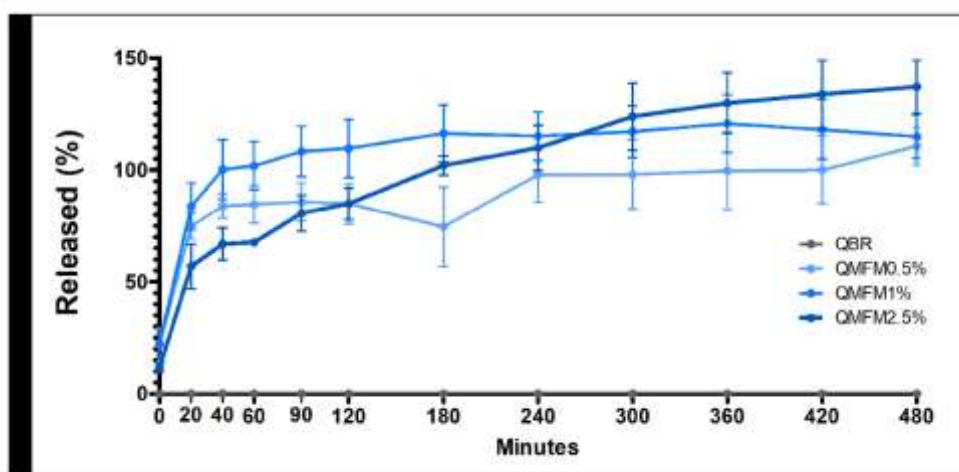
Table 5. Kinetic parameters obtained from the fitting of the Korsmeyer-Peppas model and its variant to MFM release data.

Concentration	kKP	n	F0
0.5%	33,4	0,14	22,26
1.0%	50,1	0,11	22,15
2.5%	13,5	0,36	12,39

In fact, correlation analysis among concentration, the diffusional exponent, and the release rate constant (Figure 12) reveals that at low concentrations (0.5% and 1.0%), the

hydrogels exhibit a rapid release rate (high k values) alongside low n values. This suggests a fast initial release, yet with strong retention within the polymeric network, i.e., the MFM located predominantly on the surface or in easily accessible regions is rapidly released, whereas the remaining fraction interacts strongly with the matrix polymer chains. These findings are consistent with the semicrystalline structure of chitosan, which acts as a diffusion barrier, limiting the mobility of encapsulated molecules and thus slowing their release [89].

Figura 12. Percentage of extract released from chitosan films containing the extract of *M. frigidus* (QMFM 0.5-2.5% w/v) and the blank film (QBR).



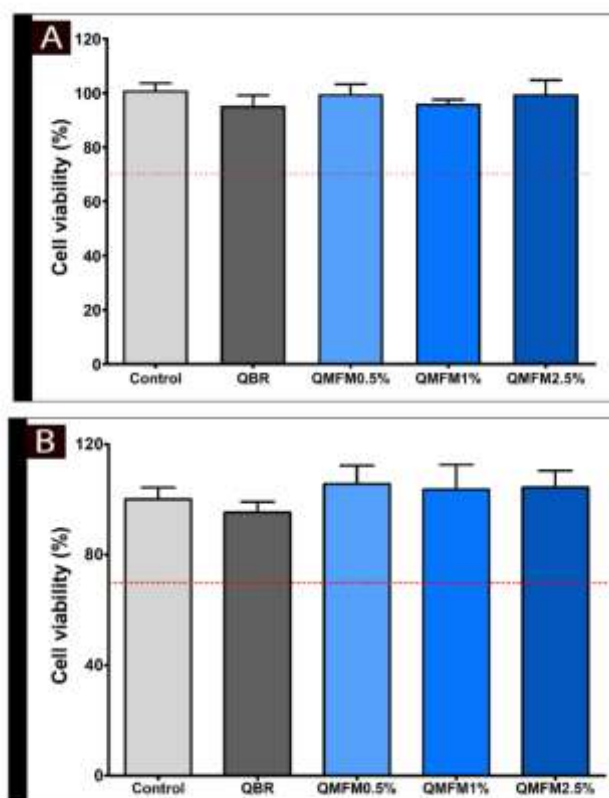
This conclusion is further corroborated by comparing the Korsmeyer-Peppas models with and without the burst release parameter. As presented in Table 4, incorporating enhanced the descriptive capacity of the model, particularly for the 0.5% and 5.0% MFM formulations, where the R^2 Adj. increased from 0.82 to 0.91 and from 0.59 to 0.91, respectively. Conversely, at high concentrations (2.5% and 5.0%), a sharp decrease in values was observed alongside an increase in values. This suggests that at elevated concentrations, the active ingredient may alter the polymer matrix structure, for instance, through the formation of aggregates or shift its interaction mechanism with the polymer network. In line with this latter hypothesis, Rossi et al. demonstrated that when preparing Carbomer 974P and agarose hydrogels containing ethosuximide, increasing the drug concentration within the system alters the release mechanism; adsorption prevails at low concentrations, and only after all adsorption sites are saturated does diffusion within the hydrogels resemble that of an aqueous solution [90].

Taken together, these results confirm that extract concentration plays a pivotal role in modulating both the internal organization of the film and the dynamics of compound release. In fact, achieving an optimal balance between matrix cohesion and extract loading is essential to ensure sustained and effective bioavailability of active compounds in topical biomedical applications.

3.4 Cell viability

Assessing cell viability *in vitro* plays a fundamental role in understanding the pathways involved in cell survival after exposure to potentially cytotoxic substances or extracts. Cytotoxicity assays are commonly used in the screening of drug and herbal medicine candidates to assess their effects on cell viability and proliferation. These preliminary tests serve as a screening tool for safe doses for subsequent *in vivo* preclinical studies [91]. In this study, Cell viability testing was performed on J774.A1 murine macrophages and L929 fibroblasts (ATCC® CCL-1 NCTC) using the MTT assay,

Figure 13: Viability of J774.A1 peritoneal macrophages (A) and L929 fibroblasts (B) after treatment with chitosan films containing the extract of *M. frigidus* aerial parts (QMFM 0.5–2.5% w/v) and the blank film (QBR). ANOVA followed by the Bonferroni test ($p < 0.05$).



According to ISO 10993-5 [92], a minimum cell viability of 70% is considered acceptable for *in vitro* cytotoxicity assessments. As shown in Figure 13, all film formulations-maintained cell viability above this threshold in J774.A1 murine macrophages across all tested concentrations. These findings indicate that QMFM formulations containing 0.5%, 1%, and 2.5% (w/v) MFM are biocompatible and safe for further investigation. The results align with the known biocompatibility and low cytotoxicity of chitosan, a polymer widely employed in medical devices for wound healing and infection control [93,94]. Additionally, prior studies conducted by our research group confirmed the low *in vitro* cytotoxicity of MFM, an extract rich in triterpenoids, flavonoids, and phenolic acids, which did not significantly affect the viability of RAW 264.7 cells [9].

3.5 Anti-inflammatory activity

Given the rheological and physicochemical instability observed in the QMFM 0.5% (w/v) formulation, subsequent biological assays were conducted exclusively with QBR, QMFM 1%, and QMFM 2.5% (w/v).

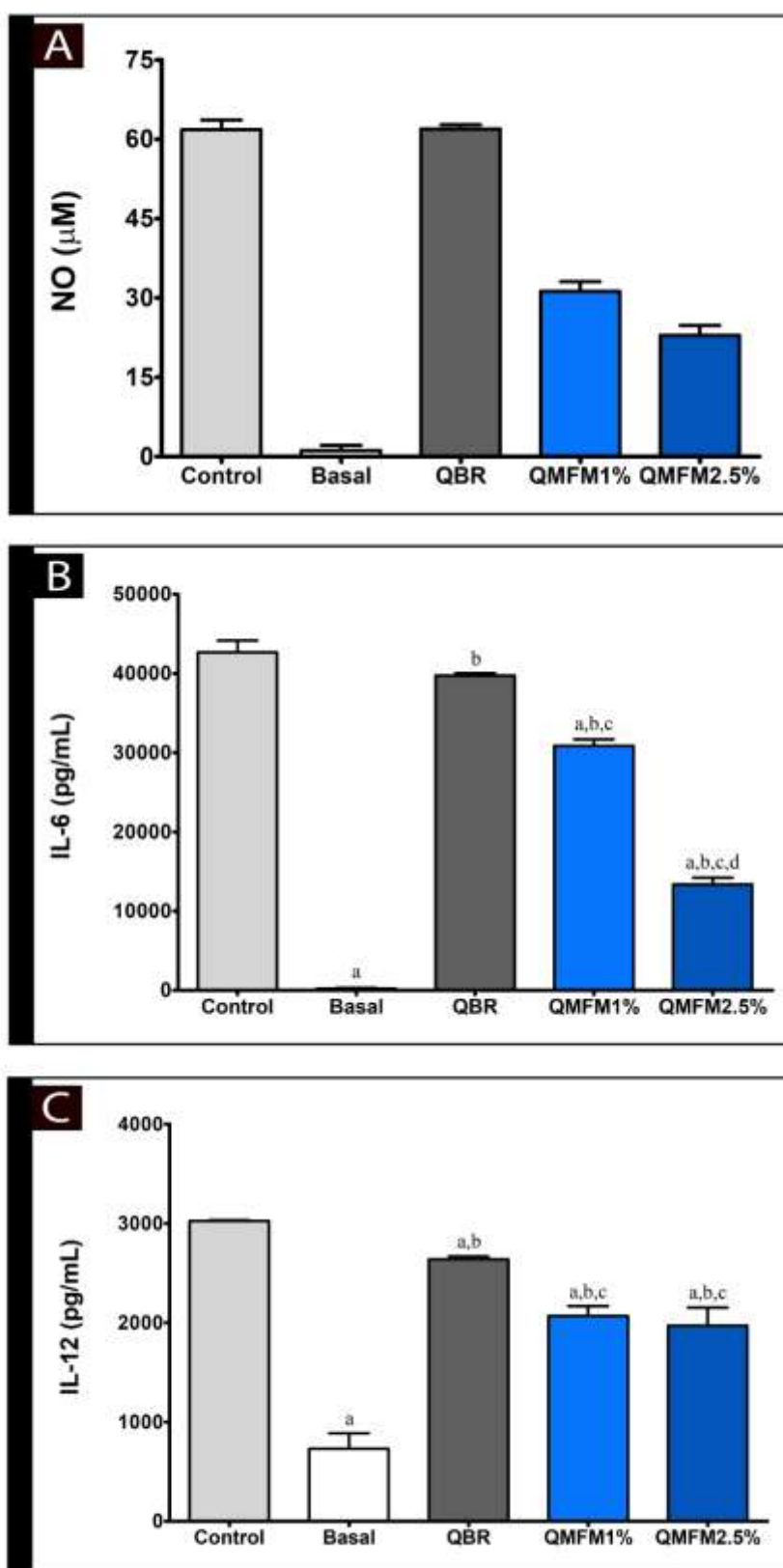
The production of free radicals, particularly nitric oxide (NO), is closely associated with the inflammatory and oxidative stress response. These reactive species are generated by

immune cells and play a key role in the initiation and progression of inflammation. NO acts as a pro-inflammatory mediator by inducing the expression of cyclooxygenase enzymes (COX-1 and COX-2), which subsequently increases prostaglandin synthesis and amplifies the inflammatory process [95,96].

The *in vitro* anti-inflammatory activity of the formulations was assessed through the indirect quantification of NO in the supernatant of J774A.1 macrophage cultures treated with MFM-containing films at concentrations of 1% and 2.5% (w/v). Both formulations significantly reduced ($p < 0.05$) NO production compared to the control (Figure 14A). Furthermore, the reduction observed for the MFM films was significantly greater ($p < 0.05$) than that of QBR, indicating that the anti-inflammatory effect is attributable to bioactive compounds present in MFM.

The levels of pro-inflammatory interleukins IL-6 and IL-12—key mediators involved in leukocyte chemotaxis and immune activation were also evaluated by ELISA in cultures of peritoneal macrophages treated with the MFM films. The QMFM 2.5% (w/v) formulation induced a more pronounced decrease in IL-6 levels compared to QMFM 1% (w/v), with statistically significant differences ($p < 0.05$) (Figure 14B). In contrast, both formulations exhibited similar inhibitory effects on IL-12 levels, with no significant difference between them (Figure 14C). For both cytokines, the values obtained from the MFM films were significantly lower than those of the control ($p < 0.05$), further supporting their anti-inflammatory potential.

Figure 14. Anti-inflammatory activity of the chitosan films containing the extract of *M. frigidus* (QMFM 1 and 2.5% w/v) and the blank film (QBR). A: NO levels (μM). B: IL-6 production (pg/mL). C: IL-12 production (pg/mL). a – significant difference compared to control; b – significant difference compared to basal; c – significant difference compared to QBR. Statistical analysis performed using ANOVA followed by Bonferroni's test ($p < 0.05$).



These findings demonstrate that the films can downregulate key inflammatory mediators, confirming their anti-inflammatory activity. This is consistent with previous reports highlighting the anti-inflammatory potential of MFM [91]. Such activity is closely associated

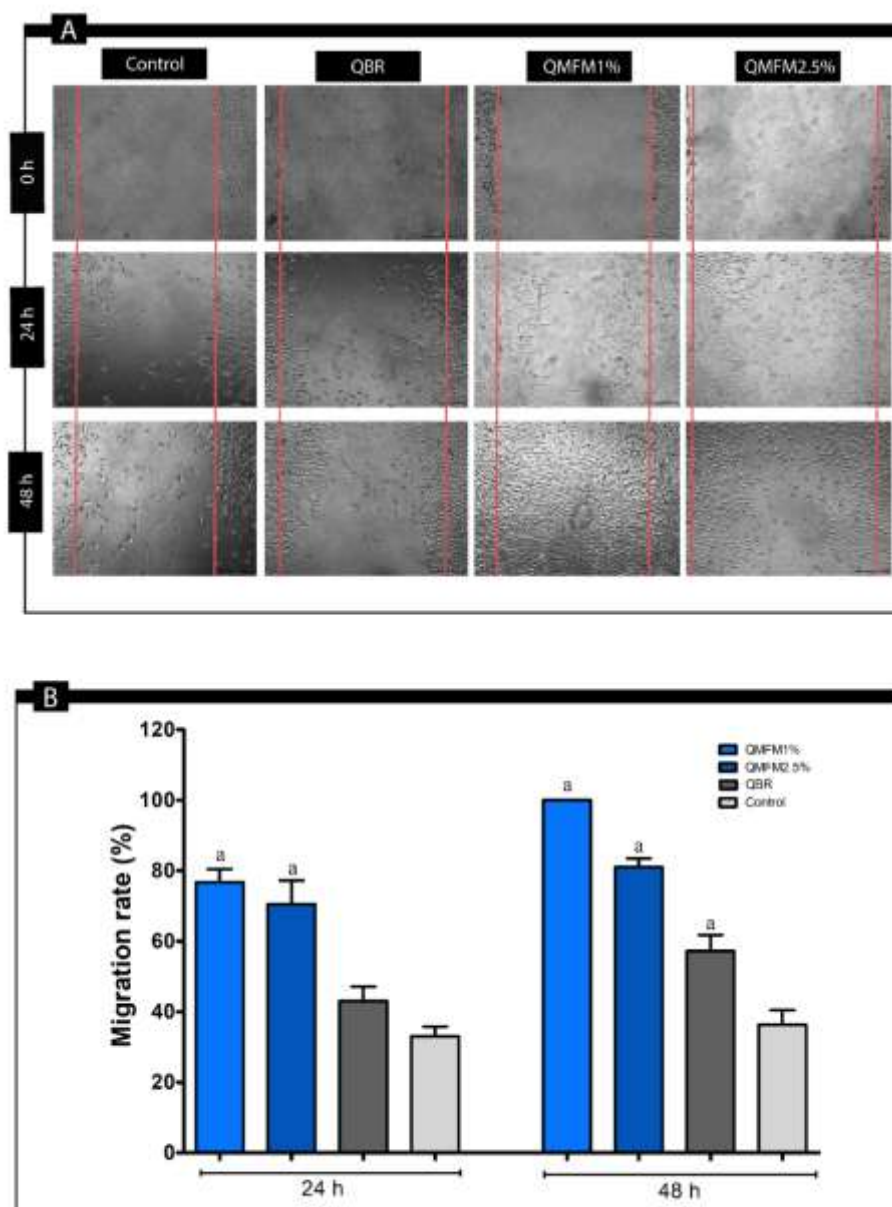
with the presence of flavonoids, triterpenes, and phenolic compounds, also known to contribute to the antioxidant properties [97].

3.6 Scratch Assay

Wound healing in the context of mucosal fungal infections is essential to minimize complications and promote tissue recovery. Fibroblasts play a pivotal role in this process by modulating immune responses and contributing to tissue repair. Upon infection, these cells migrate to the lesion site and secrete growth factors and matrix metalloproteinases that recruit and activate immune cells. In addition, fibroblasts are responsible for synthesizing key extracellular matrix components, such as collagen, fibrin, and fibronectin, that are critical for wound closure [98]. Thus, formulations capable of enhancing fibroblast migration and proliferation may significantly support wound repair in infections caused by *C. albicans*.

QMFM 1% and QMFM 2.5% (w/v) films significantly enhanced fibroblast migration, with migration rates of $76.74 \pm 3.65\%$ and $70.52 \pm 6.73\%$, respectively, within the first 24 hours (Figure 15A). After 48 hours, QMFM 1% (w/v) achieved complete wound closure (100%), followed by QMFM 2.5% ($80.95 \pm 2.51\%$) and the control QBR film ($57.17 \pm 4.60\%$). These results indicate that both formulations promote *in vitro* fibroblast migration more effectively than the control ($p < 0.05$).

Figure 15: Effect of chitosan films containing the extract of *M. frigidus* aerial parts (QMFM 1% and 2.5% w/v) and the blank film (QBR) on cell migration. FA: L929 fibroblasts treated with QMFM 1 and 2.5% w/v, QBR, and control at 0, 24, and 48 hours (scale bar: 200 μm). B: Migration rate of L929 fibroblasts at 24 and 48 hours after scratching. a - Statistical difference from control. ANOVA followed by the Bonferroni test ($p < 0.05$).



To the best of our knowledge, this is the first study to report the effect of *M. frigidus* on cell migration. The observed effects suggest a synergistic interaction between MFM phytochemicals and chitosan in stimulating fibroblast migration. Compounds such as ursolic acid, kaempferol, and rutin, identified in MFM, are known to enhance wound healing by promoting epithelialization, fibroblast proliferation, angiogenesis, collagen synthesis, and by modulating inflammation [99,100]. Chitosan, in turn, has well-documented wound healing properties, including stimulation of fibroblast activity, regulation of collagen deposition, enhancement of hyaluronic acid synthesis, and promotion of angiogenesis [101].

It is important to note that although the QMFM 1% (w/v) film had a lower extract concentration, it stimulated cell migration more effectively than the QMFM 2.5% (w/v) film

after 48 hours ($p < 0.05$). This effect may be related to the higher stress and cellular toxicity caused by films containing higher concentrations of MFM. Similar results were observed in a study by Valencia-Gómez, et al. [102], where the *Allium cepa* extract at 15 mg/mL stimulated the *in vitro* migration of fibroblasts more efficiently than the extract at 50 and 75 mg/mL. In a study by Brás, et al. [103], Chitosan films with *Cynara cardunculus* extract at 1% (w/v) showed the same trend.

3.7 Antifungal Activity

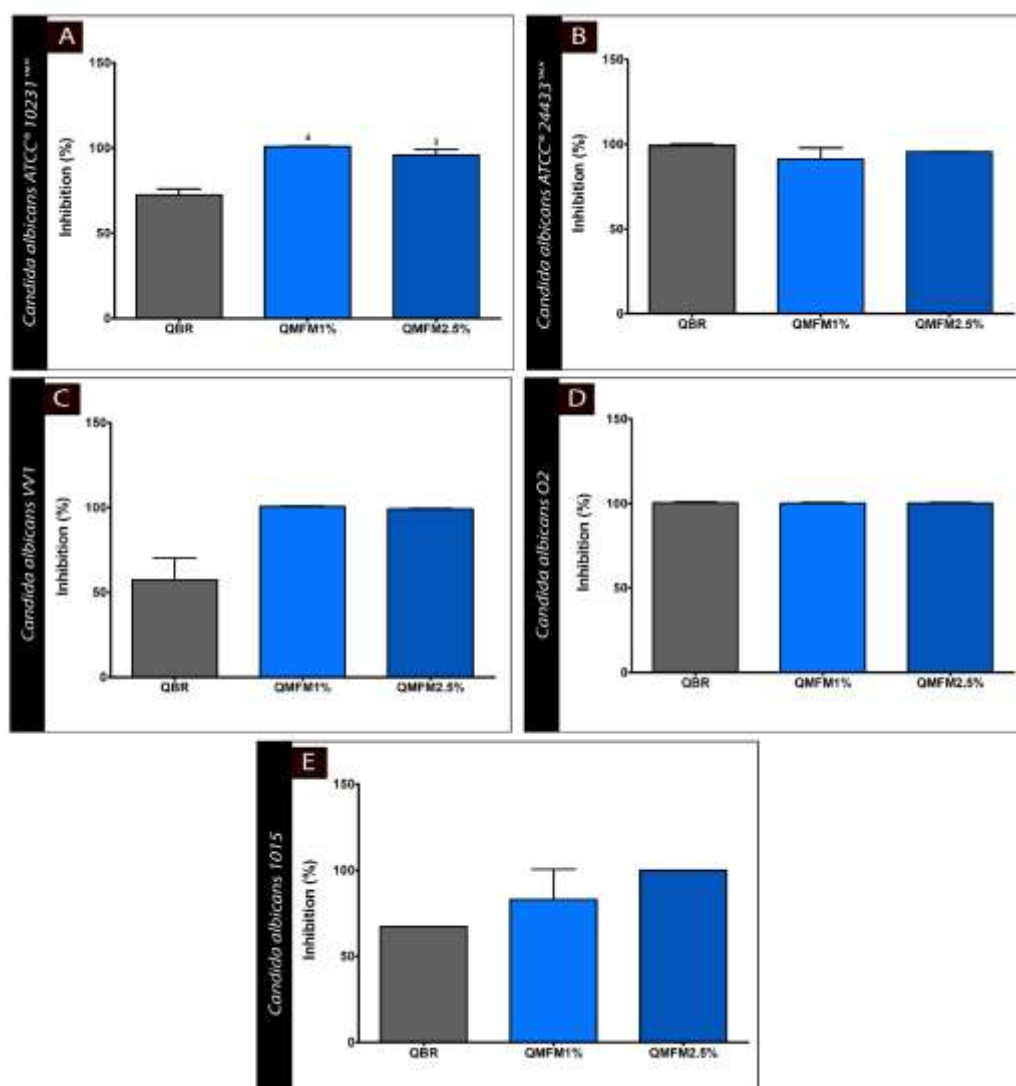
The antifungal activity of the polymeric films was evaluated against five preselected *C. albicans* strains: *C. albicans* ATCC® 24433™, *C. albicans* vv 1, *C. albicans* O2, *C. albicans* ATCC® 10231™, and *C. albicans* 1015. Three complementary methods were employed for this assessment: percent growth inhibition, time-kill kinetics, and biofilm formation assay. Previously reported MIC for the free extract was conducted to allow comparison with the developed film systems (Table S1).

3.7.1 Percent inhibition

The percentage inhibition method was employed to assess the ability of the formulations to suppress fungal cell proliferation. Films containing MFM (QMFM 1% and QMFM 2.5% w/v) inhibited approximately 90-100% of the growth of all tested *C. albicans* strains, with no significant difference between these two concentrations ($p < 0.05$). In contrast, the QBR showed variable inhibition rates, ranging from 70% to 100%, depending on the strain. Clearly, QBR exhibited significantly lower activity than the MFM-containing films against *C. albicans* ATCC® 10231™ ($p < 0.05$) (Figure 16).

Figure 16. Percent inhibition of chitosan polymeric films containing the extract of *M. frigidus* (QMFM 1% and 2.5% w/v) and the blank film (QBR) Against *Candida albicans* strains. A: Resistant *C. albicans* (ATCC® 10231™); B: Sensitive *C. albicans* (ATCC®

24433™); C: *C. albicans* VV1; D: *C. albicans* O2; E: *C. albicans* 1015. a – significant difference compared to QBR. Statistical analysis performed using ANOVA followed by Bonferroni's test ($p < 0.05$).



Our results are consistent with previous studies reporting that MFM exerts antifungal effects against *C. albicans* by causing structural damage to the fungal cell envelope and producing a fungistatic effect [104]. These mechanisms likely act synergistically with chitosan in the QMFM formulations, contributing to the high inhibition rates observed in this assay. The antifungal activity of MFM is likely associated with its complex phytochemical composition, particularly the presence of polyphenols, flavonoids such as rutin, quercetin, and kaempferol, phenolic acids including chlorogenic acid, as well as pentacyclic triterpenoids [10, 31,32]. The antimicrobial potential of these compounds has been extensively reported in the literature, especially through mechanisms involving disruption of membrane integrity, increased cellular permeability, oxidative stress induction, and interference with fungal metabolic pathways [28,35,36].

3.7.2 Time-kill kinetic assay

The time-kill curve analysis revealed distinct responses among *C. albicans* strains when treated with QBR and MFM-loaded films (QMFM 1% and 2.5% w/v). Overall, all tested strains exhibited growth after 24 hours, indicating cell viability and adaptation to the culture conditions.

In the reference strain *C. albicans* ATCC® 10231, MFM-containing films consistently inhibited fungal growth from 24 hours onward. The QMFM 2.5% (w/v) film maintained this inhibitory effect throughout the experimental period, while the QMFM 1% (w/v) film showed a slight resurgence in growth after 48 hours (Figure 17A1). These findings suggest a concentration-dependent antifungal effect of the incorporated plant extract.

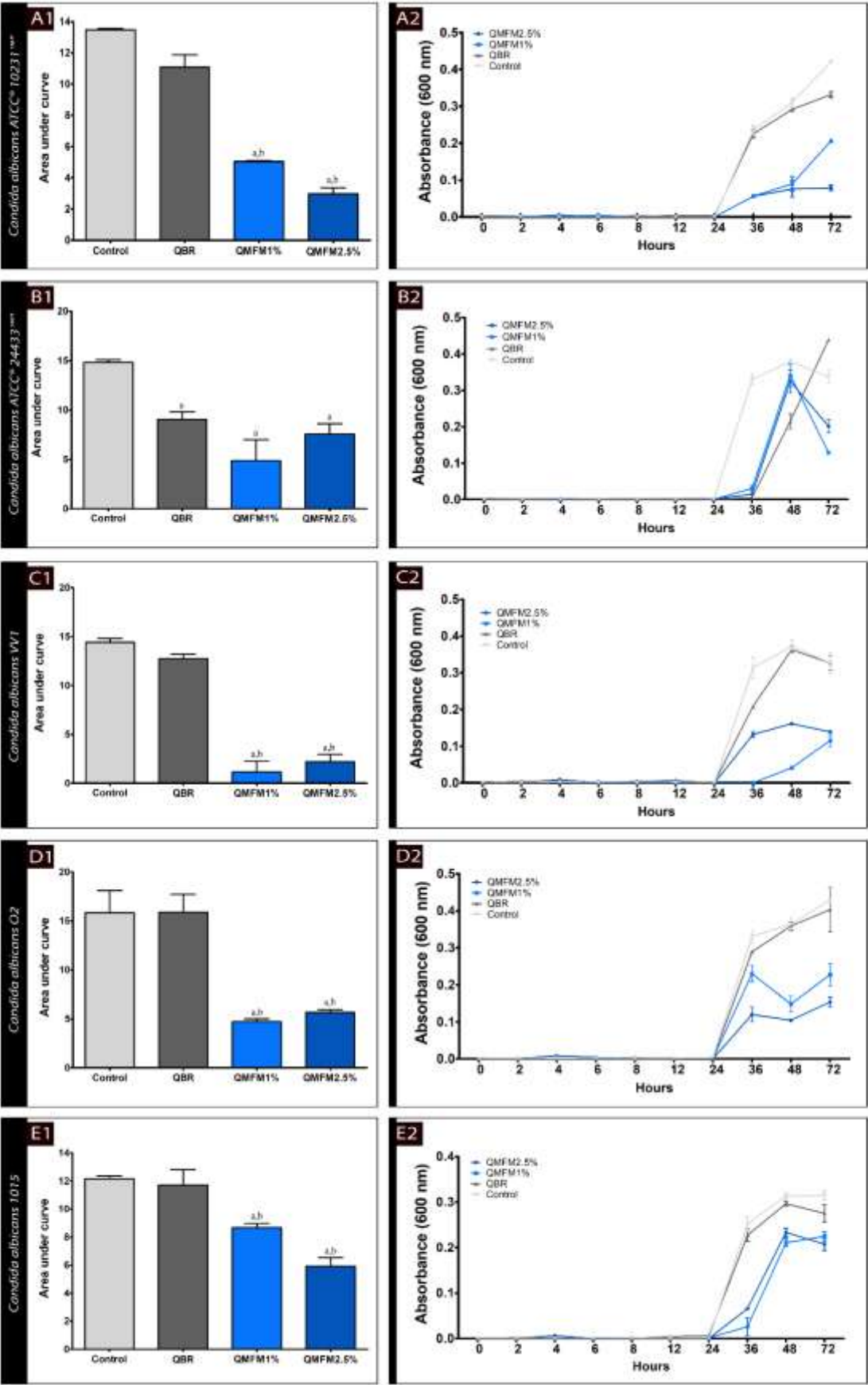
For the ATCC® 24433 strain, both QMFM 1% and 2.5% (w/v) treatments effectively suppressed fungal growth up to 36 hours, indicating a possible lag phase of cell death, during which cells remain metabolically active but unable to replicate. However, between 36 and 48 hours, fungal growth resumed and resembled positive control, suggesting partial or transient adaptation to the antifungal stress. Notably, after 48 hours, a pronounced decline in cell viability was observed, consistent with the onset of a logarithmic death phase, indicating a delayed yet sustained antifungal effect (Figure 17B1).

In the clinical isolate from oropharyngeal candidiasis (*C. albicans* O2), both QMFM 1% and 2.5% (w/v) led to a modest reduction in growth starting at 36 hours, indicating a delayed but still significant antifungal activity (Figure 17D1). In contrast, the VVC isolate (*C. albicans* VV1) responded more sensitively to QMFM treatments, exhibiting a marked reduction in fungal growth, especially after 36 hours (Figure 17C1).

The clinical isolate *C. albicans* 1015 showed the most pronounced sensitivity, with growth inhibition evident as early as 24 hours for both concentrations tested, indicating a rapid and potent antifungal response (Figure 17E1).

These findings were further supported by the area under the curve (AUC) analysis, which revealed a statistically significant reduction ($p < 0.05$) in fungal growth for QMFM 1% and 2.5% (w/v) compared to the untreated control across all strains evaluated. Except for *C. albicans* ATCC® 24433, treatment with QBR did not result in significant changes in the growth curves ($p > 0.05$), maintaining a continuous growth profile similar to the control. This reinforces the notion that chitosan alone possesses limited antifungal activity and that the incorporation of the plant-derived extract is essential for enhancing the therapeutic efficacy of the films.

Figure 17. Growth kinetics of chitosan polymeric films containing the extract of *M. frigidus* (QMFM 1% and 2.5% w/v) and the blank film (QBR) against *Candida albicans* strains. A1/A2: Resistant *C. albicans* (ATCC® 10231™); B1/B2: Sensitive *C. albicans* (ATCC® 24433™); C1/C2: *C. albicans* VV1; D1/D2: *C. albicans* O2; E1/E2: *C. albicans* 1015. a – significant difference compared to control; b – significant difference compared to QBR. Statistical analysis performed using ANOVA followed by Bonferroni's test ($p < 0.05$).



The observed death curve, characterized by an initial lag phase followed by a logarithmic decline in cell viability, aligns with the kinetic profile previously described by Campos, et al. [104] in the treatment of *Candida tropicalis* with MFM. Furthermore, these findings suggest a synergistic interaction between the polymeric films and MFM, which enhances the antifungal activity of chitosan. The enhanced antifungal effect results from the complementary mechanisms of action, in which chitosan compromises the integrity of the fungal cell membrane, thereby promoting the uptake and efficacy of co-administered antifungal agents. This combination strategy has demonstrated effectiveness against a broad range of fungal pathogens, including those implicated in candidiasis [105,106].

This result correlates closely with the release profiles of MFM from the chitosan films. The QMFM 2.5% (w/v) formulation exhibited an initial burst release of bioactive compounds, which coincided with rapid early inhibition of *C. albicans* growth, while the QMFM 1% (w/v) film displayed a slower, sustained release, resulting in a delayed but prolonged antifungal effect. This relationship indicates that the kinetic profile of extract release directly influences cell viability, with higher initial availability driving early growth suppression and sustained release maintaining inhibition over time. Thus, the antifungal efficacy of the films is both concentration- and release-dependent, emphasizing the critical role of release kinetics in modulating the therapeutic performance of chitosan-based delivery systems.

3.7.3 Biofilm inhibition assay

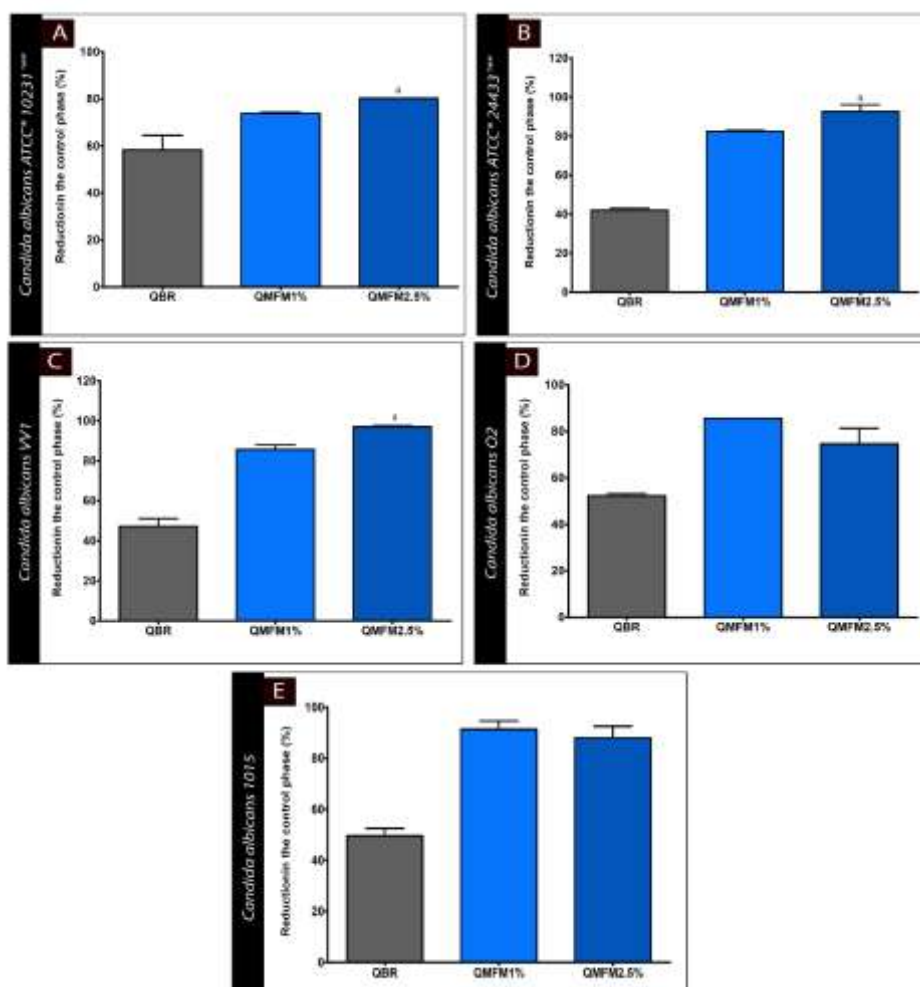
The ability of *C. albicans* to form biofilms plays a central role in its virulence, enhancing its adherence to host surfaces and markedly increasing resistance to antifungal agents [89]. As a result, identifying new therapeutic strategies that can effectively disrupt or prevent biofilm development is crucial to advancing treatment outcomes for candidiasis.

The inhibitory effect of QBR and MFM-incorporated films (QMFM 1% and 2.5% w/v) on the adhesion phase of *C. albicans* biofilms was evaluated for different strains. For ATCC 10231, QBR achieved approximately 50% inhibition, while QMFM 1% and 2.5% (w/v) showed about 80% and 90% inhibition, respectively, with a significant difference for QMFM 2.5% (w/v) compared to QBR ($p < 0.05$) (Figure 18A). In ATCC 24433, QBR inhibited around 55%, QMFM 1% (w/v) about 85%, and QMFM 2.5% (w/v) nearly 100%, with a statistically significant improvement observed for QMFM 2.5% (w/v) ($p < 0.05$) (Figure 18B). The clinical isolate VV1 exhibited approximately 45% inhibition with QBR, increasing to about 80% with QMFM 1% (w/v) and 95% with QMFM 2.5% (w/v), with a significant difference for the latter

($p < 0.05$) (Figure 18C). For isolates *C. albicans* (O2 and 1015), although inhibition rates improved with QMFM treatments (approximately 70–95%), no significant differences were found compared to QBR (Figures 18D e 18E) ($p < 0.05$).

The results indicate that incorporation of MFM extract, particularly at 2.5%, enhances the antifungal efficacy of chitosan films in inhibiting *C. albicans* biofilm adhesion, with more pronounced effects depending on the strain tested.

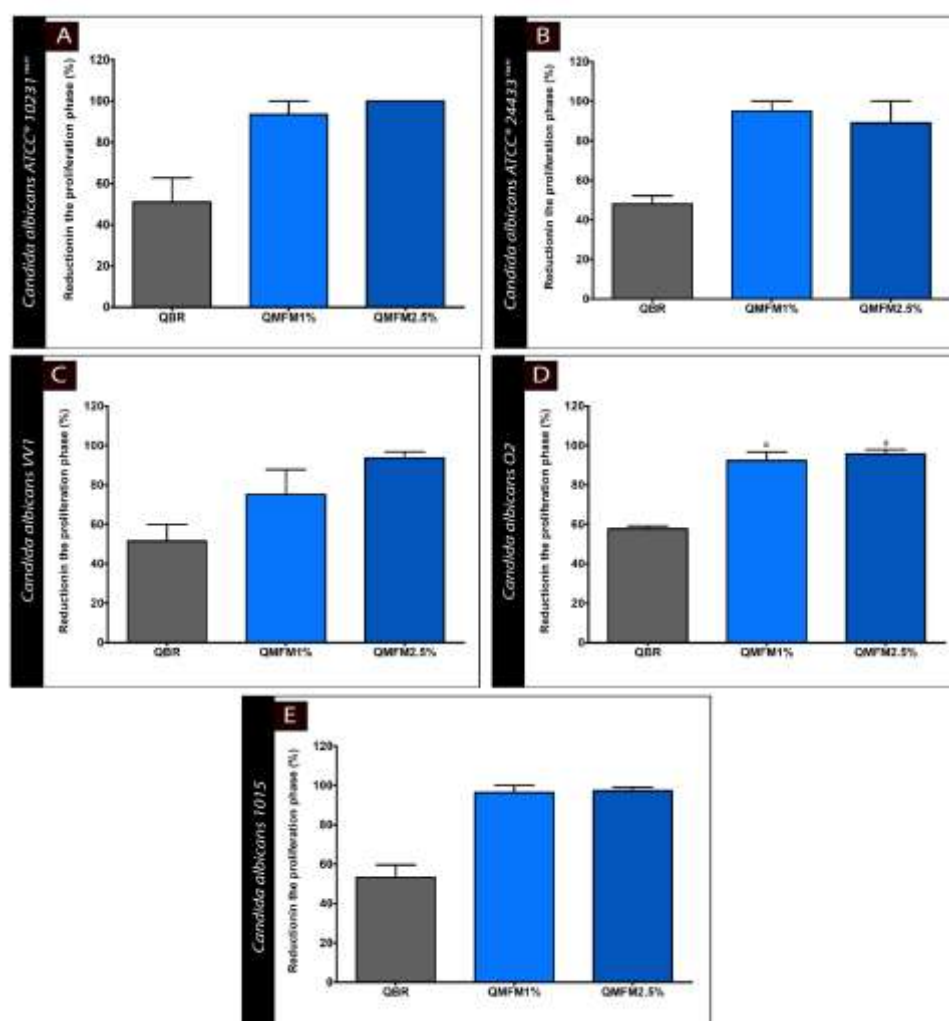
Figure 18. Biofilm inhibition on adhesion phase by chitosan polymeric films containing the extract of *M. frigidus* (QMFM 1% and 2.5% w/v) and the blank film (QBR) Against *Candida albicans* strains. A: Resistant *C. albicans* (ATCC® 10231™); B: Sensitive *C. albicans* (ATCC® 24433™); C: *C. albicans* VV1; D: *C. albicans* O2; E: *C. albicans* 1015. a – significant difference compared to QBR. Statistical analysis performed using ANOVA followed by Bonferroni's test ($p < 0.05$).



The efficacy of QBR and MFM-incorporated films (QMFM 1% and 2.5% w/v) was evaluated against biofilm formation by *C. albicans* during the proliferation phase (Figure 19). For the ATCC 10231 strain (Figure 19A), QBR inhibited approximately 50% biofilm formation, while QMFM 1% and 2.5% (w/v) achieved about 85% and 90% inhibition, respectively, with no statistically significant differences between the treated groups. In the ATCC 24433 strain (Figure 19B), inhibition rates were around 55% for QBR, 90% for QMFM 1% (w/v), and 95% for QMFM 2.5% (w/v), but no significant difference was observed between treatments. The clinical isolate VV1 (Figure 19C) exhibited inhibition rates of approximately 45% for QBR, 70% for QMFM 1% (w/v), and 85% for QMFM 2.5% (w/v), also without statistical differences between treatments ($p \geq 0.05$).

In contrast, for the clinical isolate O2 (Figure 19D), QBR inhibited about 50% of biofilm proliferation, while QMFM 1% and 2.5% (w/v) achieved around 80–85% inhibition, with both treatments showing a statistically significant difference compared to QBR ($p < 0.05$). Regarding the clinical isolate 1015 (Figure 19E), QBR promoted around 55% inhibition, while QMFM 1% and 2.5% (w/v) reached about 90–95% inhibition; however, no statistical differences were detected between the groups. Overall, the incorporation of MFM into chitosan films enhanced the antifungal action during biofilm proliferation, especially for the O2 strain, where a significant improvement was observed.

Figure 19. Biofilm inhibition on proliferation phase by chitosan polymeric films containing the extract of *M. frigidus* (QMFM 1% and 2.5% w/v) and the blank film (QBR) Against *Candida albicans* strains. A: Resistant *C. albicans* (ATCC® 10231™); B: Sensitive *C. albicans* (ATCC® 24433™); C: *C. albicans* VV1; D: *C. albicans* O2; E: *C. albicans* 1015. a – significant difference compared to QBR. Statistical analysis performed using ANOVA followed by Bonferroni's test ($p < 0.05$).



According to Khan, et al. [107] the positively charged amino groups of chitosan interact electrostatically with negatively charged components of the biofilm matrix, including proteins, extracellular DNA, and polysaccharides, thereby compromising biofilm integrity and inhibiting its establishment. In parallel, Campos, et al. [104] reported that MFM significantly reduced both adhesion and the biochemical composition of pre-formed *C. albicans* biofilms, particularly by depleting total carbohydrate and DNA content. In the present study, the combination of chitosan with MFM demonstrated a pronounced synergism, resulting from the simultaneous destabilization of the biofilm's structural framework and biochemical matrix modulation. This dual mechanism of action appears to impede the induction of adaptive resistance pathways in *C. albicans* strains, promoting a more sustained and effective antifungal response during both the early adhesion and the proliferation stages of biofilm development [108].

In general, these findings reinforce the therapeutic potential of chitosan-based delivery systems functionalized with phytochemicals as a promising strategy to counteract biofilm-associated fungal infections and mitigate antifungal resistance.

3.7.4 Therapeutic treatment of VVC

After the infection was confirmed, films loaded with MFM treatment were evaluated in vivo. There was a substantial fungal load throughout the treatment period for both the un-treated animals (only infected) and control groups (Table 6). The fungal load was lowered for the groups treated with films and nystatin, used as a positive control (Table 6). Besides, by the time the trial was over, the fungal load had been significantly reduced by 70% in QMFM 1% ($p < 0.05$). Treatment with QMFM 2.5% and nystatin eliminated the fungal load on the last day of treatment ($p < 0.05$) (Table 6). These findings highlight not only the antifungal potential of formulation but also the relevance of this preclinical model for predicting therapeutic responses.

Tabela 6. Fungal burden in experimental group of animals at day one and three of therapeutic treatment with chitosan-based films loaded with MFM. ^aPercentage reduction in fungal load compared with the first day of treatment. ^bStatistically significant difference compared with day 1 ($p < 0.05$). Nystatin vaginal cream (25,000 IU/g) was used as a positive control. SD = standard deviation. N = 5

Groups	Day 1 (first day of treatment)		Day 3 (after 3 days of treatment)		Reduction ^a (%)
	Log UFC/mL $\pm$ DP	Infected animals /N	Log UFC/mL $\pm$ DP	Infected animals /N	
Nystatin	3.35 $\pm$ 0.28	5/5	0.00 $\pm$ 0.00 ^b	0/5	100
Non-treated control	3.65 $\pm$ 0.17	5/5	3.15 $\pm$ 0.67	5/5	13.6
QBR	3.14 $\pm$ 0.31	5/5	2.22 $\pm$ 0.65	4/5	32.5
QMFM 1%	3.02 $\pm$ 0.09	5/5	0.90 $\pm$ 0.29 ^b	2/5	70.1
QMFM 2,5%	3.13 $\pm$ 0.06	5/5	0.00 $\pm$ 0.00 ^b	0/5	100

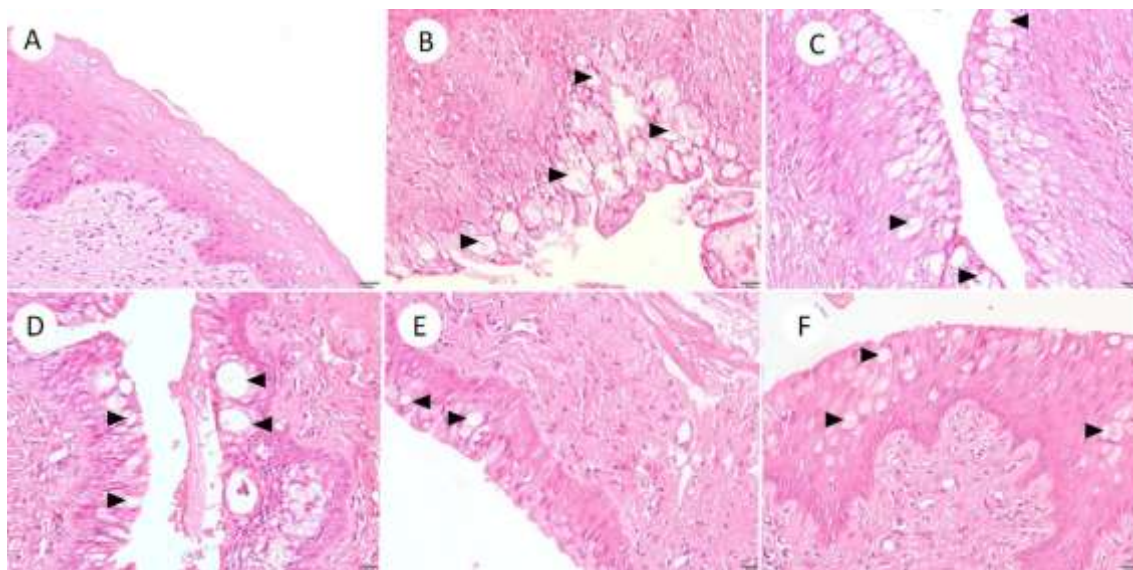
Indeed, the robustness of the rodent model used here provides important translational support for these results, as it reproduces key features involved in the prevention and

progression of human infection. These include the capacity to mount a protective immune response under conditions of estrogenic stimulation with demonstrated or likely equivalence in human infection, as well as the expression of important fungal virulence traits, such as dimorphic transition, biofilm formation and adhesins, among others [109]. Therefore, the significant reduction or elimination of fungal load observed with Chitosan-Based Films Loaded with MFM in this model reinforces the potential applicability of this therapeutic approach in future human studies.

Histopathological analysis of the vaginal mucosa demonstrated preservation of epithelial architecture in the control group, without significant alterations (Fig. 20A). In contrast, animals infected with *Candida albicans* presented extensive epithelial vacuolization, indicating impairment of vaginal mucosal integrity (Fig. 20B). Similar alterations were observed in the chitosan-treated group, although with slight attenuation of vacuolization (Fig. 20D). Conversely, the nystatin, MFM 1%, and MFM 2.5% groups showed reduced vacuolated areas and partial reconstitution of the vaginal epithelium (Fig. 20C, E, and F), with this effect being more evident in the MFM 1% group.

The vacuolization observed after *C. albicans* infection is associated with epithelial damage induced by fungal adhesion, tissue invasion, and the local inflammatory response. These alterations promote intracellular edema, epithelial disorganization, and mitochondrial damage, culminating in cytoplasmic vacuole formation and cellular degeneration. Similar findings have been described in experimental models of vulvovaginal candidiasis, in which *C. albicans* infection induced edema, vacuolization, keratinocyte detachment, inflammatory infiltrate, and progressive epithelial damage following hyphal invasion [110-112].

Figure 20. Photomicrograph of the vaginal mucosa of rats. A- control group, B- infected group, C- nystatin group, D- chitosan group, E- MFM 1% group, F- MFM 2.5% group. Arrowhead – epithelial vacuolization. Scale bar: 20µm.



The reduction in vacuolization observed in the treated groups suggests attenuation of fungal-induced tissue damage and partial restoration of epithelial integrity. The histological improvement observed in the MFM-treated groups may be associated with the antifungal activity of *Mitracarpus frigidus*, reducing fungal colonization and tissue invasion by *C. albicans*. Similar results were reported in previous studies demonstrating restoration of vaginal epithelial architecture and reduction of inflammatory and degenerative alterations after antifungal treatment in experimental vulvovaginal candidiasis models [113-115].

During vulvovaginal candidiasis, epithelial damage is not exclusively caused by fungal invasion but is also amplified by the host inflammatory response, characterized by the production of reactive oxygen species, cytokines, and other inflammatory mediators that contribute to cellular degeneration and tissue disorganization. Therefore, the marked reduction in epithelial vacuolization observed in the MFM-treated groups, may reflect a dual protective effect involving both suppression of fungal burden and attenuation of local inflammatory damage. This interpretation is supported by previous studies demonstrating anti-inflammatory activity of *M. frigidus* extracts and by reports showing that polyphenol-rich plant extracts can reduce epithelial injury, oxidative damage, and inflammatory infiltrates in mucosal infection models [10, 39].

4 CONCLUSION

This study demonstrates, for the first time, the successful incorporation of *Mitracarpus frigidus* extract into mucoadhesive chitosan-based films as an innovative pharmaceutical

dosage form for localized antifungal therapy. The developed systems functioned as controlled-release platforms, ensuring sustained delivery of bioactive compounds while maintaining physicochemical stability, structural integrity, and biocompatibility. Among the tested formulations, QMFM 2.5% (w/v) showed the most promising overall performance, combining adequate mechanical and thermal properties with prolonged release over 8 h and significant antifungal efficacy against drug-resistant *C. albicans*. In addition to inhibiting fungal growth and biofilm formation, the films demonstrated low cytotoxicity, modulation of inflammatory mediators, and enhanced fibroblast migration, supporting their potential to improve mucosal healing and local therapeutic outcomes. The *in vivo* reduction of vulvovaginal fungal burden further reinforces the translational relevance of this delivery system.

These findings highlight the potential of this bioadhesive, plant-based film as a multifunctional drug delivery platform capable of enhancing local bioavailability and therapeutic performance in mucosal infections. This approach aligns with current advances in pharmaceutical technology focused on controlled release and innovative biomaterials. Further preclinical and clinical investigations are required to confirm long-term safety, optimize manufacturing parameters, and validate its effectiveness in human applications.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

Rodrigo Luiz Fabri - Bioactive Natural Products Laboratory, Department of Biochemistry, Biological Sciences Institute, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais CEP 36036-900, Brazil. ORCID: 0000-0002-0167-2277; E-mail: rodrigo.fabri@ufjf.br.

Author Contributions

R.L.F., T.N.B., G.D.T., E.S.C., F.A.J., A.M.D.L., M.G.F.A.; L.F.C.O., and G.C.M. acquired resources and conceived the tests; T.G.F., J.B.F., A.S.O.L., L.M.C., T.F.S., M.C.M.R.G., E.O.A.; M.H.V., N.B.A., M.R.C.C., V.N.R., L.A.C., and A.B.P. performed the experiments; T.G.F., T.N.G., V.N.R., F.A.J., A.M.D.L., A.S.O.L., and R.L.F. analyzed the data; R.L.F., T.N.B., A.M.D.L., M.G.F.A.; F.A.J., R.D.M., and T.G.F. wrote and reviewed the paper. All authors have read and approved the published version of the manuscript.

Funding Sources

This work was supported by grants and scholarships from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil - grant number: 408700/2021-1), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (grant numbers: APQ-01357-21; RED-00067-23; RED-00096-22; APQ-02177-22), Federal University of Juiz de Fora (UFJF/Brazil), and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil). CNPq grants to R.L.F.

Notes

The authors declare that none of the work reported in this study could have been influenced by any known competing financial interests or personal relationships.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank Delfino Antonio Campos of the Department of Biochemistry, Federal University of Juiz de Fora, for technical assistance and Analytical Methods Platform of Farmanguinhos/FIOCRUZ by UFLC-QTOF-MS analysis.

REFERENCES

- [1] M. Dadar, R. Tiwari, K. Karthik, S. Chakraborty, Y. Shahali, K. Dhama, *Candida albicans* - Biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control – An update, *Microb Pathog* 117 (2018) 128–138. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.02.028>.
- [2] S. Hameed, S. Hans, R. Monasky, S. Thangamani, Z. Fatima, Understanding human microbiota offers novel and promising therapeutic options against *Candida* infections, *Pathogens* 10 (2021) 183.
- [3] K.E. Pristov, M.A. Ghannoum, Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide, *Clinical Microbiology and Infection* 25 (2019) 792–798. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.03.028>.
- [4] B.J. Kullberg, D. Arenz, Invasive candidiasis, *New England Journal of Medicine* 382 (2020) 995–1003.
- [5] S.S. Dos Santos, Prevalência de candidíase oral em pacientes hospitalizados na rede pública de saúde., *Revista de Ciências Médicas e Biológicas* 17 (2018) 13–18.

- [6] F.J. Sun, M. Li, L. Gu, M.L. Wang, M.H. Yang, Recent progress on anti-Candida natural products, *Chin J Nat Med* 19 (2021) 561–579. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(21\)60057-2](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(21)60057-2).
- [7] L.M. Campos, A.S.O. Lemos, P.L. Paula, V.N. da Rocha, M.G.F. Araújo, G.D. Tavares, T.N. Barradas et al., Exploring the antifungal potential of *Annona muricata* leaf extract-loaded hydrogel in treating vulvovaginal candidiasis., *Colloids Surf. B Biointerfaces* 238 (2024) 113919. [10.1016/j.colsurfb.2024.113919](https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2024.113919)
- [8] S. Davidova, A.S. Galabov, G. Satchanska, Antibacterial, antifungal, antiviral activity, and mechanisms of action of plant polyphenols, *Microorganisms* 12 (2024) 2502. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12122502>.
- [9] T.G. Ferreira, T. de Freitas Souza, P. de Lima Paula, A.S. de Oliveira Lemos, N. de C.C. Pinto, Â.M.L. Denadai, R.L. Fabri, Structural, physicochemical, and functional (antioxidant/anti-inflammatory) properties of β -cyclodextrin supramolecular complexation with *Mitracarpus frigidus* extract, *J Drug Deliv Sci Technol* 84 (2023) 104431. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2023.104431>.
- [10] L.M. Campos, A.S. de Oliveira Lemos, L.F. da Cruz, M.G. de Freitas Araújo, G.C.R. de Mello Botti, J.L.R. Júnior, V.N. Rocha, Â.M.L. Denadai, T.P. da Silva, G.D. Tavares, E. Scio, R.L. Fabri, P.F. Pinto, Development and in vivo evaluation of chitosan-gel containing *Mitracarpus frigidus* methanolic extract for vulvovaginal candidiasis treatment, *Biomedicine & Pharmacotherapy* 130 (2020) 110609. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110609>.
- [11] L.M. Campos, A.S.O. Lemos, P.L. Paula, T.F. Souza, T.P. Silva, V.N. Rocha, A.C.M. Apolônio, P.F. Pinto, R.C.N. Melo, R.L. Fabri, Methanolic extract of *Mitracarpus frigidus* inhibits filamentation and biofilm mode of growth from multidrug resistant *Candida albicans*, *Ind Crops Prod* 172 (2021) 114074. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.114074>.
- [12] B. Valamla, P. Thakor, R. Phuse, M. Dalvi, P. Kharat, A. Kumar, D. Panwar, S.B. Singh, P. Giorgia, N.K. Mehra, Engineering drug delivery systems to overcome the vaginal mucosal barrier: Current understanding and research agenda of mucoadhesive formulations of vaginal delivery, *J Drug Deliv Sci Technol* 70 (2022) 103162. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103162>.
- [13] J.S. Lee, Y. Hwang, H. Oh, S. Kim, J.-H. Kim, J.-H. Lee, Y.C. Shin, G. Tae, W. Il Choi, A novel chitosan nanocapsule for enhanced skin penetration of cyclosporin A and

effective hair growth in vivo, *Nano Res* 12 (2019) 3024–3030. <https://doi.org/10.1007/s12274-019-2546-x>.

[14] G. Liu, X. Xu, L. Jiang, H. Ji, F. Zhu, B. Jin, J. Han, X. Dong, F. Yang, B. Li, Targeted Antitumor Mechanism of C-PC/CMC-CD55sp Nanospheres in HeLa Cervical Cancer Cells, *Front Pharmacol* Volume 11-2020 (2020). <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00906>.

[15] L.M. Gradinaru, M. Barbalata-Mandru, A.A. Enache, C.M. Rimbu, G.I. Badea, M. Aflori, Chitosan membranes containing plant extracts: Preparation, characterization and antimicrobial properties, *International Journal of Molecular Sciences* 24 (2023) 8673. <https://doi.org/10.3390/ijms24108673>

[16] N. Muñoz-Tebar, J.A. Pérez-Álvarez, J. Fernández-López, M. Viuda-Martos, Chitosan edible films and coatings with added bioactive compounds: Antibacterial and antioxidant properties and their application to food products: A review, *Polymers* 15 (2023) 396. <https://doi.org/10.3390/polym15020396>

[17] W.-H. Lo, F.-S. Deng, C.-J. Chang, C.-H. Lin, Synergistic antifungal activity of chitosan with fluconazole against *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, and fluconazole-resistant strains, *Molecules* 25 (2020) 5114. <https://doi.org/10.3390/molecules25215114>

[18] J.B. Fajardo, M.H. Vianna, A.B. Polo, T.G. Ferreira, A.S. Lemos, T. de Freitas Souza, L.M. Campos, P. de Lima Paula, N.B. Andrade, G.C. Gonçalves, A.F. Barbosa, M.G. de Carvalho, M.C.M.R. Guedes, E.S. Coimbra, G. Costa Macedo, G.D. Tavares, T.N. Barradas, Â.M.L. Denadai, R.L. Fabri, Development and in vitro biological characterization of chitosan films loaded with the *Acmella oleracea* leaves extract for wound healing application, *Int J Biol Macromol* 318 (2025). <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.144960>.

[19] C.M.P. Yoshida, M.S. Pacheco, M.A. de Moraes, P.S. Lopes, P. Severino, E.B. Souto, C.F. da Silva, Effect of Chitosan and Aloe Vera Extract Concentrations on the Physicochemical Properties of Chitosan Biofilms, *Polymers (Basel)* 13 (2021). <https://doi.org/10.3390/polym13081187>.

[20] O. Folin, V. Ciocalteu, On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *J Biol Chem* 73 (1997) 627–650. DOI: 10.1016/S0021-9258(18)84277-6.

[21] A. Shah, M. Ali Buabeid, E.-S.A. Arafa, I. Hussain, L. Li, G. Murtaza, The wound healing and antibacterial potential of triple-component nanocomposite (chitosan-silver-

sericin) films loaded with moxifloxacin, *Int J Pharm* 564 (2019) 22–38. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.04.046>.

[22] Costa, P.; Sousa Lobo, J. M., Modeling and comparison of dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2001, 13, (2), 123-133. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0928-0987\(01\)00095-1](https://doi.org/10.1016/S0928-0987(01)00095-1)

[23] Lourenço, A. S.; Schuster, T.; Lopes, J. A.; Kirsch, A., A non-linear modelling approach to predict the dissolution profile of extended-release tablets. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2025, 204, 106976. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2024.106976>

[24] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays, *J Immunol Methods* 65 (1983) 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).

[25] J. Sun, X. Zhang, M. Broderick, H. Fein, Measurement of Nitric Oxide Production in Biological Systems by Using Griess Reaction Assay, *Sensors* 3 (2003) 276–284. <https://doi.org/10.3390/s30800276>.

[26] A.C. Silva, A.B.C. dos S. Valle, A.S. de O. Lemos, L.M. Campos, R.L. Fabri, F.F. Costa, J.G. da Silva, F.M.P. Vilela, G.D. Tavares, M.P. Rodarte, Â.M.L. Denadai, Development and characterization of chitosan film containing hydroethanolic extract of *Coffea arabica* leaves for wound dressing application, *Mater Today Commun* 38 (2024) 108503. <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2024.108503>.

[27] A. Balkrishna, S. Verma, V.P. Mulay, A.K. Gupta, S. Haldar, A. Varshney, *Withania somnifera* (L.) Dunal whole-plant extracts exhibited anti-sporotrichotic effects by destabilizing peripheral integrity of *Sporothrix globosa* yeast cells, *PLoS Negl Trop Dis* 16 (2022) e0010484-. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010484>.

[28] A.S.O. Lemos, J.R. Florêncio, N.C.C. Pinto, L.M. Campos, T.P. Silva, R.M. Grazul, P.F. Pinto, G.D. Tavares, E. Scio, A.C.M. Apolônio, R.C.N. Melo, R.L. Fabri, Antifungal Activity of the Natural Coumarin Scopoletin Against Planktonic Cells and Biofilms From a Multidrug-Resistant *Candida tropicalis* Strain, *Front Microbiol* Volume 11-2020 (2020). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01525>.

[29] H. Sadan, B.M. Shanthala, M.A. Zareena, G. Babu, V. Vijayan, In vitro evaluation of milk-based, soy-based, and amino acid-based infant formulas on *Streptococcus*

mutans biofilm formation, Journal of Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry 38 (2020).

[30] A. Nostro, A.S. Roccaro, G. Bisignano, A. Marino, M.A. Cannatelli, F.C. Pizzimenti, P.L. Cioni, F. Procopio, A.R. Blanco, Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms, J Med Microbiol 56 (2007) 519–523. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46804-0>.

[31] R. Fabri, R. Garcia, J. Florêncio, N. Pinto, L. Oliveira, J. Aguiar, A. Ribeiro, E. Scio, Anti-inflammatory and antioxidative effects of the methanolic extract of the aerial parts of *Mitracarpus frigidus* in established animal models, J Pharm Pharmacol 66 (2014). <https://doi.org/10.1111/jphp.12189>.

[32] A.S.O. Lemos, L.M. Campos, T.F. Souza, P.L. Paula, J.T. Granato, J.V.G. Silva, D.M.O. Aragão, V.N. Rocha, E.S. Coimbra, R.L. Fabri, Pharmacological investigation of antioxidant and anti-inflammatory activities of aqueous extract from *Mitracarpus frigidus* (e). J Pharm Pharmacol 74 (2022) 750–760. DOI: 10.1093/jpp/rgac005.

[33] E.G. Lanna, V.C.E. Bittencourt, A.M.S. Moreira, J.G. Da Silva, O. V Sousa, Â.M.L. Denadai, Physicochemical characterization and biological activities of the ethanol extract of *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Oken incorporated in β -cyclodextrin, J Incl Phenom Macrocycl Chem 85 (2016) 247–259. <https://doi.org/10.1007/s10847-016-0624-1>.

[34] F.G. de Carvalho, T.C. Magalhães, N.M. Teixeira, B.L.C. Gondim, H.L. Carlo, R.L. dos Santos, A.R. de Oliveira, Â.M.L. Denadai, Synthesis and characterization of TPP/chitosan nanoparticles: Colloidal mechanism of reaction and antifungal effect on *C. albicans* biofilm formation, Materials Science and Engineering: C 104 (2019) 109885. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109885>.

[35] A.A. Escárcega-Galaz, D.I. Sánchez-Machado, J. López-Cervantes, A. Sanches-Silva, T.J. Madera-Santana, P. Paseiro-Losada, Mechanical, structural and physical aspects of chitosan-based films as antimicrobial dressings, Int J Biol Macromol 116 (2018) 472–481. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.149>.

[36] A. Silva-Weiss, V. Bifani, M. Ihl, P.J.A. Sobral, M.C. Gómez-Guillén, Structural properties of films and rheology of film-forming solutions based on chitosan and chitosan-starch blend enriched with murta leaf extract, Food Hydrocoll 31 (2013) 458–466. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.11.028>.

- [37] J. Y. Kim, Chitosan-coated plga nanoparticles for enhanced skin permeation of hydrophilic agents, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 40 (2019) 33–42.
- [38] S. Rust, W. Pauer, Determination of inline-particle sizes by turbidity measurement in high solid content emulsion polymerisations, *Journal of Polymer Research* 29 (2022) 307. <https://doi.org/10.1007/s10965-022-03141-z>.
- [39] R. L. Fabri, Antibacterial and leishmanicidal effects of the hexane extract of *Mitracarpus frigidus* (Rubiaceae) aerial parts, *Rev Bras Farm* 95 (2014) 695–714.
- [40] C.M.C. Filho, P.V.A. Bueno, A.F.Y. Matsushita, B.H. Vilsinski, A.F. Rubira, E.C. Muniz, D.M.B. Murtinho, A.J.M. Valente, Uncommon Sorption Mechanism of Aromatic Compounds onto Poly(Vinyl Alcohol)/Chitosan/Maleic Anhydride- β -Cyclodextrin Hydrogels, *Polymers (Basel)* 12 (2020). <https://doi.org/10.3390/polym12040877>.
- [41] J. Pan, C. Li, J. Liu, Z. Jiao, Q. Zhang, Z. Lv, W. Yang, D. Chen, H. Liu, Polysaccharide-Based Packaging Coatings and Films with Phenolic Compounds in Preservation of Fruits and Vegetables—A Review, *Foods* 13 (2024). <https://doi.org/10.3390/foods13233896>.
- [42] R.P. Chhabra, W.B. Russell, J.D. Mattingly, Y. Wang, Y. Zhang, Rheology of complex fluids: from theory to applications., In: *Proceedings of the 2010 International Conference on Fluid Mechanics*. (2010) 1–10.
- [43] M.A.V. Rodrigues, M.R.V. Bertolo, C.A. Marangon, V.C.A. Martins, A.M.G. Plepis, Chitosan and gelatin materials incorporated with phenolic extracts of grape seed and jabuticaba peel: Rheological, physicochemical, antioxidant, antimicrobial and barrier properties, *International Journal of Biological Macromolecules* 160 (2020) 769–779. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.05.240>
- [44] M.R. V Bertolo, V.C.A. Martins, M.M. Horn, L.B. Brenelli, A.M.G. Plepis, Rheological and antioxidant properties of chitosan/gelatin-based materials functionalized by pomegranate peel extract, *Carbohydr Polym* 228 (2020) 115386. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115386>.
- [45] C. Wu, J. Tian, S. Li, T. Wu, Y. Hu, S. Chen, T. Sugawara, X. Ye, Structural properties of films and rheology of film-forming solutions of chitosan gallate for food packaging, *Carbohydr Polym* 146 (2016) 10–19. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.03.027>.

- [46] P.J. do Amaral Sobral, G. Gebremariam, F. Drudi, A.C. De Aguiar Saldanha Pinheiro, S. Romani, P. Rocculi, M. Dalla Rosa, Rheological and Viscoelastic Properties of Chitosan Solutions Prepared with Different Chitosan or Acetic Acid Concentrations, *Foods* 11 (2022). <https://doi.org/10.3390/foods11172692>.
- [47] X. Zhang, Y. Li, J. Wang, H. Wang, Y. Liu, Gallate-functionalized chitosan: preparation, characterization, and effect on gel properties, *Carbohydr Polym* 278 (2022).
- [48] Y. Zang, H. Li, X. Wang, L. Zhang, S. Chen, Phase separation and structural reinforcement in phenolic chitosan systems: a rheological investigation, *Carbohydr Polym* 297 (2022).
- [49] Y Wang, R. Ewoldt, D.E Smith, Hysteresis loop analysis of thixotropy in biopolymer solutions under shear ramps, *J Rheol (N Y N Y)* 67 (2023) 451–468.
- [50] C.A. Canciam, Efeito da temperatura na viscosidade de óleos vegetais refinados. , *Publicatio Uepg: Ciências Exatas e Da Terra, Agrárias e Engenharias* 16 (2010) 7–12.
- [51] V.M. De Benedictis, G. Soloperto, C. Demitri, Correction of MHS Viscosimetric Constants upon Numerical Simulation of Temperature Induced Degradation Kinetic of Chitosan Solutions, *Polymers (Basel)* 8 (2016). <https://doi.org/10.3390/polym8060210>.
- [52] F.S. Pereira, D.L. da Silva Agostini, A.E. Job, E.R.P. González, Thermal studies of chitin–chitosan derivatives, *J Therm Anal Calorim* 114 (2013) 321–327. <https://doi.org/10.1007/s10973-012-2835-z>.
- [53] A.P. Martínez-Camacho, M.O. Cortez-Rocha, J.M. Ezquerro-Brauer, A.Z. Graciano-Verdugo, F. Rodriguez-Félix, M.M. Castillo-Ortega, M.S. Yépiz-Gómez, M. Plascencia-Jatomea, Chitosan composite films: Thermal, structural, mechanical and antifungal properties, *Carbohydr Polym* 82 (2010) 305–315. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.04.069>.
- [54] C.K.S. Pillai, W. Paul, C.P. Sharma, Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation, *Prog Polym Sci* 34 (2009) 641–678. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2009.04.001>.
- [55] J. et al. LI, Effects of different acid solvents on the properties of chitosan-based films, *Int J Biol Macromol* 124 (2019) 1156–1163.

- [56] Y. Zhang, Q. Li, J. Wang, Rheological and film forming properties of chitosan composites with functional additives, *Int J Mol Sci* 23 (2022) 8763.
- [57] M. Barik, G.V.S. BhagyaRaj, K.K. Dash, R. Shams, A thorough evaluation of chitosan-based packaging film and coating for food product shelf-life extension, *Journal of Agriculture and Food Research* 16 (2024) 101164. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2024.101164>
- [58] R.M. Silverstein, G.C. Bassler, Spectrometric identification of organic compounds, *J Chem Educ* 39 (1962) 546. <https://doi.org/10.1021/ed039p546>
- [59] M. Kaya, Preparation and characterization of chitosan-based films incorporated with plant extracts: a spectroscopic and morphological study, 130 (2019) 1222–1229.
- [60] S.R. Kanatt, A. Chandrasekhar, A. Sharma, P. Nischitha, Chitosan and guar gum based active films containing green tea extract, *Food Hydrocoll* 27 (2012) 199–206.
- [61] Y Jiang, Preparation and characterization of chitosan-based films incorporated with akebia trifoliata (thunb.) Koidz extract, *Int J Biol Macromol* 143 (2020) 353–361.
- [62] S Shankar, Preparation of transparent chitosan-based antimicrobial films incorporated with green tea extract, *Food Hydrocoll* 50 (2015) 53–63.
- [63] S. Alvarado, G. Sandoval, I. Palos, S. Tellez, Y. Aguirre-Loredo, G. Velazquez. The effect of relative humidity on tensile strength and water vapor permeability in chitosan, fish gelatin and transglutaminase edible films. *Food Sci & Tech*, 35 (2015) 690-695. <https://doi.org/10.1590/1678-457X.6797>
- [64] D.S. de la Mora-López, T.J. Madera-Santana, J. López-Cervantes, D.I. Sánchez-Machado, J.F. Ayala-Zavala, H. Soto-Valdez. Development and characterization of chitosan-collagen films loaded with honey. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 33 (2023). <https://doi.org/10.1590/0104-1428.20230031>
- [65] N.B.K. Zaman, N.K. Lin, P.L. Phing, Chitosan film incorporated with *Garcinia atroviridis* for the packaging of Indian mackerel (*Rastrelliger kanagurta*). *Ciência e Agrotecnologia*, 42 (2018) 666-675. <https://doi.org/10.1590/1413-70542018426019918>
- [66] J.A. de Almeida Nascimento, A.F. dos Santos, I.D. Lima Silva, E.H. Lago Falcão, D.D. Britto, G.M. Vinhas. Physico-chemical, mechanical and morphological properties of biodegradable films based on arrowroot starch and poly (vinyl alcohol). *J Macromol Sci, Part B*, 60 (2021) 1045-1068. <https://doi.org/10.1080/00222348.2021.1949836>

- [67] T.J. Madera-Santana, A.E. Verdugo, V. Rejón-Moo, J.F. Hernández, J.F. Physico-mechanical and structural characterization of polyethylene films and thermoplastic pinto bean starch. *Polímeros*, 35 (2025), 20250018. <https://doi.org/10.1590/0104-1428.20240103>
- [68] M.M. Gonçalves, J. Carneiro, B. Justus, J.T. Espinoza, J.M. Budel, P.V. Farago, J.P.D. Paula. Preparation and characterization of a novel antimicrobial film dressing for wound healing application. *Braz J Pharm Sci*, 56 (2021) 18784. <https://doi.org/10.1590/s2175-97902020000118784>
- [69] B. Shi, Z. Hao, Y. Du, M. Jia, S. Xie, Mechanical and barrier properties of chitosan-based composite film as food packaging: A review, *Bioresources* 19 (2024) 4001–4014. <https://doi.org/10.15376/biores.19.2.Shi>.
- [70] K. Kulka, A. Sionkowska, Chitosan based materials in cosmetic applications: A review, *Molecules* 28 (2023) 1817. <https://doi.org/10.3390/molecules28041817>
- [71] P. Rachtanapun, T. Phetkhunthod, T. Chinsirichote, W. Rakchanok, T. Laokuldilok, N. Rattanapanone, A. Seubnoo, P. Jantrawut, Physical, morphological, and antioxidant properties of mango peel pectin–alginate–methylcellulose films containing catechin–lysozyme complex, *J Food Sci Technol* 58 (2021) 2161–2171.
- [72] X. Wang, J. Zhang, Y. Li, Chitosan based biodegradable active food packaging film incorporated with plant extract: physicochemical, mechanical and microstructural analyses, *Int J Biol Macromol* 162 (2020).
- [73] D. McColl, B. Cartlidge, P. Connolly, Real-time monitoring of moisture levels in wound dressings in vitro: An experimental study, *International Journal of Surgery* 5 (2007) 316–322. <https://doi.org/10.1016/j.ijssu.2007.02.008>.
- [74] D. Kumar, P. Kumar, J. Pandey, Binary grafted chitosan film: Synthesis, characterization, antibacterial activity and prospects for food packaging, *Int J Biol Macromol* 115 (2018) 341–348. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.084>.
- [75] S. Tolentino, C.O. Cardoso, M.M. Monteiro, S.F. Taveira, T. Gratieri, M. Cunha-Filho, E.N.S. Guerra, G.M. Gelfuso, Chitosan-based mucoadhesive films loaded with curcumin for topical treatment of oral cancer, *Int J Biol Macromol* 278 (2024) 134887. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.134887>.

- [76] L. Rahman, J. Goswami, D. Choudhury, Assessment of physical and thermal behaviour of chitosan-based biocomposites reinforced with leaf and stem extract of *Tectona grandis*, *Polym. Polym. Compos.* 30 (2022). <https://doi.org/10.1177/09673911221076305>
- [77] W. Chen, M. Ni, W. Li, Y. Shi, H. Jiang, Enhancement of chitosan film properties via hydrogen bonding with waste-derived loquat peel polyphenols and its application in food packaging, *J. Agric. Food Chem.* 74 (2026) 1022–1036. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5c12807>.
- [78] S.C. Pech-Cohuo, H. Martín-López, J. Uribe-Calderón, N.G. González-Canché, I. Salgado-Tránsito, A. May-Pat, J.C. Cuevas-Bernardino, T. Ayora-Talavera, J.M. Cervantes-Uc, N. Pacheco, Physicochemical, mechanical, and structural properties of bio-active films based on biological-chemical chitosan, a novel ramon (*Brosimum alicastrum*) starch, and quercetin, *Polym.* 14 (2022) 1346. <https://doi.org/10.3390/polym14071346>.
- [79] J. Sutharsan, C. Boyer, J. Zhao, Physicochemical properties of chitosan edible films incorporated with different classes of flavonoids, *Carbohydr. Polym. Technol. Appl.* 4 (2022) 100232. <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2022.100232>.
- [80] L. Gao, T. Zhu, F. He, Z. Ou, J. Xu, L. Ren, Preparation and characterization of functional films based on chitosan and corn starch incorporated tea polyphenols, *Coatings* 11 (2021) 817. <https://doi.org/10.3390/coatings11070817>.
- [81] F. Xue, M. Zhao, X. Liu, R. Chu, Z. Qiao, C. Li, B. Adhikari, Physicochemical properties of chitosan/zein/essential oil emulsion-based active films functionalized by polyphenols, *Future Foods* 3 (2021) 100033. <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2021.100033>.
- [82] M.K. Dwivedi, S. Sonter, S. Mishra, P. Kumar, S. Singh, S. Kumar. Secondary metabolite profiling and characterization of diterpenes and flavones from the methanolic extract of *Andrographis paniculata* using HPLC-LC-MS/MS. *Futur J Pharm Sci* 7 (2021) 184. DOI: 10.1186/s43094-021-00292-6.
- [83] S. Silva, E.M. Costa, A. Borges, A.P. Carvalho, M.J. Monteiro, M. Pintado. Extraction systems and analytical techniques for food phenolic compounds: a review. *Processes* 10 (2022) 2408. DOI: 10.3390/pr10112408.
- [84] G.K. Abilova, D.B. Kaldybekov, G.S. Irmukhametova, D.S. Kazybayeva, Z.A. Iskakbayeva, S.E. Kudaibergenov, V.V. Khutoryanskiy. Chitosan/Poly(2-ethyl-2-oxazoline)

films with ciprofloxacin for application in vaginal drug delivery. *Materials* 13 (2020) 1709. DOI: 10.3390/ma13071709.

[85] Siepmann, J.; Peppas, N. A., Higuchi equation: Derivation, applications, use and misuse. *International Journal of Pharmaceutics* 2011, 418, (1), 6-12. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.03.051>

[86] Korsmeyer, R. W.; Peppas, N. A., Effect of the morphology of hydrophilic polymeric matrices on the diffusion and release of water soluble drugs. *Journal of Membrane Science* 1981, 9, (3), 211-227. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0376-7388\(00\)80265-3](https://doi.org/10.1016/S0376-7388(00)80265-3)

[87] MacDonald, K.; Boyd, D., Mechanical loading, an important factor in the evaluation of ion release from bone augmentation materials. *Sci Rep* 2018, 8, (1), 14225. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32325-1>

[88] Wang, J.; Wu, W.; Lin, Z., Kinetics and thermodynamics of the water sorption of 2-hydroxyethyl methacrylate/styrene copolymer hydrogels. *Journal of Applied Polymer Science* 2008, 109, (5), 3018-3023. DOI: <https://doi.org/10.1002/app.28403>

[89] M. Lucio, P. Santos, A. Rodriguez, Controlled release behavior from semicrystalline chitosan-based films: structural influence on diffusion kinetics. *International journal of molecular sciences*, *Int J Mol Sci* 23 (2022).

[90] Rossi, F.; Castiglione, F.; Ferro, M.; Marchini, P.; Mauri, E.; Moiola, M.; Mele, A.; Masi, M., Drug–Polymer Interactions in Hydrogel-based Drug-Delivery Systems: An Experimental and Theoretical Study. *ChemPhysChem* **2015**, 16, (13), 2818-2825. DOI: <https://doi.org/10.1002/cphc.201500526>

[91] R. Nascimento, C. Araújo, E. Melo, Atividade antioxidante de extratos de resíduo agroindustrial de goiaba (*Psidium guajava* L.), *Alimentos e Nutrição* 21 (2010).

[92] ISO 10993-5:2009, Biological evaluation of medical devices—Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity, German Version EN ISO 10993-5 (2019).

[93] I. Bano, M. Arshad, T. Yasin, M.A. Ghauri, M. Younus, Chitosan: A potential biopolymer for wound management, *Int J Biol Macromol* 102 (2017) 380–383. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.04.047>.

- [94] H. Liu, C. Wang, C. Li, Y. Qin, Z. Wang, F. Yang, Z. Li, J. Wang, A functional chitosan-based hydrogel as a wound dressing and drug delivery system in the treatment of wound healing, *RSC Adv* 8 (2018) 7533–7549. <https://doi.org/10.1039/C7RA13510F>.
- [95] P. de Lima Paula, A.S. de Oliveira Lemos, L.M. Campos, T.G. Ferreira, T. Freitas de Souza, L.S. Queiroz, M.C. Machado Resende Guedes, M.M. Martins, L.R. Goulart Filho, G.C. Macedo, G.D. Tavares, V.N. Rocha, Â.M. Leite Denadai, R.L. Fabri, Pharmacological investigation of antioxidant and anti-inflammatory activities of leaves and branches extracts from *Plinia cauliflora* (Jaboticaba), *J Ethnopharmacol* 280 (2021) 114463. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114463>.
- [96] J.B. Fajardo, M.H. Vianna, A.B. Polo, T.G. Ferreira, A.S. Lemos, T. de Freitas Souza, L.M. Campos, P. de Lima Paula, N.B. Andrade, G.C. Gonçalves, A.F. Barbosa, M.G. de Carvalho, M.C.M.R. Guedes, E.S. Coimbra, G. Costa Macedo, G.D. Tavares, T.N. Barradas, Â.M.L. Denadai, R.L. Fabri, Development and in vitro biological characterization of chitosan films loaded with the *Acmella oleracea* leaves extract for wound healing application, *Int J Biol Macromol* 318 (2025) 144960. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.144960>.
- [97] T. de Freitas Souza, T. Gomes Ferreira, K. Chaves Ferreira, L. Morais de Oliveira, L. Melo Campos, L. de Araújo Carvalho, N. Bennini Andrade, R. Fabri, *Mitracarpus frigidus*: explorando o potencial medicinal e os compostos bioativos de uma fonte natural – um estudo de revisão, *REVISTA CIENTÍFICA DA FAMINAS* 18 (2023) 43–61. <https://periodicos.faminas.edu.br/index.php/RCFaminas/article/view/736>.
- [98] J. Wang, Z. Duan, X. Chen, M. Li, The immune function of dermal fibroblasts in skin defence against pathogens, *Exp Dermatol* 32 (2023) 1326–1333. <https://doi.org/10.1111/exd.14858>.
- [99] N. Zulkefli, C.N.M. Che Zahari, N.H. Sayuti, A.A. Kamarudin, N. Saad, H.S. Hamezah, H. Bunawan, S.N. Baharum, A. Mediani, Q.U. Ahmed, A.F.H. Ismail, M.N. Sarian, Flavonoids as Potential Wound-Healing Molecules: Emphasis on Pathways Perspective, *Int J Mol Sci* 24 (2023). <https://doi.org/10.3390/ijms24054607>.
- [100] R. Ghiulai, O.J. Roşca, D.S. Antal, M. Mioc, A. Mioc, R. Racoviceanu, I. Macaşoi, T. Olariu, C. Dehelean, O.M. Creţu, M. Voicu, C. Şoica, Tetracyclic and Pentacyclic Triterpenes with High Therapeutic Efficiency in Wound Healing Approaches, *Molecules* 25 (2020). <https://doi.org/10.3390/molecules25235557>.

- [101] R. JAYAKUMAR, Chitosan-based hydrogels for biomedical applications, *Prog Polym Sci* 36 (2021) 961–981.
- [102] L. Valencia-Gómez, C. Rodriguez, M. Valenzuela, F. Cabrera, K. López, J. Paz, H. Blas, J. Villela, I. Olivas-Armendariz, Allium cepa: A Natural Enhancer of Wound Closure and Cell Viability in O-Carboxymethyl Chitosan Films, *Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica* 46 (2025).
- [103] T. Brás, D. Rosa, A.C. Gonçalves, A.C. Gomes, V.D. Alves, J.G. Crespo, M.F. Duarte, L.A. Neves, Development of bioactive films based on chitosan and *Cynara cardunculus* leaves extracts for wound dressings, *Int J Biol Macromol* 163 (2020) 1707–1718. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.09.109>.
- [104] L.M. Campos, L. de Melo, A.S.O. Lemos, M.C.M.R. Guedes, T.P. Silva, G.F. Figueiredo, J.L. Reis, V.N. Rocha, R.C.N. Melo, M.G.F. Araújo, A.C.M. Apolônio, E. Scio, R.L. Fabri, *Mitracarpus frigidus*: A promising antifungal in the treatment of vulvovaginal candidiasis, *Ind Crops Prod* 123 (2018) 731–739. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.07.038>.
- [105] Y. Pu, A. Liu, Y. Zheng, B. Ye, In vitro damage of *Candida albicans* biofilms by chitosan, *Exp Ther Med* 8 (2014) 929–934. <https://doi.org/10.3892/etm.2014.1839>.
- [106] C.-L. Ke, F.-S. Deng, C.-Y. Chuang, C.-H. Lin, Antimicrobial Actions and Applications of Chitosan, *Polymers (Basel)* 13 (2021) 904. <https://doi.org/10.3390/polym13060904>.
- [107] F. Khan, D. Pham, S. Oloketuyi, P. Manivasagan, J. Oh, Y.-M. Kim, Chitosan and their derivatives: Antibiofilm drugs against pathogenic bacteria, *Colloids Surf B Biointerfaces* 185 (2019) 110627. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110627>.
- [108] D. Yan, Y. Li, Y. Liu, N. Li, X. Zhang, C. Yan, Antimicrobial Properties of Chitosan and Chitosan Derivatives in the Treatment of Enteric Infections, *Molecules* 26 (2021). <https://doi.org/10.3390/molecules26237136>.
- [109] A. Cassone, J.D. Sobel, Experimental models of vaginal candidiasis and their relevance to human candidiasis, *Infect. Immun.* 84 (2016) 1255–1261, <https://doi.org/10.1128/IAI.01544-15>.

- [110] M. Schaller, H.C. Korting, C. Borelli, B. Hamm, B.J. Hube. The secreted aspartyl proteinases Sap1 and Sap2 cause tissue damage in an in vitro model of vaginal candidiasis based on reconstituted human vaginal epithelium. *Infect Immun* 71 (2003) 3227–3234. DOI: 10.1128/IAI.71.6.3227-3234.2003.
- [111] X. Wu, S. Zhang, H. Li, L. Shen, C. Dong, Y. Sun, H. Chen, B. Xu, W. Zhuang, M. Deighton, Y. Qu. Biofilm formation of *Candida albicans* facilitates fungal infiltration and persister cell formation in vaginal candidiasis. *Front Microbiol* 11 (2020) 1117. DOI: 10.3389/fmicb.2020.01117.
- [112] T. Li, Z. Zhang, H.H. Bai, L.Y. Fan, X.N. Zong, Z.H. Liu. Ultrastructural pathological observation of vaginal inflammatory mucosal injury induced by *Candida albicans* infection and the restorative effect of *Lactobacillus crispatus*. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 60 (2025) 890–896. DOI: 10.3760/cma.j.cn112141-20250614-00275.
- [113] A.P. Bonfim, K.M. Sakita, D.R. Faria, G.S. Arita, F.A.V. Rodrigues-Vendramini, I.R.G. Capoci, A.G. Braga, V.A.B. Mosca, A.G.O. Junior, E.S. Kioshima, P.S. Bonfim-Mendonça, T.I.E. Svidzinski. Successful treatment of experimental murine vulvovaginal candidiasis with gentian violet. *Future Microbiol* 18 (2023) 1137–1146. DOI: 10.2217/fmb-2023-0021.
- [114] X. Zhang et al. Protective effect of nystatin on vaginal epithelial ultrastructure in experimental vulvovaginal candidiasis. *Exp Ther Med* 15 (2018) 3621–3628.
- [115] H. Zhou et al. D-lactic acid inhibits *Candida albicans* associated with vulvovaginal candidiasis: in vitro and in vivo effects and underlying mechanisms. *Int J Biol Macromol* 289 (2025).

Legend of figures

Figure 1. Characterization of film precursor solutions of the chitosan films containing the extract of *M. frigidus* (QMFM 0.5-2.5% w/v) and the blank film (QBR). Figure A: zeta potential (ZP) values. Figure B: hydrodynamic diameter (Dh). b – significant difference compared to QMFM 2.5% (w/v); c – significant difference compared to QMFM 1% (w/v); d – significant difference compared to QMFM 0.5% (w/v). Statistical analysis performed using ANOVA followed by Bonferroni's test ($p < 0.05$).

Figure 2. Reological analysis of the precursor solutions of the chitosan films containing the extract of *M. frigidus* (QMFM 1-2.5% w/v) and the blank film (QBR). A: viscoelastic properties by amplitude sweep curve. B: damping factor curve. C: Complex viscosity curve. D and E: analysis.steady-state viscosity and flow curves. F: viscosity versus temperature curve (10-50°C).

Figure 3. Thermogravimetric analysis of chitosan films containing the extract of *M. frigidus* (QMFM 0.5-2.5% w/v) and the blank film (QBR). A: TGA curves; B: DTG curves.

Figure 4. Scanning electron microscopy of the surfaces of chitosan films containing the extract of *M. frigidus* (QMFM 0.5-2.5% w/v) and the blank film (QBR). A1: QBR 1500x A2: QBR 3000x; B1: QMFM 0,5% 1500x B2: QMFM 0,5% 3000x; C1: QMFM 1% 1500x; C2: QMFM 1% 3000x; D1: QMFM 2,5% 1500x; D2: QMFM 2,5% 3000x;

Figure 5. Scanning electron microscopy of the cross-sections of chitosan films containing the extract of *M. frigidus* (QMFM 0.5-2.5% w/v) and the blank film (QBR). A: QBR; B: QMFM 0,5%; C: QMFM 1%; D: QMFM 2,5%.

Figure 6. Infrared spectra of extract of *M. frigidus* (MFM), chitosan films containing MFM (QMFM 0.5%-2.5% w/v), and the blank film (QBR).

Figure 7. Tensile analysis of chitosan films containing the extract of *M. frigidus* (QMFM 0.5-2.5% w/v) and the blank film (QBR). A: Tensile strength B: Elongation at break C: Young's modulus a – significant difference compared to QBR. Statistical analysis performed using ANOVA followed by Bonferroni's test ($p < 0.05$).

Figura 8. Weight (A) and thickness (B) of chitosan films containing extract of *M. frigidus* (QMFM 0.5-2.5% w/v) and the blank film (QBR). a – significant difference compared to QBR; b – significant difference compared to QMFM 0.5%; c – significant difference compared to QMFM 1%; d – significant difference compared to Q 2.5%. Statistical analysis performed using ANOVA followed by Bonferroni's test ($p < 0.05$).

Figure 9. Moisture content of chitosan films containing the extract of *M. frigidus* (QMFM 0.5-2.5% w/v) and the blank film (QBR). a – significant difference compared to QBR. Statistical analysis performed using ANOVA followed by Bonferroni's test ($p < 0.05$).

Figure 10. Swelling behavior of chitosan films containing the extract of *M. frigidus* (QMFM 0.5-2.5% w/v) and the blank film (QBR). a – significant difference compared to QBR. Statistical analysis performed using ANOVA followed by Bonferroni's test ($p < 0.05$).

Figure 11. Interrelationship between formulation concentration and Kinetic parameters obtained from the fitting of the Korsmeyer-Peppas model for MFM-loaded hydrogel films.

Figure 12. Percentage of extract released from chitosan films containing the extract of *M. frigidus* (QMFM 0.5-2.5% w/v) and the blank film (QBR).

Figure 13: Viability of J774.A1 peritoneal macrophages (A) and L929 fibroblasts (B) after treatment with chitosan films containing the extract of *M. frigidus* aerial parts (QMFM 0.5–2.5% w/v) and the blank film (QBR). ANOVA followed by the Bonferroni test ($p < 0.05$).

Figure 14. Anti-inflammatory activity of the chitosan films containing the extract of *M. frigidus* (QMFM 1 and 2.5% w/v) and the blank film (QBR). A: NO levels (μM). B: IL-6 production (pg/mL). C: IL-12 production (pg/mL). a – significant difference compared to control; b – significant difference compared to basal; c – significant difference compared to QBR. Statistical analysis performed using ANOVA followed by Bonferroni's test ($p < 0.05$).

Figure 15: Effect of chitosan films containing the extract of *M. frigidus* aerial parts (QMFM 1% and 2.5% w/v) and the blank film (QBR) on cell migration. FA: L929 fibroblasts treated with QMFM 1 and 2.5% w/v, QBR, and control at 0, 24, and 48 hours (scale bar: 200 μm). B: Migration rate of L929 fibroblasts at 24 and 48 hours after scratching. a - Statistical difference from control. ANOVA followed by the Bonferroni test ($p < 0.05$).

Figure 16. Percent inhibition of chitosan polymeric films containing the extract of *M. frigidus* (QMFM 1% and 2.5% w/v) and the blank film (QBR) Against *Candida albicans* strains. A: Resistant *C. albicans* (ATCC® 10231™); B: Sensitive *C. albicans* (ATCC® 24433™); C: *C. albicans* VV1; D: *C. albicans* O2; E: *C. albicans* 1015. a – significant

difference compared to QBR. Statistical analysis performed using ANOVA followed by Bonferroni's test ($p < 0.05$).

Figure 17. Growth kinetics of chitosan polymeric films containing the extract of *M. frigidus* (QMFM 1% and 2.5% w/v) and the blank film (QBR) against *Candida albicans* strains. A1/A2: Resistant *C. albicans* (ATCC® 10231™); B1/B2: Sensitive *C. albicans* (ATCC® 24433™); C1/C2: *C. albicans* VV1; D1/D2: *C. albicans* O2; E1/E2: *C. albicans* 1015. a – significant difference compared to control; b – significant difference compared to QBR. Statistical analysis performed using ANOVA followed by Bonferroni's test ($p < 0.05$).

Figure 18. Biofilm inhibition on adhesion phase by chitosan polymeric films containing the extract of *M. frigidus* (QMFM 1% and 2.5% w/v) and the blank film (QBR) Against *Candida albicans* strains. A: Resistant *C. albicans* (ATCC® 10231™); B: Sensitive *C. albicans* (ATCC® 24433™); C: *C. albicans* VV1; D: *C. albicans* O2; E: *C. albicans* 1015. a – significant difference compared to QBR. Statistical analysis performed using ANOVA followed by Bonferroni's test ($p < 0.05$).

Figure 19. Biofilm inhibition on proliferation phase by chitosan polymeric films containing the extract of *M. frigidus* (QMFM 1% and 2.5% w/v) and the blank film (QBR) Against *Candida albicans* strains. A: Resistant *C. albicans* (ATCC® 10231™); B: Sensitive *C. albicans* (ATCC® 24433™); C: *C. albicans* VV1; D: *C. albicans* O2; E: *C. albicans* 1015. a – significant difference compared to QBR. Statistical analysis performed using ANOVA followed by Bonferroni's test ($p < 0.05$).

Figure 20. Photomicrograph of the vaginal mucosa of rats. A- control group, B- infected group, C- nystatin group, D- chitosan group, E- MFM 1% group, F- MFM 2.5% group. Arrowhead – epithelial vacuolization. Scale bar: 20µm.

Figure S1. UV–Vis absorption spectra of MFM recorded from 200 to 400 nm at concentrations of 0.0015, 0.0030, 0.0040, 0.0070, 0.0090, and 0.0120 mg mL⁻¹.

Figure S2. UV–Vis absorption spectrum of the release medium collected after 24 h from the QBR release assay, recorded over the 200–400 nm wavelength range.

Figure S3. The experimental MFM release profiles and the corresponding mathematical fits using the Higuchi model for hydrogel films at different concentrations are shown below: (A) 0.5%, (B) 1.0%, (C) 2.5%, and (D) 5.0%.

Anexo I

Este anexo apresenta a primeira página do artigo intitulado “*Mitracarpus frigidus: explorando o potencial medicinal e os compostos bioativos de uma fonte natural – um estudo de revisão*”, publicado na Revista Científica FAMINAS (ISN XXXX). O documento foi incluído com a finalidade de comprovar a publicação do manuscrito que compõe o Capítulo 1 desta tese.

Mitracarpus frigidus: explorando o potencial medicinal e os compostos bioativos de uma fonte natural – um estudo de revisão

Mitracarpus frigidus: exploring the medicinal potential and bioactive compounds of a natural source – a review study

Recebido: 25/05/2023

Revisado: 10/07/2023

Aceito: 06/11/2023

Editor de Seção:

Dr Alexandre Horácio Couto
Bittencourt

Afiliação do Editor:

Centro Universitário
FAMINAS e Hospital do
Câncer de Muriaé da
Fundação Cristiano Varella.

Thalita de Freitas SOUZA¹, Thayná Gomes FERREIRA¹, Karollina Chves FERREIRA¹, Laura Moraes de OLIVEIRA¹, Lara de Melo CAMPOS¹, Lucas de Araújo CARVALHO¹, Nubia Bennini ANDRADE¹, Rodrigo Luiz FABRI¹.

(1) Laboratório de Produtos Naturais Bioativos, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora. Juiz de Fora –MG, Brasil.

Autor correspondente:

Rodrigo Luiz Fabri (rodrigo.fabri@ufjf.br)
Laboratório de Produtos Naturais Bioativos,
Departamento de Bioquímica,
Instituto de Ciências Biológicas,
Universidade Federal de Juiz de Fora.
Rua José Lourenço Kelmer, s/n - São Pedro.
CEP 36036-900. Juiz de Fora – MG, Brasil.
Telefone: +55 32 2102 3208 Fax: +55 32 2102 3216

Conflitos de interesses: Os autores deste artigo declaram que não possuem conflito de interesse de ordem financeiro, pessoal, político, acadêmico ou comercial.

Anexo II

O Anexo II apresenta a patente intitulada “Formulação mucoadesiva à base de extrato metanólico de *Mitracarpus frigidus* incorporado a filmes poliméricos de quitosana para uso oral e vulvovaginal, processo de obtenção, composições e usos”. A invenção foi desenvolvida com o objetivo de superar limitações associadas aos tratamentos antifúngicos convencionais, propondo uma formulação inovadora capaz de promover a liberação local e prolongada de compostos bioativos. A tecnologia associa o potencial antifúngico e antibiofilme do extrato de *M. frigidus* às propriedades mucoadesivas da quitosana, representando um dos principais produtos tecnológicos gerados nesta tese e evidenciando a transformação de um recurso natural bioativo em uma plataforma farmacêutica com potencial aplicação no tratamento da candidíase oral e vulvovaginal.



República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102024019532-9 A2

(22) Data do Depósito: 23/09/2024

(43) Data da Publicação Nacional:
31/03/2026

(54) **Título:** BIOCURATIVOS ANTIFÚNGICOS À BASE DE QUITOSANA E EXTRATO DE MITRACARPUS FRIGIDUS PARA TRATAMENTO DE CANDIDÍASE VULVOVAGINAL E OROFARÍNGEA: PROCESSO DE OBTENÇÃO, COMPOSIÇÕES E USOS

(51) **Int. Cl.:** A61K 36/74; A61K 31/722; A61P 15/02; A61P 31/10; A61L 15/12; (...).

(52) **CPC:** A61K 36/74; A61K 31/722; A61P 15/02; A61P 31/10; A61L 15/12; (...).

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA - UFJF.

(72) **Inventor(es):** RODRIGO LUIZ FABRI; THAYNÁ GOMES FERREIRA; THAIS NOGUEIRA BARRADAS; GUILHERME DINIZ TAVARES; ÂNGELO MÁRCIO LEITE DENADAI; JÚLIA BERTOLINI FAJARDO; LARA MELO CAMPOS; MARIANA HAUCK VIANNA; LUIZ FERNANDO CAPPÀ DE OLIVEIRA; NATASHA SILVA MAYRINK; ELAINE SOARES COIMBRA; ARI SÉRGIO DE OLIVEIRA LEMOS; GUSTAVO LUCAS DA SILVA LIMA; MARIANE ROCHA CORDEIRO COMITRE; ANA BARBARA POLO; MATHEUS TORRES BRANCA; IRLEY OLÍVIA MENDONÇA DINIZ.

(57) **Resumo:** BIOCURATIVOS ANTIFÚNGICOS À BASE DE QUITOSANA E EXTRATO DE *Mitracarpus frigidus* PARA TRATAMENTO DE CANDIDÍASE VULVOVAGINAL E OROFARÍNGEA: PROCESSO DE OBTENÇÃO, COMPOSIÇÕES E USOS. A inovação proposta neste contexto refere-se a um método de obtenção, composições e uso de filmes poliméricos de quitosana (biocurativos) utilizando o extrato metanólico das partes aéreas de *Mitracarpus frigidus* (Willd. Ex Reem Schult.) K. Schum. destinado ao uso vaginal e orofaríngeo. Tanto a solução do extrato quanto os produtos finais podem ser empregados como agentes antifúngicos no tratamento de candidíases, especialmente as vulvovaginais e orofaríngeas. A presença da quitosana desempenha um papel crucial na dispersão dos princípios ativos na mistura, induzindo um mecanismo de liberação controlada dos componentes bioativos do extrato. Além disso, proporciona uma maior estabilidade para os compostos bioativos, melhorando a sua biodisponibilidade. O extrato potencializa as propriedades antifúngicas da quitosana, elevando a porcentagem de inibição do crescimento de células fúngicas, queda da curva de crescimento fúngico e aumento do efeito antibiofilme diante de espécies de *Candida*.

Picos	Compostos	MS fragmentos	TR
1	Ácido clorogênico	731.1792 [2M+Na] ⁺ ; 355.1025 [M+H] ⁺ ; 163.0392 [M+H-ácido quínico] ⁺	1.8
2	Clarinósido	523.1801 [M+H] ⁺ ; 361.1257 [M+H-glicose] ⁺ ; 215.0700 [M+H- glicose - rramnose] ⁺	2.4
3	Quercetina-pentosilhexosídeo	597.1445 [M+H] ⁺ ; 465.1017 [M+H-pentose] ⁺ ; 303.0494 [M+H- pentose - glicose] ⁺	3.0
4	Rutina	611.1599 [M+H] ⁺ ; 465.1023 [M+H-ramnose] ⁺ ; 303.0497 [M+H- rramnose - glicose] ⁺	3.9
5	Kaempferol-3O- rutinosídeo	595.1653 [M+H] ⁺ ; 449.1068 [M+H-ramnose] ⁺ ; 287.0548 [M+H- rramnose - glicose] ⁺	4.7
6	Kaempferol- rhamnosilhexosídeo	595.1645 [M+H] ⁺ ; 449.1065 [M+H-rhamnose] ⁺ ; 287.0549 [M+H- rramnose - hexose] ⁺	5.1
7	2-Azamtiquinona	210.0536 [M+H] ⁺	8.8

TR: tempo de retenção (min).

“BIOCURATIVOS ANTIFÚNGICOS À BASE DE QUITOSANA E EXTRATO DE *Mitracarpus frigidus* PARA TRATAMENTO DE CANDIDÍASE VULVOVAGINAL E OROFARÍNGEA: PROCESSO DE OBTENÇÃO, COMPOSIÇÕES E USOS”

CAMPO DE APLICAÇÃO

[001] A invenção descrita neste documento remete-se ao processo de obtenção e caracterização de biocurativos antifúngicos de quitosana incorporado com extrato metanólico das partes aéreas de *Mitracarpus frigidus* (Willd. Ex Reem Schult.) K. Schum, suas composições, formulações e aplicações. Biocurativos são filmes poliméricos com sistemas nanoestruturados, que promovem um sistema de liberação controlada gradual dos compostos ativos encontrados no extrato. Além disso, apresentam boa aderência, flexibilidade e fácil aplicação, prolongando o tempo de contato entre o local de aplicação e o bioativo, aumentando sua eficácia. Com isso, a inovação destina-se a uma aplicação para o tratamento de candidíases, especialmente vulvovaginal e orofaríngea.

ESTADO DA TÉCNICA

[002] *Mitracarpus frigidus* (Willd. Ex Reem Schult.) K. Schum, é uma espécie vegetal pertencente à família *Rubiaceae*, sendo distribuída na América Tropical e Antilhas. No Brasil, é encontrada desde o Amazonas até o Rio Grande do Sul (Pereira et al., Acta Bot. Bras., v. 20, 2006). Não há informações disponíveis sobre o uso popular dessa espécie. No entanto, outras espécies do gênero *Mitracarpus*, são comumente usadas como sedativos e repelentes, além de serem empregadas no tratamento de eczema, dores de dente, infecções microbianas, inflamações, queimaduras e feridas (Ekalu, Elsevier, v.11, 2021).

[003] Estudos anteriores com partes aéreas de *M. frigidus* identificaram predominantemente a presença de compostos fenólicos, triterpenos e alcaloides. Esses compostos estão principalmente

associados à atividade biológica da espécie, incluindo atividades antioxidante, antitumoral, anti-inflamatória, antibacteriana, antifúngica e leishmanicida (Fabri et al., Bioresou. Technol., v.100, 2009).

[004] O extrato metanólico das partes aéreas de *M. frigidus* (MFM) recebeu a maior parte das investigações. No estado da técnica foram identificados compostos alcaloides, triterpenos, esteroides, saponinas, compostos fenólicos, taninos, flavonoides, antraquinonas, antocianidinas, leucocianidinas, catequinas e flavononas em sua composição, além da identificação de psicorubrina, ácido ursólico, rutina, kaempferol-3-O-rutinosídeo e kaempferol (Ekalu, Elsevier, v.11, 2021; Ferreira, J. Drug Deliv. Sci. Technol, v. 84, 2023).

[005] Dentre as principais atividades biológicas de MFM pode-se destacar seu potencial antimicrobiano. Um estudo realizado com MFM demonstrou que o extrato teve um efeito promissor contra o fungo *Candida albicans* (ATCC® 10231™), resistente a anidulafungina, voriconazol, itraconazol e fluconazol, diminuindo a atividade metabólica das células, bem como sua frequência, densidade e tamanho. O extrato também agiu reduzindo a adesão e proliferação do biofilme de *C. albicans* (ATCC® 10231™) (Campos et al., Ind. Crop. Prod., v. 172, 2021). Estudos *in vivo* também foram descritos no estado da técnica, e MFM foi capaz de reduzir 70% da carga fúngica em ratas wistar fêmeas infectadas com *C. albicans* (ATCC® 10231™) no sexto dia de tratamento. Além disso, a incorporação do extrato a 10%, em uma formulação gelificada de quitosana reduziu em 100% a carga fúngica das ratas infectadas (BR102021009516-4).

[006] O extrato também mostrou atividade anti-inflamatória, descrita após análises *in vitro* e *in vivo*, indicando capacidade de inibição de citocinas inflamatórias, como histaminas, serotonina, prostaglandinas e bradicinina, além de reduzir a migração de leucócitos (Fabri et al., BioMed Res. Int., 2014). Estes achados corroboram a presença de flavonoides e derivados em sua composição, os quais apresentam capacidade de inibir as vias cicloxigenase e lipoxigenase no metabolismo do ácido araquidônico (Campos et al., Ind. Crop. Prod., v. 123, 2018; Ferreira, J. Drug Deliv. Sci. Technol, v. 83, 2023).

[007] A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) regulamenta os medicamentos fitoterápicos e preconiza, por meio da RDC nº 26/2014, que um medicamento fitoterápico é aquele composto tão somente por matérias-primas bioativas de origem vegetal. Portanto, é importante destacar que, apesar da fácil obtenção dos princípios ativos, a regulamentação de fitoterápicos se expõe ao mesmo nível de exigência empregada aos medicamentos alopáticos, assegurando a estabilidade química dos componentes e a interdependência entre a atividade biológica e a composição química do extrato vegetal, preservando a segurança e eficácia da formulação.

[008] Para proteger os compostos ativos de produtos fitoterápicos e assegurar sua estabilidade física, química e biológica, diversas tecnologias têm sido abordadas para o desenvolvimento e aprimoramento destas formulações. Os biocurativos poliméricos, por sua vez, vêm se destacando na área de aplicação oral e vulvovaginal de ativos, apresentando boa flexibilidade e fácil administração, além da possibilidade de incorporação de biomoléculas, agindo como um sistema refinado de entrega (Savencu et al., *React. Funct. Polym.*, v. 168, 2021).

[009] A quitosana é um polissacarídeo obtido a partir da desacetilação da quitina em meio alcalino. Trata-se de um polímero não tóxico, biocompatível, biodegradável e que apresenta atividades anti-inflamatória, analgésica, antifúngica, antimicrobiana e cicatrizante. Além disso, demonstra excelentes propriedades na formação de filmes poliméricos (Laranjeira e Fávere, *Quim. Nov.*, v. 32, 2009; Régis et al., *Rev. Mat.*, v. 25, 2020; Xavier et al., *Rev. Mat.*, v. 25, 2020).

[010] Os filmes desenvolvidos a partir da quitosana representam uma nova classe de biomateriais em ascensão, com diversas aplicações possíveis, incluindo a liberação controlada de substâncias ativas (Laranjeira e Fávere, *Quim. Nov.*, v. 32, 2009). É possível encontrar reivindicações quanto a obtenção de filmes poliméricos destinados a liberação controlada de fármacos, como as patentes BR 10 2017 002388 5 A2, BR 11 2023 006626 3 A2, C1 08038074 F1, BR 10 2019 002370 8 B1 e BR 13 2013 033867 1.

[011] Diversas reivindicações para formulações utilizando extratos/óleos vegetais incorporados ao filme polimérico de quitosana têm sido descritas (CN 107333878, BR 10 2021 026434 9 A2, CN108864495 e CN114946928). Essa associação possui relevância biológica para melhora das atividades antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana. Entretanto, nas principais bases de dados de patentes, nacionais e internacionais (INPI, USPTO, WIPO, Espacenet, Google Patentes) não constam, até a presente data, tecnologias que descrevam ou reivindiquem produtos, processos e/ou uso da espécie *M. frigidus* incorporada a um filme/biocurativo polimérico de quitosana, para as aplicações requeridas nesta invenção.

[012] Utilizando as palavras-chaves “*Mitracarpus*” e “*Mitracarpus frigidus*” na base de dados internacional WIPO (<https://patentscope.wipo.int/search/en/result.jsf>) foram recuperados somente 5 patentes, onde apenas as espécies *Mitracarpus scaber*, *Mitracarpus villosus* e *Mitracarpus verticillatus* foram referidas, mas nenhuma reivindicou qualquer formulação contendo *Mitracarpus frigidus*. Ao utilizar as palavras chave “*Mitracarpus* and chitosan” nenhuma reivindicação foi recuperada.

[013] Utilizando as palavras-chaves “*Mitracarpus*”, “*Mitracarpus frigidus*” e “*Mitracarpus* and chitosan”, na base de dados internacional USPTO (<https://patft.uspto.gov/netahtml/PTO/search-bool.html>), não foram encontrados resultados, o que indica que há poucas patentes relacionadas a formulações com *M. frigidus*, uma espécie nativa mas pouco conhecida popularmente quanto às suas atividades farmacológicas.

[014] Utilizando a base de dados INPI (<https://busca.inpi.gov.br/pePI/servlet/LoginController>) e as palavras-chaves “*Mitracarpus*”, “*Mitracarpus frigidus*” e “quitosana”, foram recuperadas 3 reivindicações, sendo que apenas o documento BR102021009516-4, trata-se de uma formulação utilizando o extrato metanólico das partes aéreas de *M. frigidus* e quitosana, com ação antifúngica. No entanto, tal formulação é referente a um gel nanoestruturado. Nenhuma reivindicação de formulações utilizando

extrato metanólico das partes aéreas de *M. frigidus* incorporado ao biocurativos (=filme polimérico) de quitosana foi recuperada.

[015] A matéria tratada refere-se ao processo de obtenção e caracterização de biocurativos antifúngico (filme polimérico) de quitosana incorporado com o extrato metanólico de *Mitracarpus frigidus* (Willd. Ex Reem Schult.) K. Schum, ainda não descrito e reivindicado no estado da técnica.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[016] A seguinte invenção envolve a realização de duas etapas principais (I e II) para alcançar o produto final.

[017] A primeira fase envolve a obtenção do extrato metanólico das partes aéreas de *M. frigidus*. Nesse processo, 2 kg de material vegetal foram coletados e submetidos a uma secagem em estufa com circulação forçada de ar a 40°C por 48 h, obtendo-se uma massa de 1000 gramas. Após a secagem, as folhas foram transformadas em pó com granulometria de 0,84 mm usando um moinho de facas com malha número 20. Em seguida, realizou-se a extração por maceração estática com metanol (5 X 500 mL) à temperatura ambiente durante 5 dias, com substituição do solvente a cada 48 h. Todas as frações líquidas filtradas foram combinadas para obter o extrato metanólico bruto, que foi concentrado por evaporação em um evaporador rotatório sob pressão reduzida, obtendo-se um rendimento de 10%.

[018] A segunda fase diz respeito à produção de biocurativos de quitosana e sua incorporação com diferentes concentrações do extrato de *M. frigidus*. Utilizando a técnica de evaporação de solvente, os filmes foram obtidos a partir de uma solução precursora composta por uma solução de quitosana a 2% (p/v) em ácido acético 1% (v/v). Essa solução foi agitada à temperatura ambiente por 60 min e, em seguida, incorporou-se glicerina a 7,5% (v/v) para conferir plasticidade à formulação. Após 30 min de agitação, o extrato de *M. frigidus* foi adicionado em diferentes concentrações, com agitação adicional por 5 min. As soluções foram desgaseificadas em banho ultrassônico por 90

min à temperatura ambiente. Por fim, 12 mL de cada solução foram vertidos em placas de vidro de 9 cm de diâmetro e secos a 40 °C em estufa por 18 h.

[019] Para diferenciar os biocurativos formulados, foram denominados como QBR (Quitosana 2% p/v e glicerina 7,5% v/v), QMFM 0,5% (Quitosana 2% p/v, glicerina 7,5% v/v e extrato de *M. frigidus* 0,5% p/v), QMFM 1% (Quitosana 2% p/v, glicerina 7,5% v/v e extrato de *M. frigidus* 1% p/v), QMFM 2,5% (Quitosana 2% p/v, glicerina 7,5% v/v e extrato de *M. frigidus* 2,5% p/v), e QMFM 5% (Quitosana 2% p/v, glicerina 7,5% v/v e extrato de *M. frigidus* 5% p/v). A espessura média dos biocurativos, considerando análise micrométrica, foi de 0,1495 mm.

EXEMPLO 1: Identificação dos constituintes majoritários do extrato das partes aéreas de *Mitracarpus frigidus* por UPLC-MSQ-TOF.

[020] A análise dos componentes do extrato metanólico de *M. frigidus* foi conduzida por cromatografia líquida ultrarrápida acoplada a espectrometria de massa (UFLC-QTOF-MS) no modo positivo [M + H]⁺, com fonte de ionização por eletrospray. Na fase móvel, empregou-se água acidificada com fórmico (fase A, pH = 3) e metanol (fase B), com um fluxo de injeção de 0,4 mL/min e um tempo de corrida de 12 min. A coluna estacionária utilizada foi uma Kinetex 2,6 µm - C18 - 100A, com dimensões de 100 mm x 3,0 mm.

[021] O processo cromatográfico iniciou-se com 40% da fase B aos 0,01 min, aumentando para 70% de B aos 8,20 min e alcançando 95% de B de 8,20 a 9,70 min. Posteriormente, a fase móvel retornou a 40% de B aos 10,20 min, mantendo-se até 11,50 min, e a corrida foi finalizada em 12 min.

[022] A análise do perfil cromatográfico do extrato por UFLC-QTOF-MS, mediante a comparação do perfil de fragmentação de massas com a base de dados da literatura (Figura 1), permitiu a identificação de sete compostos no extrato, a saber: ácido clorogênico,

clarinosídeo, quercetina-3O-pentosilhexosídeo, rutina, kaempferol-3O-rutinosídeo, kaempferol-3Orhamnosilhexosídeo e 2-azaantraquinona (Figura 1).

[023] A maioria dos metabólitos identificados no extrato, apresentam potencial antimicrobiano documentado na literatura técnica (BR102021009516-4). Além disso, estudos prévios correlacionaram as propriedades antifúngicas de *Mitracarpus frigidus*, com a presença dos triterpenoides, tais como ácido ursólico e ursolato de metila, bem como, dos compostos fenólicos identificados por UPLC-MSQ-TOF (Campos et al., Ind. Crop. Prod., v. 172, 2021).

EXEMPLO 2: Estudos reológicos das soluções precursoras

[024] As soluções precursoras dos filmes poliméricos foram caracterizadas por meio de análises reológicas. Deste modo, foi possível avaliar as propriedades coloidais, de fluxo e de deformação das amostras em questão, especialmente no que diz respeito à investigação de possível estrutura de interações intermoleculares ainda na fase líquida, que certamente irá interferir no comportamento dos materiais sólidos.

2.1 Propriedades viscoelásticas utilizando os parâmetros: ângulo de fase (δ), módulo elástico (G') e módulo viscoso (G'')

[025] As propriedades viscoelásticas do material foram avaliadas utilizando os parâmetros como o ângulo de fase (δ), o módulo elástico (G') e o módulo viscoso (G''). O módulo elástico fornece uma medida da solidez do material, enquanto o módulo viscoso representa a capacidade de fluidez. Se os valores de G'' são superiores aos de G' , considera-se que o material tem uma natureza mais fluida do que sólida. E o contrário, se G' é maior que G'' . Uma maneira prática de avaliar se um material se comporta mais como sólido ou fluido é através da razão entre G'' e G' , definida como a tangente do ângulo de fase (δ).

Tan δ classifica as amostras como viscosas ($\tan \delta > 1$, onde $G'' > G'$) ou elásticas ($\tan \delta < 1$, onde $G'' < G'$).

[026] Todas as soluções precursoras apresentaram o módulo viscoso (G'') maior que o módulo elástico (G'), demonstrando um comportamento viscoelástico líquido (Figura 2). Não foi identificada uma tendência de interseção entre os módulos G' e G'' , que representa a faixa de tensão onde ocorre a quebra estrutural do material. Isso se justifica pela baixa estruturação nas formulações mais líquidas, onde esse ponto de interseção não é observado.

[027] Notavelmente, a concentração de 0,5% de MFM (QMFM 0,5%) apresenta comportamento mais líquido em comparação com QBR. Entretanto, para concentrações mais elevadas, observa-se um comportamento mais sólido. Isso sugere que, concentrações mais baixas de extrato resultam em uma desestruturação na matriz polimérica. Enquanto que, concentrações mais elevadas promovem uma reestruturação do polímero. Neste sentido, a concentração de 2,5% de MFM (QMFM 2,5%), é a que mais se assemelha ao polímero sem adição de extrato, inalteradas suas características viscoelásticas iniciais, o que sugere uma melhor interação entre os componentes de MFM e o emaranhado de quitosana. Sendo, neste caso, a concentração ideal de extrato para tal formulação.

2.2 Propriedades viscoelásticas utilizando o parâmetro de viscosidade complexa

[028] A viscosidade complexa foi realizada a fim de avaliar como a formulação responde a uma deformação oscilante ao longo do tempo. Com o objetivo de entender melhor as propriedades de fluxo e deformação das amostras em uma variedade de condições de estresse.

[029] Conforme evidenciado na Figura 3, os valores de η^* diminuem à medida que a frequência de cisalhamento aumenta. Essa variação de viscosidade complexa das amostras, que ocorre em resposta às mudanças na frequência de oscilação aplicada a elas,

indica um comportamento pseudoplástico. Isso sugere que a estrutura de interações entre as moléculas sofre rupturas durante o processo de cisalhamento.

[030] Ademais, foi observado que QMFM 0,5% reduziu a viscosidade complexa da solução precursora inicial. Neste sentido, ao incorporar pequenas concentrações de extrato, este aumenta a fluidez da amostra em relação à solução QBR, sem extrato. Tal efeito ocorre devido a uma desestruturação da matriz polimérica da quitosana quando MFM é adicionado em pequenas quantidades. No entanto, maiores quantidades de extrato promovem interações e sinergias com a matriz polimérica de quitosana, diminuindo a fluidez e proporcionando uma maior estruturação entre os componentes. A concentração de 2,5% de MFM (QMFM 2,5%), é a que mais se assemelha a solução polimérica sem adição de extrato (QBR), sugerindo, mais uma vez, uma melhor interação entre os componentes de MFM e o emaranhado de quitosana.

2.3 Curvas de fluxo e viscosidade em função da taxa de cisalhamento

[031] A partir das curvas de fluxo e viscosidade em função da taxa de cisalhamento, observa-se o comportamento do material em função da aplicação de uma força constante e crescente, indicada pela curva ascendente e após a interrupção da força aplicada, refletida na curva descendente.

[032] Conforme evidenciado na Figura 4, as formulações apresentam um comportamento tixotrópico, indicando que a aplicação de deformação resulta em uma diminuição da viscosidade levando ao aumento do fluxo. Porém, na ausência de cisalhamento e após um período específico, a estrutura se restabelece, e o material retorna à viscosidade inicial.

[033] Ao comparar as soluções precursoras QMFM 5% e QMFM 1% com a solução precursora do biocurativo QBR, observou-se uma redução na tixotropia com a adição de MFM. No entanto, QMFM 2,5%

não apresentaram alterações significativas no comportamento tixotrópico em relação a QBR. A curva ascendente de QMFM 0,5%, por sua vez, apresenta maior viscosidade durante toda a faixa de cisalhamento (Figura 4B), porém, tem um comportamento tixotrópico semelhante ao QBR, já que a área entre a curva ascendente e a curva descendente, apresenta tempo semelhante para o retorno ao fluxo e viscosidade iniciais. Consequentemente, não foi possível estabelecer uma correlação clara entre a concentração de extrato adicionada e a diminuição da tixotropia. Adicionalmente, é possível afirmar que todas as formulações exibem um comportamento reológico característico de materiais não-newtonianos pseudoplásticos (Bertolo, Carbohydr Polym, v. 228, 2020).

2.4 Curva de viscosidade em função da temperatura

[034] Com a curva de viscosidade *versus* temperatura foi possível avaliar as alterações de viscosidade das soluções precursoras em função do aumento da temperatura, que por sua vez, intensifica a difusão das moléculas pelo meio e o rompimento de interações intermoleculares, deixando as amostras mais fluidas e menos viscosas (Cancian, UEPG: Ciências Exatas e da Terra, Agrárias e Engenharias, v. 16, 2010.).

[035] A Figura 5 mostra um aumento da fluidez em todas as soluções precursoras conforme aumentou a temperatura. Além disso, curiosamente, pode-se observar mais uma vez que QMFM 0,5% é menos viscosa que as outras amostras, sugerindo novamente uma desestruturação da quitosana em função da adição de uma pequena quantidade de extrato. Entretanto, no intervalo de temperatura de 20 a 40 °C, que engloba as condições climáticas brasileiras, não foram identificadas alterações significativas no comportamento das formulações. Dessa forma, os resultados indicam que as formulações não apresentam variações acentuadas de viscosidade quando expostas à temperatura ambiente. Esses aspectos são relevantes a serem considerados durante a manipulação, armazenamento e

transporte das formulações (Silva-Weiss, Food Hydrocoll, v. 31, 2013).

EXEMPLO 3: Análise coloidal das soluções precursoras dos biocurativos

3.1 Potencial zeta

[036] O potencial zeta das soluções precursoras dos filmes de quitosana foi analisado a fim de investigar a carga superficial das partículas. As análises foram realizadas utilizando a técnica padrão de velocimetria por laser *doppler* acoplado com “análise de fase por espalhamento de luz. Para isso, as amostras foram inseridas em uma cubeta de polietileno acoplada com eletrodos. O experimento foi realizado considerando um ângulo de espalhamento de luz de 173°. O valor final foi calculado com a média de cinco medidas independentes para cada amostra.

[037] O campo elétrico formado na cubeta permite observar a migração de partículas. A carga elétrica das partículas influencia diretamente a sua frequência oscilatória. Neste sentido, quanto maior a oscilação das partículas, maior é o potencial zeta.

[038] Observa-se (Figura 6) que todas as amostras mantiveram um potencial zeta positivo, possivelmente devido a presença de grupamentos amino derivados da quitosana. Esses valores sofrem pouca ou nenhuma alteração significativa em relação ao biocurativo QBR, sendo possível observar uma redução estatisticamente relevante apenas na concentração de 5%.

3.2 Diâmetro hidrodinâmico médio

[039] O diâmetro hidrodinâmico médio (Dh) é utilizado para caracterizar espécies nanométricas em suspensão, e tem o objetivo de determinar o tamanho médio das partículas presentes nas soluções

precursoras dos biocurativos. Este parâmetro foi avaliado por meio de espalhamento de luz dinâmico (DLS).

[040] Para determinar o diâmetro hidrodinâmico da solução precursora foi utilizado um equipamento que contenha módulo fotométrico de medidas de espalhamento de luz dinâmico (DLS). Em uma temperatura de 25 °C, as amostras foram analisadas em cubeta de polietileno, submetida ao feixe de luz monocromático com uma intensidade de luz espalhada a um ângulo de 90°. Foram realizadas dez medidas independentes com dez contagens cada em cada amostra e o valor final foi calculado com a média das medidas.

[041] Considerando que a quitosana tende a formar emaranhados discretos e contínuos ao interagir com outras substâncias em solução, a incorporação do extrato na solução polimérica resultou em um aumento no tamanho de partículas, que foi proporcional a concentração adicionada de extrato (Figura 7).

EXEMPLO 4: Análise térmica diferencial (DTA) e termogravimétrica (TGA) dos biocurativos

[042] A fim de identificar a estabilidade térmica dos biocurativos, foram realizadas as análises termogravimétrica (TGA) e a termogravimetria derivada (DTG). A TGA é importante na determinação de perda de massa de um material decorrente do aumento da temperatura. A DTG é a derivada da variação de massa em relação a temperatura. Os resultados das análises estão expressos na Figura 8.

[043] A curva de DTG da quitosana em pó, evidenciou dois eventos térmicos importantes em aproximadamente 240°C e 450°C, os quais correspondem a decomposição do polímero. Nestas temperaturas ocorre a degradação do anel pirano e a ruptura das ligações glicosídicas entre a glucosamina e N-acetilglicosamina (Pereira, J Therm Anal, v. 114, 2013). Tais resultados estão de acordo com maior perda de massa exibida nos gráficos de TGA entre 170 e 270 (≈ 10%) e entre 410 e 520°C (≈36%).

[044] A curva TGA de MFM mostrou uma perda de massa complexa e contínua desde o início do aquecimento. Esse comportamento foi atribuído à perda de compostos voláteis. Imediatamente após esta primeira temperatura de decomposição, MFM sofre outra perda de massa até sua calcinação completa a 500°C

[045] Os biocurativos poliméricos apresentaram os primeiros indícios de degradação térmica por volta de 50 a 100°C, os quais podem ser atribuídos a evaporação de solventes residuais e compostos voláteis de MFM.

[046] Todos os biocurativos apresentaram picos bem pronunciados entre 190 e 220°C, referentes a degradação da matriz polimérica da quitosana, no entanto, observa-se maior intensidade deste pico para QBR. Nos gráficos de TGA estas alterações também podem ser visualizadas, correspondendo a intensa perda de massa exibida, porém, essa perda foi menos abrupta para QMFM 5%. Além disso, entre 200 e 400°C, nota-se uma maior estabilidade dos filmes poliméricos incorporados com extrato, em que a perda de massa foi mais gradual, comparada ao filme QBR. Tais resultados sugerem que a adição de extrato ao biocurativo de quitosana, tornou a formulação mais estável.

EXEMPLO 5: Espectroscopia eletrônica vibracional na região do infravermelho dos biocurativos

[047] Com o intuito de analisar possíveis interações intermoleculares entre os componentes do extrato e a quitosana, conduzimos um ensaio de espectroscopia vibracional na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). As formulações foram submetidas à avaliação no modo de refletância total atenuada, com uma média de 64 varreduras consecutivas, resolução de 4 cm⁻¹ e intervalo de onda de 4000 a 400 cm.

[048] O biocurativo de quitosana sem a incorporação do extrato (QBR) exibiu uma banda em 3324 cm⁻¹, que pode ser associada aos grupos N-H e O-H, provenientes da estrutura original da quitosana. Já

o pico observado em 2853 cm^{-1} (CH de aldeído), pode ser atribuído aos grupos CH_2 das piranoses. As demais bandas exibidas no FTIR, nos comprimentos de onda 3273, 2935, 2883, 1644, 1561, 1410, 1108 e 1031 cm^{-1} , podem ser correlacionadas com derivados de amidas, também provenientes da estrutura da quitosana.

[049] Na Figura 9 pode-se observar que, em todas as concentrações de MFM, os picos estão bem sobrepostos em relação ao filme QBR. No entanto, há alterações principalmente na intensidade das bandas, que é visualizada em todos os espectros. Tais resultados sugerem a presença de interações intermoleculares entre o filme de quitosana e o extrato, que podem influenciar no momento de dipolo dos grupos funcionais e das ligações moleculares. Ademais, para QMFM 2,5% estas alterações são mais intensas, sugerindo uma maior interação do extrato com o emaranhado de quitosana nesta concentração intermediária.

EXEMPLO 6: Análise dinâmico mecânica nos modos axial e rotacional dos biocurativos de quitosana

[050] Foram realizados ensaios de tração e de rotação, para uma análise dinâmico mecânica das formulações. No ensaio de tração, os filmes poliméricos foram tracionados em uma velocidade constante de $1000\text{ }\mu\text{m/s}$ até ruptura. Enquanto que, no ensaio de rotação, foi aplicada uma velocidade angular de 1 rad/s . Tais ensaios foram importantes para medir a resistência mecânica dos biocurativos, bem como a sua integridade durante o processo de aplicação.

[051] No ensaio de ruptura axial (Figura 10), é considerada a ruptura por estiramento, já no ensaio de ruptura rotacional (Figura 11), é avaliada a ruptura dos filmes após a torção. Neste sentido, é possível observar nestes dois ensaios, que a força necessária para o rompimento das amostras, quando tracionadas e quando torcidas, não apresentou diferença significativa, ou seja, os biocurativos mantiveram a mesma rigidez, mesmo após a adição de extrato. Esses resultados indicam que as amostras são igualmente resistentes ao ato de estirar

e de torcer, e apresentam uma capacidade de se alongar independente da adição de extrato.

EXEMPLO 7: Microscopia eletrônica de varredura dos biocurativos de quitosana

[052] Para a análise por Microscopia Eletrônica de Varredura, os filmes poliméricos foram cortados em quadrados de 1,0 x 1,0 cm e examinados em sua superfície e borda. Fixados no suporte do equipamento de MEV, os filmes foram inspecionados sob alto vácuo. Esta avaliação é crucial para verificar a uniformidade, identificar bolhas e aglomerados, e avaliar a distribuição dos compostos dentro da matriz do biocurativo.

[053] Na Figura 12, as formulações são observadas em diferentes ampliações, variando de 1000x a 3000x. Nota-se uma superfície homogênea nos emaranhados poliméricos. Especificamente para QBR, não há presença de aglomerados em sua superfície, ao contrário das amostras com extrato incorporado, onde foi observado um aumento progressivo na formação de aglomerados com o aumento da concentração de MFM. Acredita-se que as amostras com extrato incorporado exibem aglomerados devido à formação de precipitados de extrato que não se integraram à matriz polimérica do biocurativo.

[054] Ao analisar a borda das formulações (Figura 13), nota-se achados condizentes com o que foi visto na superfície das formulações. Com QBR apresentando uma borda mais lisa e homogênea, enquanto que os polímeros incorporados com MFM exibem formação de aglomerados proporcionais a concentração de extrato adicionada.

EXEMPLO 8: Estudo do peso médio e espessura dos biocurativos

[055] Os biocurativos foram cortados em quadrados com dimensões de 1,0 x 1,0 cm, e em seguida, foram pesados

individualmente em uma balança analítica. Os resultados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão com base nas amostras.

[056] Para determinar a espessura, um micrômetro digital foi empregado, utilizando 10 amostras dos filmes de quitosana. Estes foram cortados em quadrados de 1,0 x 1,0 cm, e a espessura foi medida em três pontos diferentes de cada um. O valor final foi expresso como média $\pm$ desvio padrão.

[057] Considerando a Figura 14, os biocurativos apresentaram um peso médio de $0,024 \pm 0,008$ para QMFM 5%, $0,023 \pm 0,003$ para QMFM 2,5%, $0,022 \pm 0,003$ para QMFM 1%, $0,018 \pm 0,003$ para QMFM 0,5% e $0,046 \pm 0,010$ para QMFM BR. Considerando a espessura média, QMFM 5% obteve $0,27 \pm 0,046$, QMFM 2,5% apresentou $0,17 \pm 0,052$, para QMFM 1% $0,19 \pm 0,036$, QMFM 0,5%, $0,19 \pm 0,030$ e para QBR, $0,24 \pm 0,045$.

[058] Considerando o peso médio, todas as amostras foram significativamente diferentes em relação a QBR ($p < 0,05$). Tal fato pode ser justificado pela interação entre os componentes do extrato e a quitosana, que levou a uma menor retenção de massa no produto final. Quanto à espessura QMFM 5% foi diferente das demais concentrações de extrato, provavelmente devido a presença de aglomerados, vistos na microscopia de varredura. Sabe-se que o ideal é que biocurativos intravaginais apresentem espessura entre 0,02 e 0,2 mm. Portanto, QMFM 2,5%, QMFM 1% e QMFM 0,5% seriam ideais para esse uso (Cazorla-Luna, R.; Rev. ACS. v. 21, n.6, 2020).

EXEMPLO 9: Estudo das propriedades de umidade dos biocurativos

[059] Utilizando um método gravimétrico, a umidade das formulações de quitosana foi determinada. Os biocurativos foram cortados em quadrados de 1,0 x 1,0 cm e pesados em uma balança analítica. Em seguida, foram colocados em uma estufa a 105 °C por 24 h e, ao final desse período, foram pesados novamente. A umidade foi calculada por meio de uma equação, considerando os pesos inicial e

final dos filmes poliméricos. O resultado final foi expresso em porcentagem e o experimento foi repetido três vezes para garantir a precisão dos resultados.

[060] Conforme a Figura 15, observamos que a porcentagem de umidade dos biocurativos foi entre 10 e 30%, sendo que QMFM0,5% foi significativamente diferente dos demais (QBR, QMFM 1%, QMFM 2,5% e QMFM 5%), obtendo 30% de umidade. Esses valores indicam que durante o processo de formulação permaneceu um nível adequado de umidade para manter a integridade das formulações, além do mais, a quitosana tem propriedade higroscópica, o que influencia na retenção de água das formulações. Altos valores de umidade estão relacionados com a natureza hidrofílica da quitosana e as fortes ligações entre H₂O e grupos funcionais. Neste sentido, a concentração de 0,5% possivelmente levou a uma quebra da matriz polimérica, levando a uma maior disponibilidade dos grupos funcionais da quitosana, e consequentemente um aumento da higroscopicidade.

EXEMPLO 10: Estudos do grau de solubilidade dos biocurativos

[061] Os filmes poliméricos foram cortados em quadrados de 1,0 x 1,0 cm, pesados em uma balança analítica e imersos por 8 h a 32 °C em um fluido simulador de mucosa.

[062] Após a imersão, as formulações foram retiradas da solução com uma pinça e deixados em uma estufa de secagem por mais 24 h. Após esse período, elas foram pesados novamente para determinar o grau de solubilidade. Os resultados foram expressos em porcentagem com base em uma equação, e o experimento foi repetido três vezes para garantir a precisão dos resultados.

[063] Considerando a Figura 16, QBR apresentou um teor de solubilidade de 100%, pois ao permanecer por 8h em fluido simulador de mucosa, QBR se dissolveu por completo. Esse resultado é esperado, considerando que a quitosana é um polímero biodegradável. QMFM 0,5%; QMFM 1%; QMFM 2,5% e QMFM 5%, por sua vez,

obtiveram entre 78 e 88% de solubilidade, sem diferença estatística significativa entre eles ($p>0,05$). Esses resultados apresentados sugerem que a interação dos componentes do extrato com a quitosana dificultou a sua dissolução completa no meio.

EXEMPLO 11: Determinação da liberação *in vitro* do extrato de *Mitracarpus frigidus* pelos biocurativos de quitosana

[064] Utilizando um tubo, os biocurativos foram aderidos em sua abertura, de maneira que permaneceram, unidirecionalmente, em contato com tampão PBS durante 8h (sistema adequado comparativamente com as regiões orofaríngea e intravaginal). O volume de fluido para as diferentes concentrações de QMFM foi previamente calculado para que o teste de liberação fosse conduzido sob condição *sink*, ou seja, no mínimo 3 vezes o volume de meio necessário para se obter solução saturada de ativo (Anvisa. Guia de Dissolução Aplicável a Medicamentos Genéricos, Novos e Similares. Guia nº 14/2018, de 29 de outubro de 2021). A cada coleta foram retirados 250 µL do fluido e o mesmo volume era repostado no béquer. Na primeira hora foram retiradas alíquotas de 20 em 20 min, na segunda hora de 30 em 30 min e nas próximas horas de 60 em 60 min. Após todas as coletas, todas as alíquotas foram avaliadas no espectrofotômetro considerando uma faixa de espectro de 200 a 400 nm para visualização dos compostos que possivelmente foram liberados.

[065] Para critérios comparativos, realizou-se uma leitura no espectrofotômetro com MFM, a fim de determinar o seu pico de maior absorção, bem como para a construção de uma curva analítica. No espectro de 235 nm, espera-se a detecção de compostos fenólicos. Sabe-se que MFM é rico nesses compostos, o que justifica a presença de maior pico de absorção neste comprimento de onda. Desta forma esse espectro foi fixado para a construção de uma equação da reta para tratamento dos dados do estudo de liberação (Menezes Filho, Rev. Arq. Cient., v.3, 2020).

[066] Podemos observar, a partir da Figura 17, que em todas as formulações aconteceu uma liberação de forma gradual, atingindo 100% de extrato liberado no fluido. Após os primeiros 60 min, acontece um “platô” na liberação e o sistema passa a liberar a mesma porcentagem de extrato, fato esse esperado por esse tipo de formulação. Além disso, QBR não apresenta concentrações significativas de liberação, sugerindo que os valores apresentados nas demais formulações são atribuíveis a presença do extrato.

EXEMPLO 12: Determinação citotoxicidade *in vitro* dos biocurativos

[067] A avaliação da viabilidade celular desempenha um papel crucial na compreensão das vias relacionadas à sobrevivência ou morte celular após a exposição a substâncias tóxicas. Os ensaios de citotoxicidade celular são comumente empregados na triagem de medicamentos para determinar se as moléculas em teste afetam a proliferação celular ou exibem citotoxicidade direta. Esse processo contribui para a identificação de novos medicamentos com elevada segurança e eficácia (Nascimento, J. Food Nutr. v. 21, 2010).

12.1 Determinação da citotoxicidade em macrófagos

[068] Macrófagos da cavidade peritoneal obtidos a partir de camundongos BALB/c foram cultivados em meio RPMI-1640 suplementado com 2Mm de L-glutamina, 5% de SFB e solução de antibióticos [Penicilina (100 µg /mL) e Estreptomicina (100 µg/mL)]. O protocolo para utilização de linhagens de macrófagos peritoneais foi aprovado pelo Comitê de Ética para a Investigação Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora (nº 007/2018-CEUA).

[069] A viabilidade celular na presença de QBR e QMFM foi determinada usando o ensaio MTT (MOSMANN, J. Immunol. Methods. v.65, 1983). As células (1×10^4 células/poço) foram semeadas em microplacas de 96 poços e incubadas durante 24 h antes de serem

tratadas. Os grupos foram tratados com QBR, QMFM 5%, QMFM 2,5%, QMFM 1% e QMFM 0,5% a 37 °C por 44 h. Em seguida, foi adicionada solução de MTT (5 mg/mL em meio isento de soro, 20 µL/poço) em cada poço e seguida de incubação por 4 h. Finalmente, a solução de MTT foi removida e os cristais formados por redução de MTT foram solubilizados em 200 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). As leituras da solução aconteceram a 595 nm em espectrofotômetro. Os valores foram calculados em comparação com as células controle.

[070] Os resultados do ensaio de MTT revelaram (Figura 18) que os biocurativos mantiveram valores de viabilidade celular superiores a 70% em todas as concentrações testadas. Portanto, não foram observados efeitos tóxicos para a linhagem celular utilizada, indicando uma segurança inicial para o contato com células de mamíferos.

12.2. Determinação da viabilidade celular em fibroblastos

[071] Fibroblastos L929 (ATCC®CCL-1 NCTC) foram cultivados em meio DMEM suplementados com 10% de Soro Fetal Bovino e 1% da solução dos antibióticos [Penicilina (100 µg /mL) e Estreptomicina (100 µg/mL)].

[072] A viabilidade celular na presença de QBR e QMFM foi determinada usando o ensaio MTT (MOSMANN, J. Immunol. Methods. v.65, 1983). As células (1×10^4 células/poço) foram semeadas em microplacas de 96 poços e incubadas durante 24 h antes de serem tratadas. Os grupos foram tratados com QBR, QMFM 5%, QMFM 2,5%, QMFM 1% e QMFM 0,5% a 37 °C por 44 h. Em seguida, foi adicionada solução de MTT (5 mg/mL em meio isento de soro, 20 µL/poço) em cada poço e seguida de incubação por 4 h. Finalmente, a solução de MTT foi removida e os cristais formados por redução de MTT foram solubilizados em 200 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). As leituras da solução aconteceram a 595 nm em espectrofotômetro. Os valores foram calculados em comparação com as células controle.

[073] Os resultados do ensaio de MTT revelaram (Figura 19) que os biocurativos mantiveram valores de viabilidade celular superiores a

70% em todas as concentrações testadas, exceto na maior concentração de MFM (QMFM 5%). Portanto, não foram observados efeitos tóxicos em quase todos os filmes para a linhagem celular utilizada, indicando uma segurança inicial para o contato com fibroblastos.

EXEMPLO 13: Avaliação da atividade antimicrobiana dos biocurativos

[074] Considerando que a formulação QMFM 0,5% demonstrou instabilidade reológica e físico-química e a formulação QMFM 5% apresentou citotoxicidade para fibroblastos, os demais testes biológicos, específicos para linhagens de *Candida albicans*, foram realizados apenas com QBR, QMFM 1% e QMFM 2,5%.

[075] A atividade antimicrobiana as formulações poliméricas foi avaliada frente a quatro linhagens do gênero *Candida*, sendo duas linhagens padronizadas (uma sensível aos antifúngicos convencionais (ATCC® 24433™), e uma *Candida albicans* resistente a anidulafungina, voriconazol, itraconazol e fluconazol (ATCC® 10231™) e três linhagens clínicas (uma isolada da região vulvovaginal (*C. albicans* vv1 - Vaginal), uma isolada da região orofaríngea (*C. albicans* Oral) e uma isolada de paciente com COVID-19 grave, portador de ARS (*C. albicans* 1015). Para isso, foram utilizados biocurativos no tamanho de 3mm².

[076] Foram preparados inóculos com as suspensões dos microrganismos até a obtenção de uma densidade óptica compatível com a escala de Mac Farland 0,5 – 10⁶ UFC/mL (densidade ótica entre 0,8-1,0 a 625 nm). A partir destas concentrações, diluições foram realizadas até 10³ UFC/mL. Em uma microplaca de 96 poços, foram adicionados os biocurativos, 180 µL de caldo RPMI e 20 µL dos inóculos. As placas permaneceram incubadas por 24 h, à 35 °C. Todo o experimento foi realizado em triplicata.

[077] Após as 24 h de incubação, 150 uL de cada poço foi transferido para uma nova placa e procedeu-se a leitura em espectrofotômetro a 600 nm para determinação da porcentagem de

inibição (Balkrishna, A., PLoS Negl Trop Dis. v. 16, 2022) O cálculo da porcentagem foi feito com base no controle de crescimento e da absorbância apresentada pelos poços tratados com os biocurativos.

[078] QMFM 1% e QMFM 2,5% e QBR, inibiram o crescimento das linhagens testadas. Neste sentido a determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM) foi realizada. QMFM 1% e QMFM 2,5% apresentaram efeito fungicida para todas as linhagens testadas. QBR, por sua vez, foi fungicida para as linhagens *C. albicans* sensível (ATCC® 24433™), *C. albicans* oral e *C. albicans* vv1, e fungistático para a *C. albicans* resistente (ATCC® 10231™) e para a *C. albicans* 1015. Tais resultados demonstram uma atividade antifúngica promissora para todas as amostras testadas (Figura 20), além disso, a incorporação do extrato de *Mitracarpus frigidus*, potencializou a atividade do polímero de quitosana para as linhagens *C. albicans* ATCC® 10231™ e *C. albicans* 1015 passando o efeito fungistático para fungicida.

[079] A Figura 21 mostra que os biocurativos apresentaram uma significativa porcentagem de inibição para todas as linhagens de *C. albicans* testadas. Diante de *C. albicans* ATCC® 10231, *C. albicans* 1015 e *C. albicans* vv1, todos os filmes foram capazes de inibir cerca de 100% do crescimento fúngico, exceto QBR, que inibiu entre 50 a 70%, demonstrando uma diferença significativa de inibição do crescimento dos filmes com MFM em comparação ao filme sem MFM ($p < 0,05$). Para as demais linhagens não houve diferença entre os filmes. Esses resultados confirmam os achados do ensaio de CFM, onde QBR mostrou-se fungistático, enquanto os biocurativos de quitosana com MFM foram fungicidas em todas as concentrações para esta linhagem de *C. albicans*. É sabido que os compostos fenólicos possuem uma atividade antimicrobiana significativa, justificando assim o efeito potencializado das formulações incorporadas com MFM. A quitosana por si só apresenta um efeito antimicrobiano conhecido, o que justifica esse efeito dos filmes sem adição de extrato.

EXEMPLO 14: Curva de morte de linhagens de *C. albicans*

[080] As células recém-cultivadas foram inoculadas em placas de 96 poços com QMFM 1%; QMFM 2,5% e QBR e incubadas por 72h. A leitura foi realizada a 600 nm em um espectrofotômetro nos tempos 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 36, 48 e 72 h (Pinto, N de C, C., Ind. Crops Prod, v.107, 2017). Um gráfico foi traçado com base nas variações da turbidez ao longo das horas de incubação. Esta taxa de crescimento obtida foi estudada para quaisquer sinais de efeitos fúngicos das formulações. Além disso, foi realizado a análise da área sob a curva das três réplicas de cada filme testado.

[081] Como observado na Figura 22, de modo geral, as linhagens de *C. albicans* apresentaram diminuição da curva de crescimento quando exposta aos filmes contendo MFM. QMFM 1% e QMFM 2,5% tiveram uma redução nas áreas sob a curva em todas as linhagens testadas em comparação ao controle ($p < 0,05$). Já em comparação a QBR, QMFM 1% e QMFM 2,5% apresentaram uma redução estatisticamente diferente para todas as linhagens testadas, exceto para *C. albicans* ATCC 24403.

EXEMPLO 15: Atividade antibiofilme formados por linhagens de *C. albicans*

[082] Este método teve como objetivo avaliar o impacto da exposição as formulações poliméricas na perturbação de biofilmes pré-formados, visando reduzir sua adesão, considerando o processo de formação e dispersão de biofilmes.

[083] Linhagens de *C. albicans* foram cultivadas como biofilmes usando caldo RPMI suplementado com 1% de glicose em microplacas (96 poços) durante um período de 24 h a 35 °C. Após o crescimento, células planctônicas foram removidas cuidadosamente, os poços foram lavados com água estéril três vezes e preenchidos com 200 µL de diluições dos tratamentos (QBR, QMFM 1% e QMFM 2,5%). As placas de 96 poços foram então incubadas em uma estufa bacteriológica por 24 h a 35 °C. Decorrido o prazo de incubação, as placas foram lidas a

600 nm usando um espectrofotômetro (Nostro, A, Med. Microb. v. 56, 2007).

[084] Inicialmente, 100 µL de suspensões celulares de *C. albicans* (2×10^5 UFC/mL) foram adicionados em microplacas, seguidos pela adição de QBR, QMFM 1% e QMFM 2,5%, e incubados por 24 h. Após esse período, as suspensões líquidas foram removidas e os poços foram lavados com 200 µL de água destilada estéril para remover células não aderentes. A biomassa dos biofilmes foi quantificada por medição da densidade óptica a 570 nm (Plyuta, V., APMIS v. 121, 2013)

[085] QMFM 2,5%, QMFM 1% e QBR, mostraram uma porcentagem de redução de aproximadamente 100% na fase de proliferação dos biofilmes para as linhagens testadas sem diferença significativa entre si ($p > 0,5$), exceto para QMFM 1% diante de *C. albicans* Vaginal e QMFM 2,5% e QMFM 1% diante de *C. albicans* Oral ($p < 0,05$) (Figura 23). Da mesma forma, na fase de adesão dos biofilmes, as amostras resultaram em uma porcentagem de redução em torno de 80 a 100%, sem diferença significativa, exceto para QMFM 2,5% para as linhagens *C. albicans* ATCC 24433, *C. albicans* Vaginal e *C. albicans* Oral ($p > 0,5$) (Figura 24).

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[086] **Figura 1:** Dados de MS no modo (+)ESI e os resultados da identificação dos compostos bioativos no extrato metanólico de *Mitracarpus frigidus*.

[087] **Figura 2:** Varredura de amplitude no ensaio oscilatório avaliando os parâmetros reológicos da solução precursora dos biocurativos poliméricos.

[088] **Figura 3:** Viscosidade complexa em relação a frequência aplicada no ensaio oscilatório dos parâmetros reológicos da solução precursora dos biocurativos poliméricos.

[089] **Figura 4:** Curva de fluxo e de viscosidade avaliados no ensaio rotacional dos parâmetros reológicos da solução precursora dos biocurativos poliméricos.

[090] **Figura 5:** Curva de viscosidade versus temperatura das soluções precursoras dos biocurativos, de 10 a 50°C.

[091] **Figura 6:** Valores potencial zeta da solução precursora dos biocurativos poliméricos. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA, seguido do teste de Bonferroni ($p < 0,05$), onde a= diferença significativa em relação à QMFM 5%, c= diferença significativa em relação à QMFM 1%.

[092] **Figura 7:** Valores de diâmetro hidrodinâmico médio da solução precursora dos biocurativos poliméricos. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA, seguido do teste de Bonferroni ($p < 0,05$), onde a= diferença significativa em relação à QMFM 5%, b= diferença significativa em relação à QMFM 2,5%, c= diferença significativa em relação à QMFM 1%, d= diferença significativa em relação à QMFM 0,5%.

[093] **Figura 8:** Análise térmica do extrato metanólico de *Mitracarpus frigidus* e dos biocurativos poliméricos. Legenda: Figura A: considerando a curva de TGA; Figura B: considerando a curva de DTA.

[094] **Figura 9:** Espectros de infravermelho do extrato metanólico de *Mitracarpus frigidus* e dos biocurativos poliméricos.

[095] **Figura 10:** Análise reológica de ruptura axial dos biocurativos poliméricos (força tangencial). Análise estatística realizada pelo teste ANOVA, seguido do teste de Bonferroni ($p < 0,05$).

[096] **Figura 11:** A. Análise reológica de ruptura axial dos biocurativos poliméricos (força axial). B. Análise reológica de ângulo de ruptura axial dos biocurativos poliméricos. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA, seguido do teste de Bonferroni ($p < 0,05$) onde a= diferença significativa em relação à QBR.

[097] **Figura 12:** Microscopia eletrônica de varredura dos biocurativos de quitosana incorporados à MFM nas diferentes concentrações, considerando um aumento de 1000x e 3000x. Legenda: a) QBR; b) QMFM 0,5%; c) QMFM 1%; d) QMFM 2,5%; e) QMFM 5%.

[098] **Figura 13:** Microscopia eletrônica de varredura transversal dos biocurativos de quitosana incorporados à MFM nas diferentes

concentrações. Legenda: a) QBR; b) QMFM 0,5%; c) QMFM 1%; d) QMFM 2,5%; e) QMFM 5%.

[099] **Figura 14:** Peso médio e espessura dos biocurativos de quitosana incorporados com diferentes concentrações de MFM. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA, seguido do teste de Bonferroni ($p < 0,05$), onde a= diferença significativa em relação à QBR; b= diferença significativa em relação à QMFM 0,5%; c= diferença significativa em relação à QMFM 1% e d= diferença significativa em relação à QMFM 2,5%.

[100] **Figura 15:** Porcentagem de umidade dos biocurativos de quitosana incorporados com diferentes concentrações de EEPC. Análise estatística realizada por ANOVA, seguido do teste de Bonferroni ($p < 0,05$). Onde: b= diferença significativa em relação a QMFM 0,5%.

[101] **Figura 16:** Porcentagem de intumescimento dos biocurativos de quitosana incorporados com diferentes concentrações de EEPC. Análise estatística realizada por ANOVA, seguido do teste de Bonferroni ($p < 0,05$). Onde: a= diferença significativa em relação a QBR.

[102] **Figura 17:** Porcentagem de extrato liberado dos biocurativos de quitosana com extrato das partes aéreas de *M. frigidus*, considerando $\lambda=235$ nm.

[103] **Figura 18:** Avaliação da citotoxicidade dos biocurativos poliméricos em macrófagos de camundongos BALB/c. Legenda: Controle= células tratadas apenas com DMSO. Os experimentos foram realizados em triplicata e os dados representam a média $\pm$ DP

[104] **Figura 19:** Avaliação da citotoxicidade dos biocurativos poliméricos em Fibroblastos L929 (ATCC®CCL-1 NCTC). Legenda: Controle= células tratadas apenas com DMSO. a- diferença estatística em relação ao controle. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA seguido de Bonferroni ($p < 0,05$). Os experimentos foram realizados em triplicata e os dados representam a média $\pm$ DP.

[105] **Figura 20:** Efeito fungicida / fungistático dos biocurativos poliméricos em diferentes concentrações frente às linhagens do gênero

Candida: *C. albicans* sensível (ATCC® 24433™), *C. albicans* resistente (ATCC® 10231™), *C. albicans* vv1, *C. albicans* Oral e *C. albicans* 1015. Os experimentos foram realizados em triplicata.

[106] **Figura 21:** Porcentagem de inibição dos biocurativos poliméricos em diferentes concentrações frente às linhagens do gênero *Candida*: *C. albicans* resistente (ATCC® 10231™); *C. albicans* sensível (ATCC® 24433™); *C. albicans* vv1, *C. albicans* Oral e *C. albicans* 1015. a- diferença estatística em relação a QBR. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA seguido de Bonferroni ($p < 0,05$). Os experimentos foram realizados em triplicata e os dados representam a média $\pm$ DP.

[106] **Figura 22:** Curva de crescimento fúngico em contato com os biocurativos poliméricos em diferentes concentrações das linhagens do gênero *Candida*: *C. albicans* resistente (ATCC® 10231™); *C. albicans* sensível (ATCC® 24433™); *C. albicans* vv1, *C. albicans* Oral e *C. albicans* 1015. Em destaque está a área sob a curva das triplicatas de cada tratamento. a- diferença estatística em relação ao controle. b- diferença estatística em relação a QBR. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA seguido de Bonferroni ($p < 0,05$). Os experimentos foram realizados em triplicata e os dados representam a média $\pm$ DP

[107] **Figura 23:** Efeito dos biocurativos poliméricos (QBR; QMFM1% e QMFM2,5%) sobre as etapas de proliferação de biofilmes formados pelas linhagens do gênero *Candida*: *C. albicans* resistente (ATCC® 10231™); *C. albicans* sensível (ATCC® 24433™); *C. albicans* vv1, *C. albicans* Oral e *C. albicans*. a- diferença estatística em relação a QBR. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA seguido de Bonferroni ($p < 0,05$). Os experimentos foram realizados em triplicata e os dados representam a média $\pm$ DP.

[108] **Figura 24:** Efeito dos biocurativos poliméricos (QBR; QMFM1% e QMFM2,5%) sobre as etapas de adesão de biofilmes formados pelas linhagens do gênero *Candida*: *C. albicans* resistente (ATCC® 10231™); *C. albicans* sensível (ATCC® 24433™); *C. albicans* vv1, *C. albicans* Oral e *C. albicans*. a- diferença estatística em relação a QBR. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA seguido de

Bonferroni ($p < 0,05$). Os experimentos foram realizados em triplicata e os dados representam a média $\pm$ DP.

REIVINDICAÇÕES

1. BIOCURATIVOS ANTIFÚNGICOS À BASE DE QUITOSANA E *Mitracarpus frigidus* PARA TRATAMENTO DE CANDIDÍASE VULVOVAGINAL E OROFARÍNGEA **caracterizada por** compreender: a) filme polimérico de quitosana incorporado com extrato metanólico de *Mitracarpus frigidus*; b) concentração de extrato metanólico na faixa de na proporção de 0,5%, 1%, 2,5% e 5% p/p; c) concentração de quitosana na faixa de 2%.
2. BIOCURATIVOS ANTIFÚNGICOS À BASE DE QUITOSANA E *Mitracarpus frigidus* PARA TRATAMENTO DE CANDIDÍASE VULVOVAGINAL E OROFARÍNGEA, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada por** apresentar extrato metanólico de *Mitracarpus frigidus* obtido a partir das partes aéreas da planta.
3. BIOCURATIVOS ANTIFÚNGICOS À BASE DE QUITOSANA E *Mitracarpus frigidus* PARA TRATAMENTO DE CANDIDÍASE VULVOVAGINAL E OROFARÍNGEA, de acordo com as reivindicações 1-2, **caracterizada por** compreender: a) obtenção do extrato metanólico de *Mitracarpus frigidus* pelo método de maceração estática e de rotaevaporação do solvente.
4. BIOCURATIVOS ANTIFÚNGICOS À BASE DE QUITOSANA E *Mitracarpus frigidus* PARA TRATAMENTO DE CANDIDÍASE VULVOVAGINAL E OROFARÍNGEA, de acordo com a reivindicação 1-3 **caracterizada por** compreender: 2 kg de material vegetal coletados e submetidos a uma secagem em estufa com circulação forçada de ar a 40°C por 48 h, seguido de

trituração em pó com granulometria de 0,84 mm usando um moinho de facas com malha MESH 20, com extração por maceração estática com metanol (5 X 500 mL) à temperatura ambiente durante 5 dias, com substituição do solvente a cada 48 h, obtendo-se um rendimento de 10%.

5. BIOCURATIVOS ANTIFÚNGICOS À BASE DE QUITOSANA E *Mitracarpus frigidus* PARA TRATAMENTO DE CANDIDÍASE VULVOVAGINAL E OROFARÍNGEA de acordo com a reivindicação 1-2, **caracterizada pela** mistura de quitosana a 2% p/v, 100 mL de ácido acético a 1% v/v, glicerina a 7,5% v/v e 0,5% ou 1% ou 2,5% ou 5% de extrato de *Mitracarpus frigidus*.
6. BIOCURATIVOS ANTIFÚNGICOS À BASE DE QUITOSANA E *Mitracarpus frigidus* PARA TRATAMENTO DE CANDIDÍASE VULVOVAGINAL E OROFARÍNGEA, de acordo com as reivindicações 1-5, **caracterizada pela** solubilização de quitosana a 2% (p/v) em ácido acético 1% (v/v); agitação a temperatura ambiente por 60 minutos e, em seguida, incorporação de glicerina a 7,5% (v/v); agitação por mais 30 minutos; adição do extrato de *Mitracarpus frigidus* nas concentrações de 0,5%, 1%, 2,5% e 5%, e agitação adicional por 5 minutos; desgaseificação das soluções em banho ultrassônico por 90 minutos a temperatura ambiente; adição das soluções em placas de Petri de 9 cm de diâmetro e secagem a 40 °C em estufa por 18 horas.
7. BIOCURATIVOS ANTIFÚNGICOS À BASE DE QUITOSANA E *Mitracarpus frigidus* PARA TRATAMENTO DE CANDIDÍASE VULVOVAGINAL E OROFARÍNGEA, de acordo com a

reivindicação 1-6, **caracterizada pela** quitosana e componentes do extrato se encontrarem na forma de um filme polimérico previamente preparada.

8. BIOCURATIVOS ANTIFÚNGICOS À BASE DE QUITOSANA E *Mitracarpus frigidus* PARA TRATAMENTO DE CANDIDÍASE VULVOVAGINAL E OROFARÍNGEA, de acordo com as reivindicações 1-7, **caracterizada por:** a) solução precursora apresentar comportamento não-newtoniano do tipo pseudoplástico; b) pelo fato de que a adição do extrato nas concentrações de 0,5% reduziu a viscosidade da formulação, 2,5% manteve a viscosidade da formulação, enquanto que as concentrações de 1% e 5% aumentaram essa viscosidade. Isto sugere maior compatibilidade da concentração intermediária de extrato (2,5%) com a formulação de quitosana.
9. BIOCURATIVOS ANTIFÚNGICOS À BASE DE QUITOSANA E *Mitracarpus frigidus* PARA TRATAMENTO DE CANDIDÍASE VULVOVAGINAL E OROFARÍNGEA, de acordo com as reivindicações 1-8, **caracterizada por** filmes poliméricos de quitosana incorporado com extrato.
10. BIOCURATIVOS ANTIFÚNGICOS À BASE DE QUITOSANA E *Mitracarpus frigidus* PARA TRATAMENTO DE CANDIDÍASE VULVOVAGINAL E OROFARÍNGEA, de acordo com as reivindicações 1-9, **caracterizada por** filmes poliméricos de quitosana incorporado com extrato.

11. BIOCURATIVOS ANTIFÚNGICOS À BASE DE QUITOSANA E *Mitracarpus frigidus* PARA TRATAMENTO DE CANDIDÍASE VULVOVAGINAL E OROFARÍNGEA, de acordo com as reivindicações 1-10, **caracterizada por** filmes poliméricos de quitosana incorporado com extrato apresentarem maior estabilidade térmica se comparado ao filme de quitosana (QBR).
12. BIOCURATIVOS ANTIFÚNGICOS À BASE DE QUITOSANA E *Mitracarpus frigidus* PARA TRATAMENTO DE CANDIDÍASE VULVOVAGINAL E OROFARÍNGEA, de acordo com as reivindicações 1-11, **caracterizados pelo** filme polimérico de quitosana atuar como dispositivo de liberação controlada dos componentes do extrato.
13. BIOCURATIVOS ANTIFÚNGICOS À BASE DE QUITOSANA E *Mitracarpus frigidus* PARA TRATAMENTO DE CANDIDÍASE VULVOVAGINAL E OROFARÍNGEA, de acordo com a reivindicação 12, **caracterizados por compreender** no contato unilateral dos biocurativos com tampão PBS durante 8h; o volume de fluido para as diferentes concentrações de QMFM foi previamente calculado sob condição *sink*; as coletas de 250 µL do fluido, na primeira hora de 20 em 20 min, na segunda hora de 30 em 30 min e nas próximas horas de 60 em 60 min, foram avaliadas no espectrofotômetro considerando uma faixa de espectro de 200 a 400 nm.
14. BIOCURATIVOS ANTIFÚNGICOS À BASE DE QUITOSANA E *Mitracarpus frigidus* PARA TRATAMENTO DE CANDIDÍASE VULVOVAGINAL E OROFARÍNGEA, formulada de acordo com

as reivindicações 1-13, **caracterizada por** não apresentar citotoxicidade nas concentrações de 2,5%; 1% e 0,5%.

15. BIOCURATIVOS ANTIFÚNGICOS À BASE DE QUITOSANA E *Mitracarpus frigidus* PARA TRATAMENTO DE CANDIDÍASE VULVOVAGINAL E OROFARÍNGEA, formulada de acordo com as reivindicações 1-14, **caracterizada por** apresentar atividade antimicrobiana contra *Candida albicans*.

16. BIOCURATIVOS ANTIFÚNGICOS À BASE DE QUITOSANA E *Mitracarpus frigidus* PARA TRATAMENTO DE CANDIDÍASE VULVOVAGINAL E OROFARÍNGEA, de acordo com a reivindicação 15, **caracterizada pela** incorporação de extrato metanólico de *Mitracarpus frigidus* melhorar a atividade antifúngica do polímero de quitosana.

17. BIOCURATIVOS ANTIFÚNGICOS À BASE DE QUITOSANA E *Mitracarpus frigidus* PARA TRATAMENTO DE CANDIDÍASE VULVOVAGINAL E OROFARÍNGEA, de acordo com a reivindicação 15, **caracterizada pela** inibição de 100% do crescimento microbiano de *Candida albicans*.

18. BIOCURATIVOS ANTIFÚNGICOS À BASE DE QUITOSANA E *Mitracarpus frigidus* PARA TRATAMENTO DE CANDIDÍASE VULVOVAGINAL E OROFARÍNGEA, de acordo com a reivindicação 15, **caracterizada por** reduzir a curva de crescimento microbiano de *Candida albicans*.

19. BIOCURATIVOS ANTIFÚNGICOS À BASE DE QUITOSANA E *Mitracarpus frigidus* PARA TRATAMENTO DE CANDIDÍASE VULVOVAGINAL E OROFARÍNGEA, de acordo com a reivindicação 15, **caracterizada por** reduzir a formação de biofilme microbiano por *Candida albicans*.

FIGURAS

Figura 1.

Picos	Compostos	MS fragmentos	TR
1	Ácido clorogênico	731.1792 [2M+Na] ⁺ ; 355.1025 [M+H] ⁺ ; 163.0392 [M+H-ácido quínico] ⁺	1.8
2	Clarinosídeo	523.1801 [M+H] ⁺ ; 361.1257 [M+H-glicose] ⁺ ; 215.0700 [M+H- glicose - ramnose] ⁺	2.4
3	Quercetina-pentosilhexosideo	597.1445 [M+H] ⁺ ; 465.1017 [M+H-pentose] ⁺ ; 303.0494 [M+H- pentose - glicose] ⁺	3.0
4	Rutina	611.1599 [M+H] ⁺ ; 465.1023 [M+H-ramnose] ⁺ ; 303.0497 [M+H- ramnose - glucose] ⁺	3.9
5	Kaempferol-3O- rutinosideo	595.1653 [M+H] ⁺ ; 449.1068 [M+H-ramnose] ⁺ ; 287.0548 [M+H- ramnose - glicose] ⁺	4.7
6	Kaempferol-rhamnosylhexosideo	595.1645 [M+H] ⁺ ; 449.1065 [M+H-rhamnose] ⁺ ; 287.0549 [M+H- ramnose - hexose] ⁺	5.1
7	2-Azaantraquinona	210.0536 [M+H] ⁺	8.8

TR: tempo de retenção (min).

Figura 2.

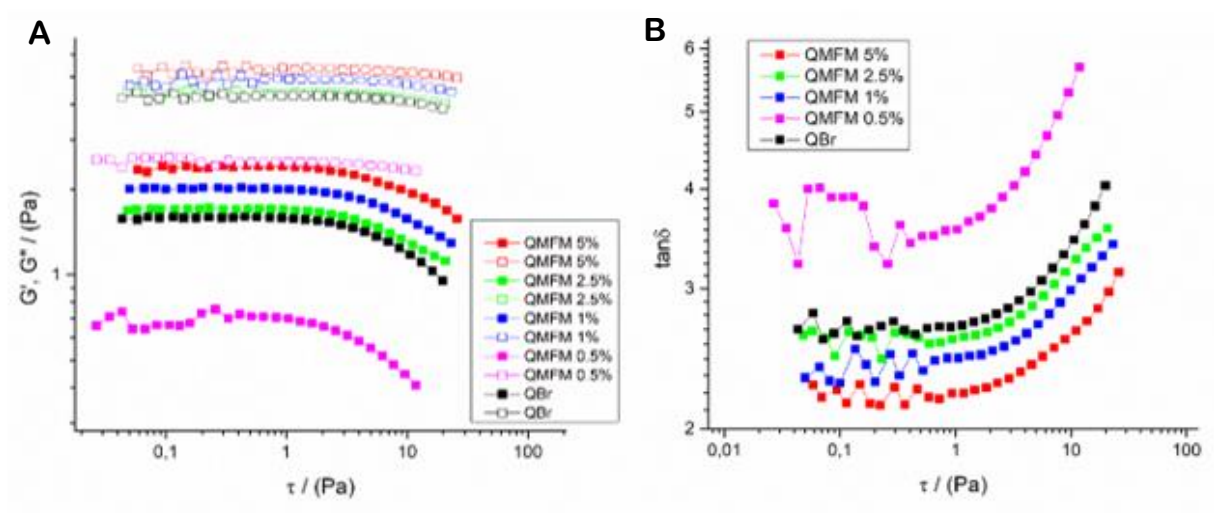


Figura 3.

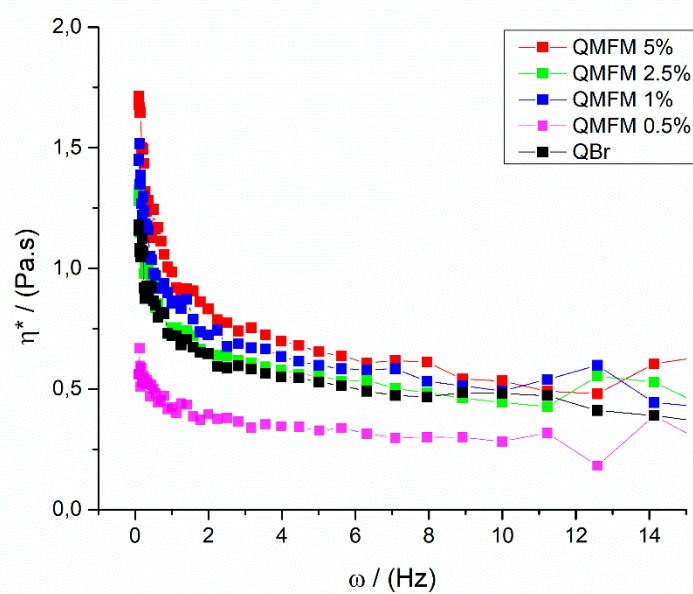


Figura 4.

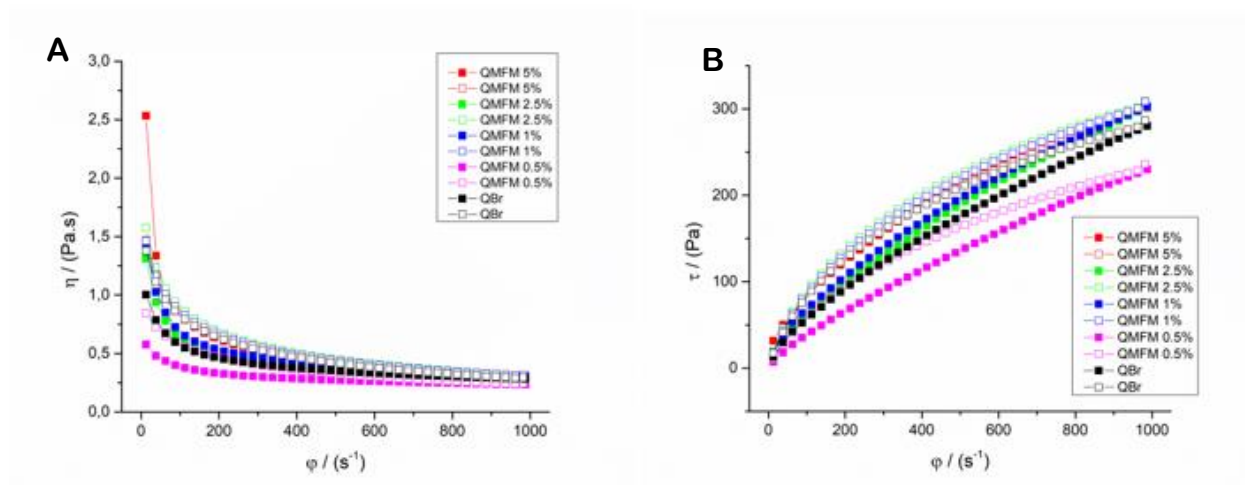


Figura 5.

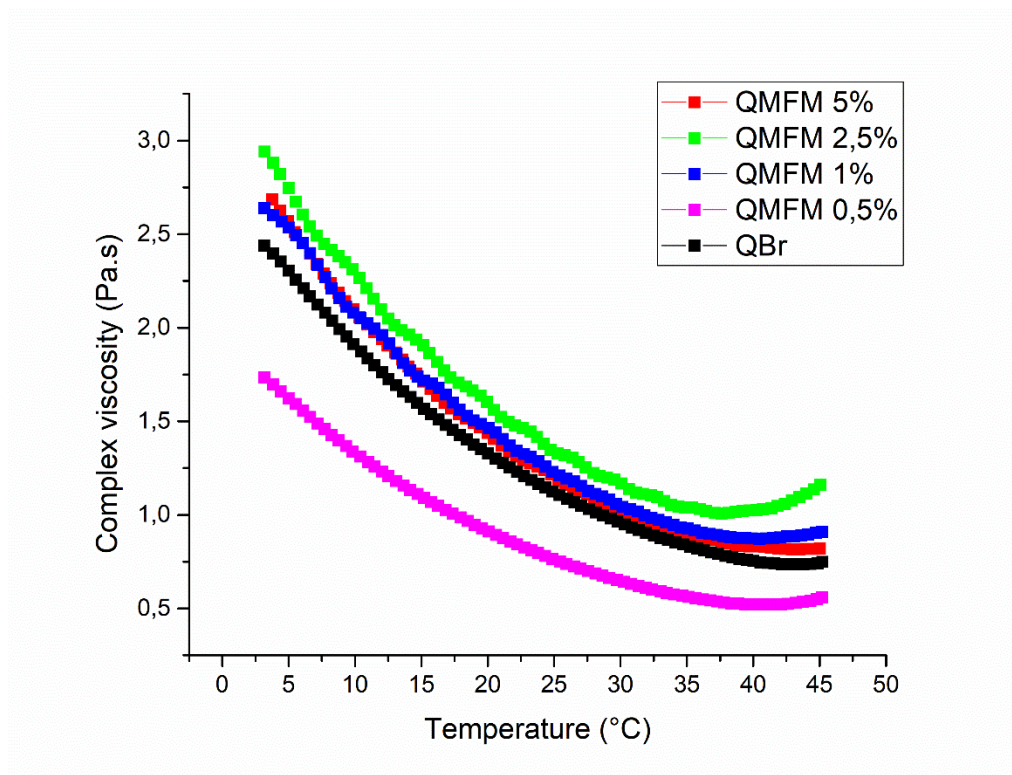


Figura 6.

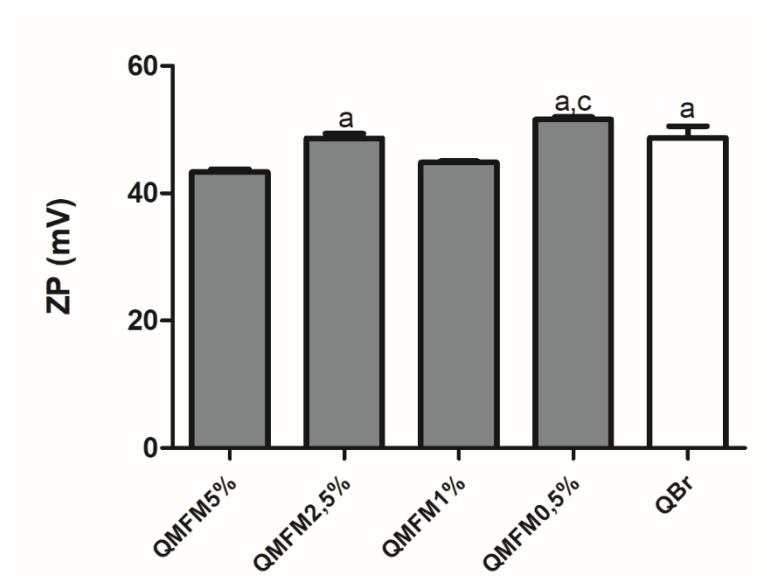


Figura 7.

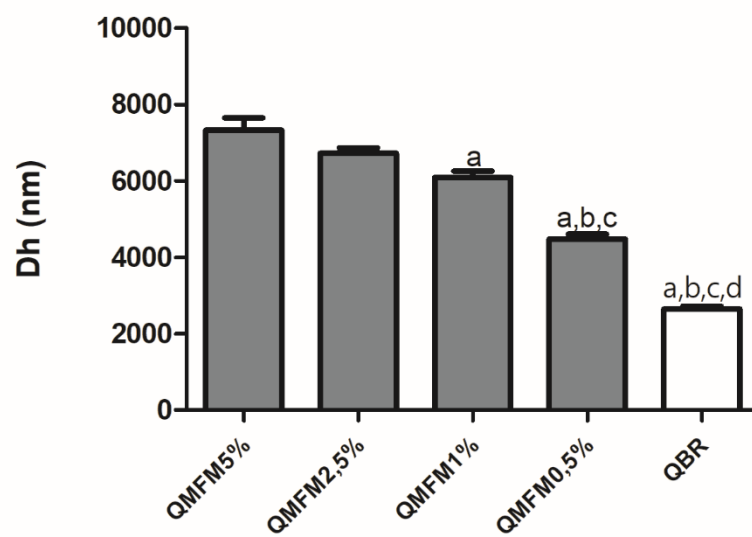


Figura 8.

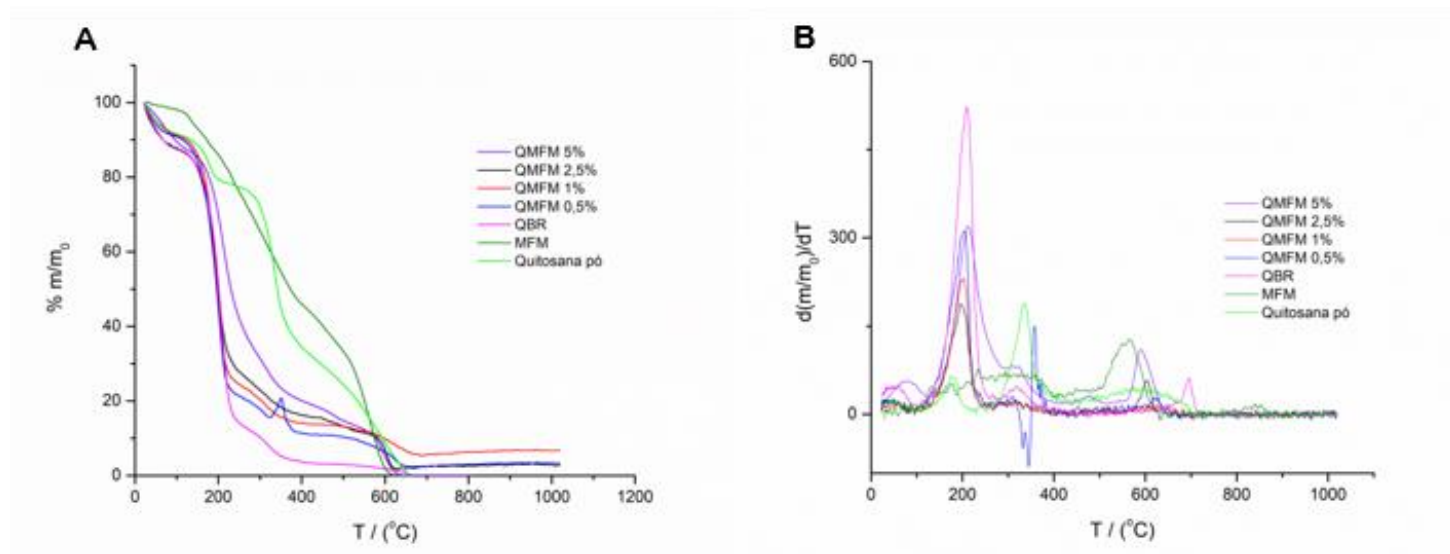


Figura 9.

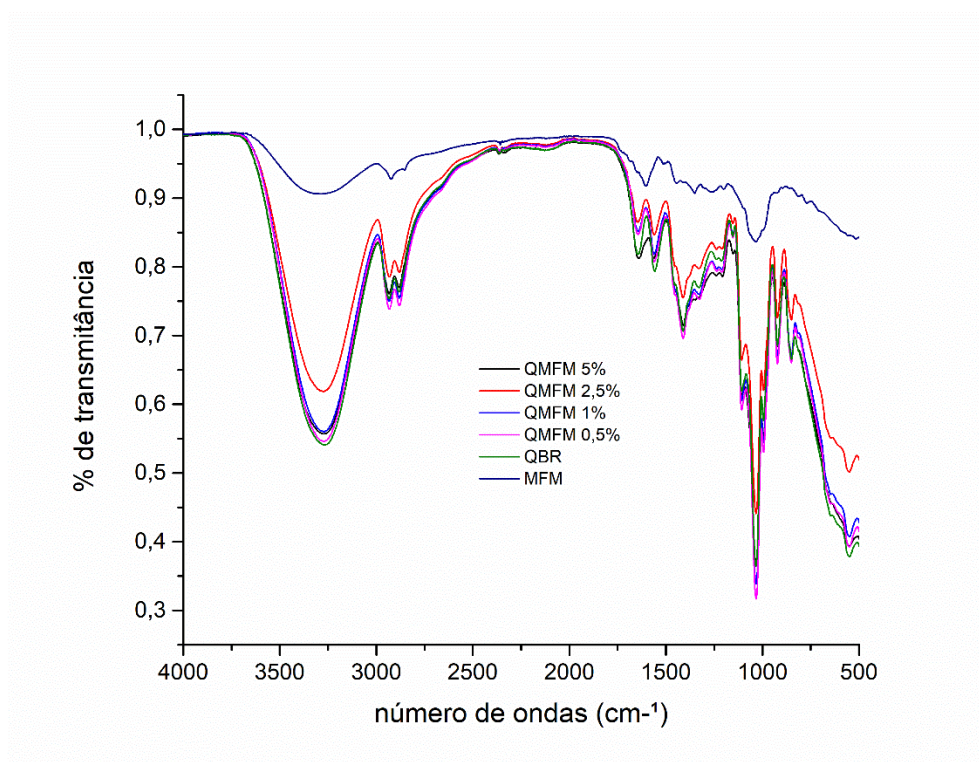


Figura 10.

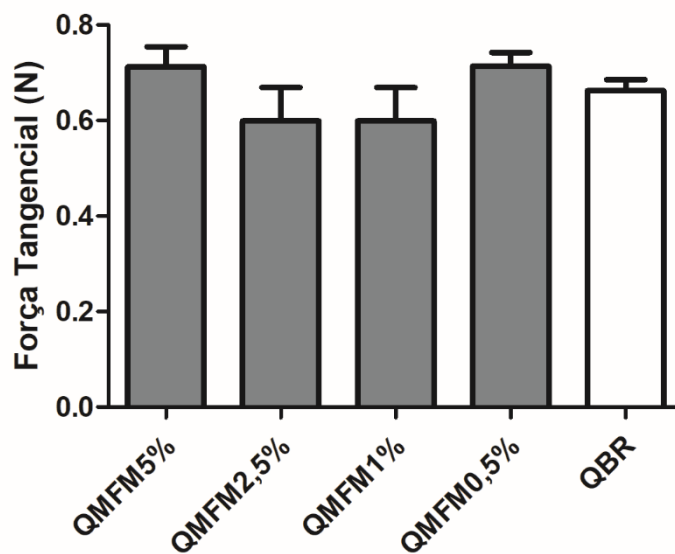


Figura 11.

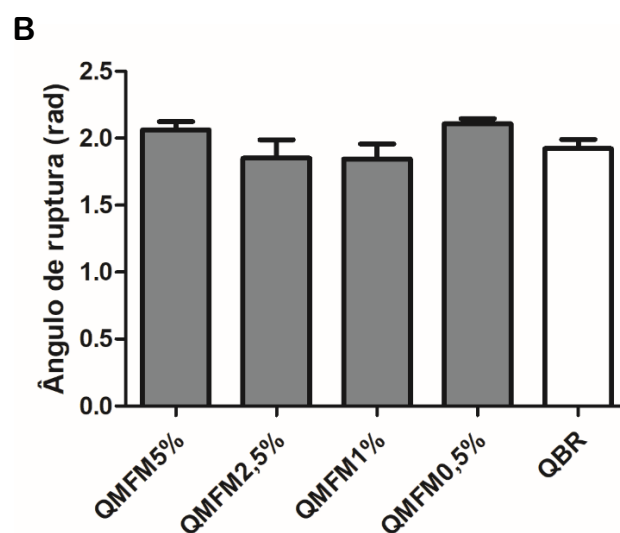
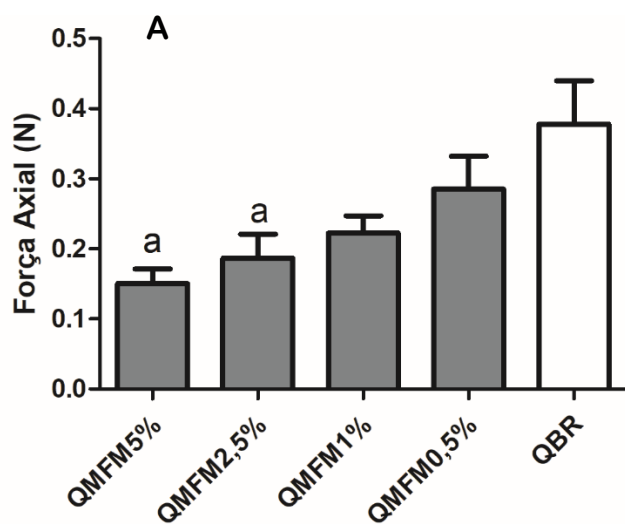


Figura 12.

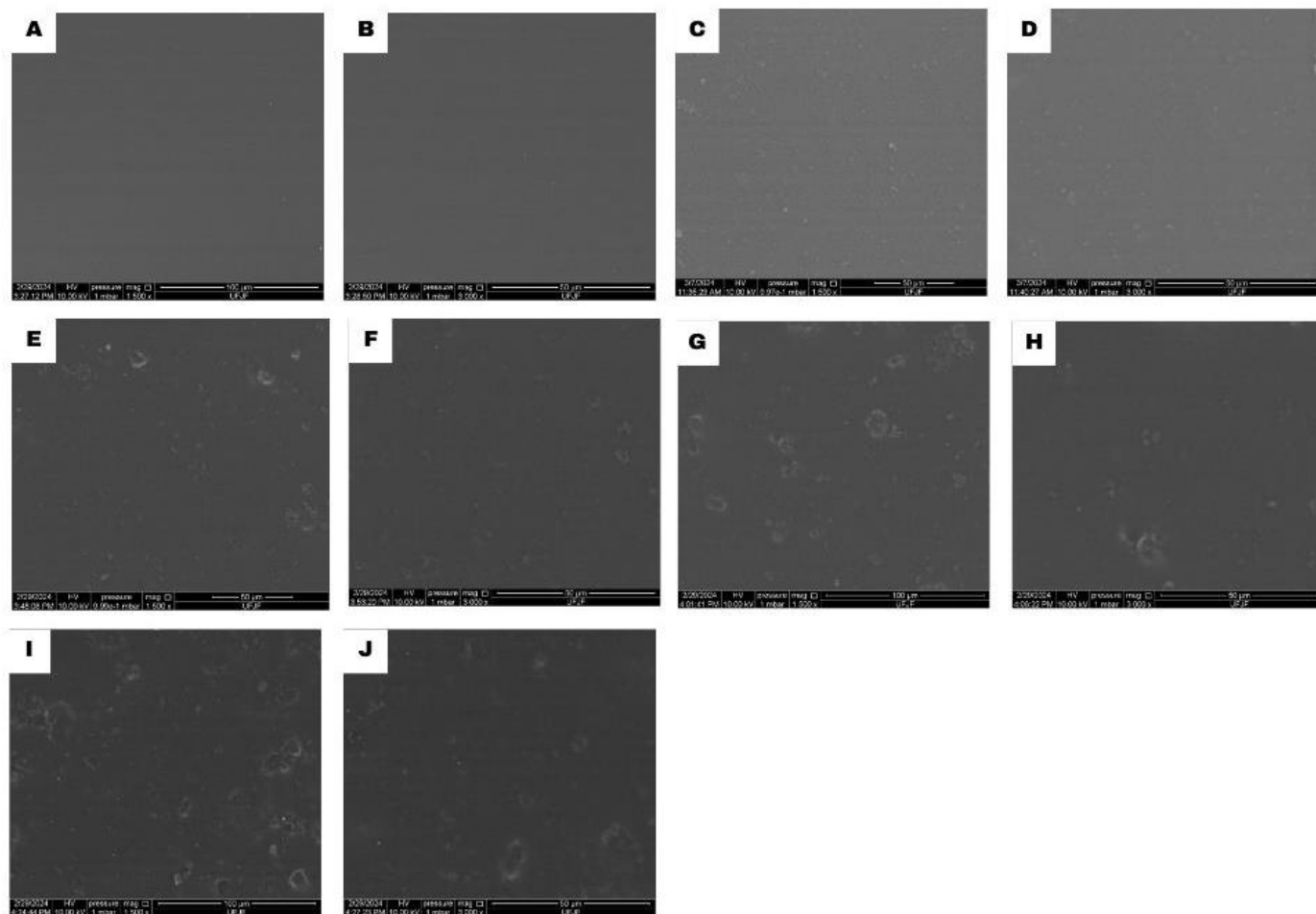
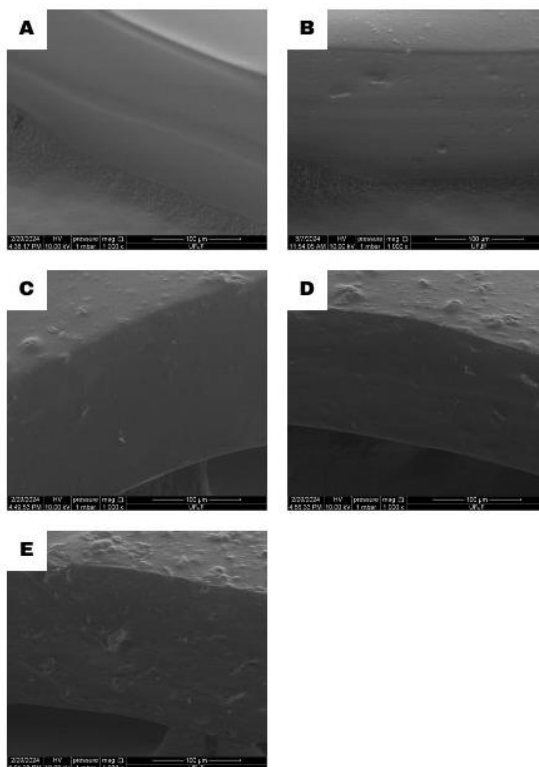


Figura 13.**Figura 14.**

Filmes	Peso médio	Espessura
QMFM 5%	0,02497 ± 0,00809 a	0,2767±0,046 b,c,d
QMFM 2,5%	0,02337 ± 0,00307 a	0,1764 ± 0,052 a
QMFM 1%	0,02246 ± 0,0033 a	0,1965 ± 0,036
QMFM 0,5%	0,01825 ± 0,00311 a	0,1966 ± 0,0309
QBR	0,0467 ± 0,01044	0,2488 ± 0,045

Figura 15.

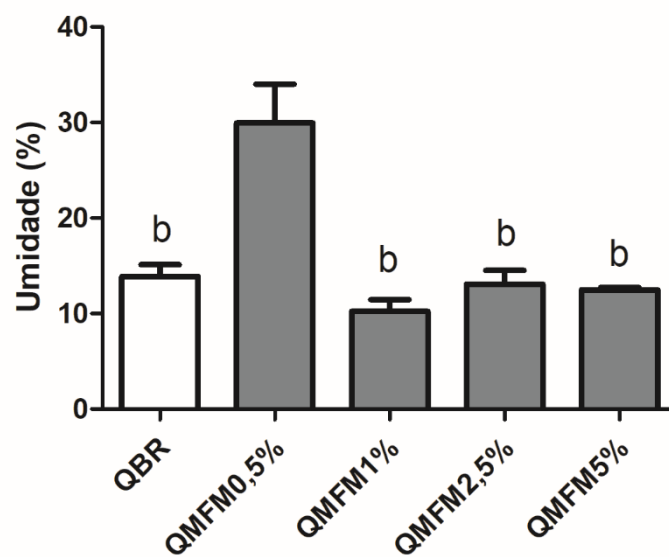


Figura 16.

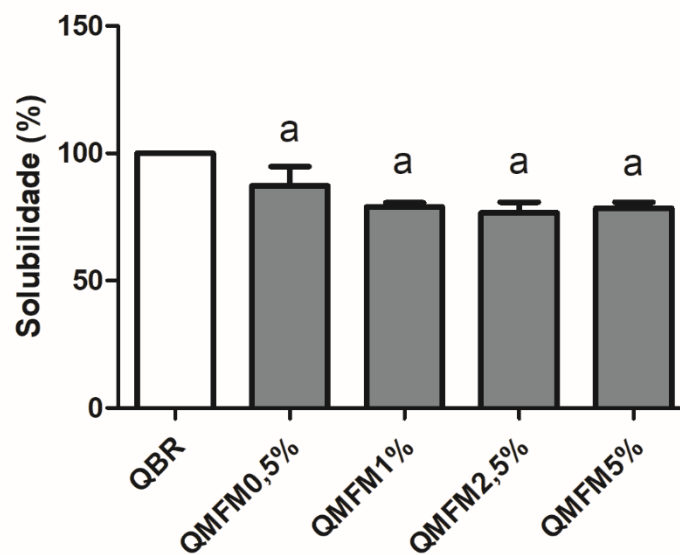


Figura 17.

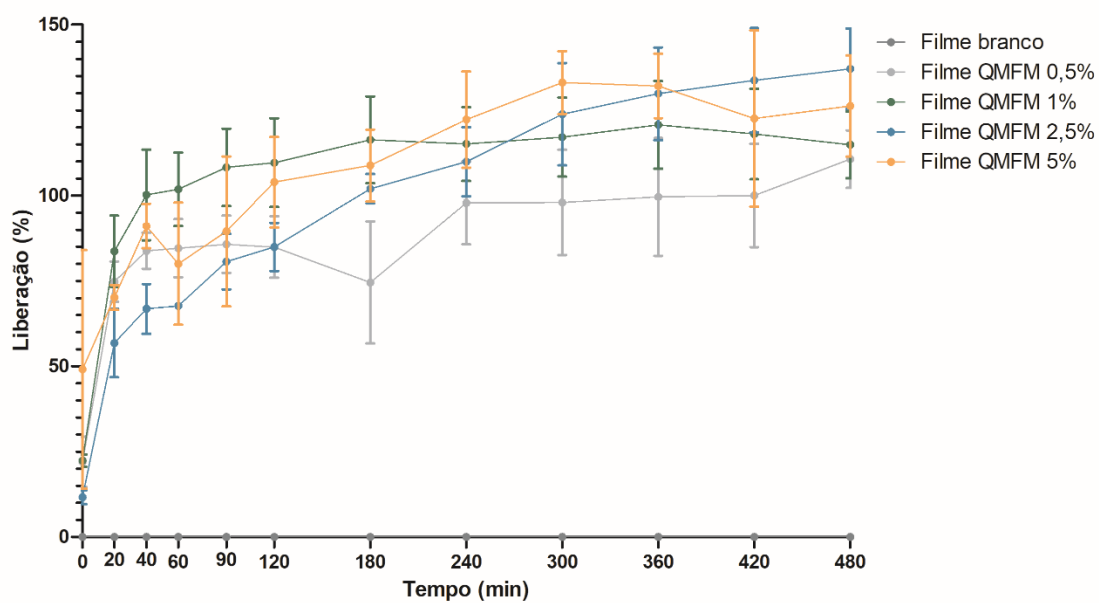


Figura 18.

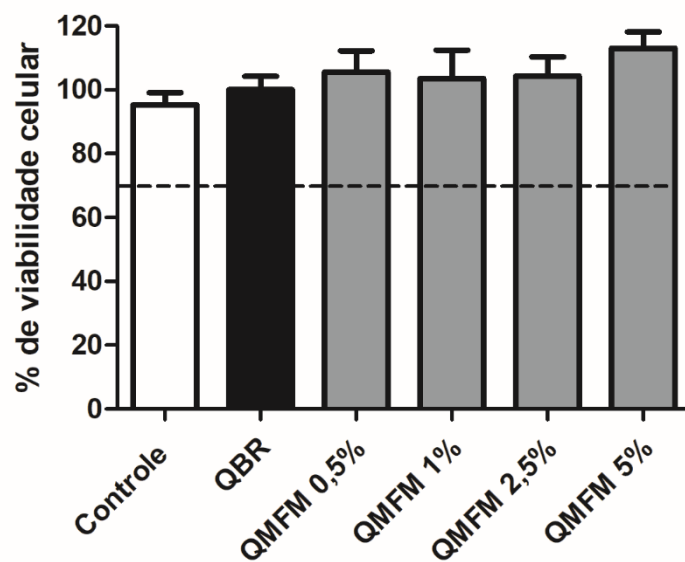


Figura 19.

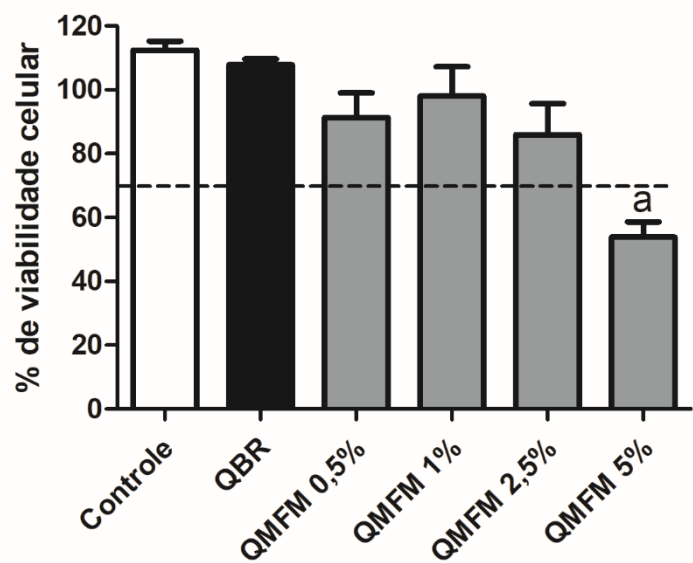


Figura 20.

Tratamento	<i>Candida albicans</i>				
	ATCC® 10231™	ATCC® 24433™	Vaginal	Oral	1015
QMFM 1%	Fungicida	Fungicida	Fungicida	Fungicida	Fungicida
QMFM 2,5%	Fungicida	Fungicida	Fungicida	Fungicida	Fungicida
QBR	Fungistático	Fungicida	Fungicida	Fungicida	Fungistático

Figura 21.

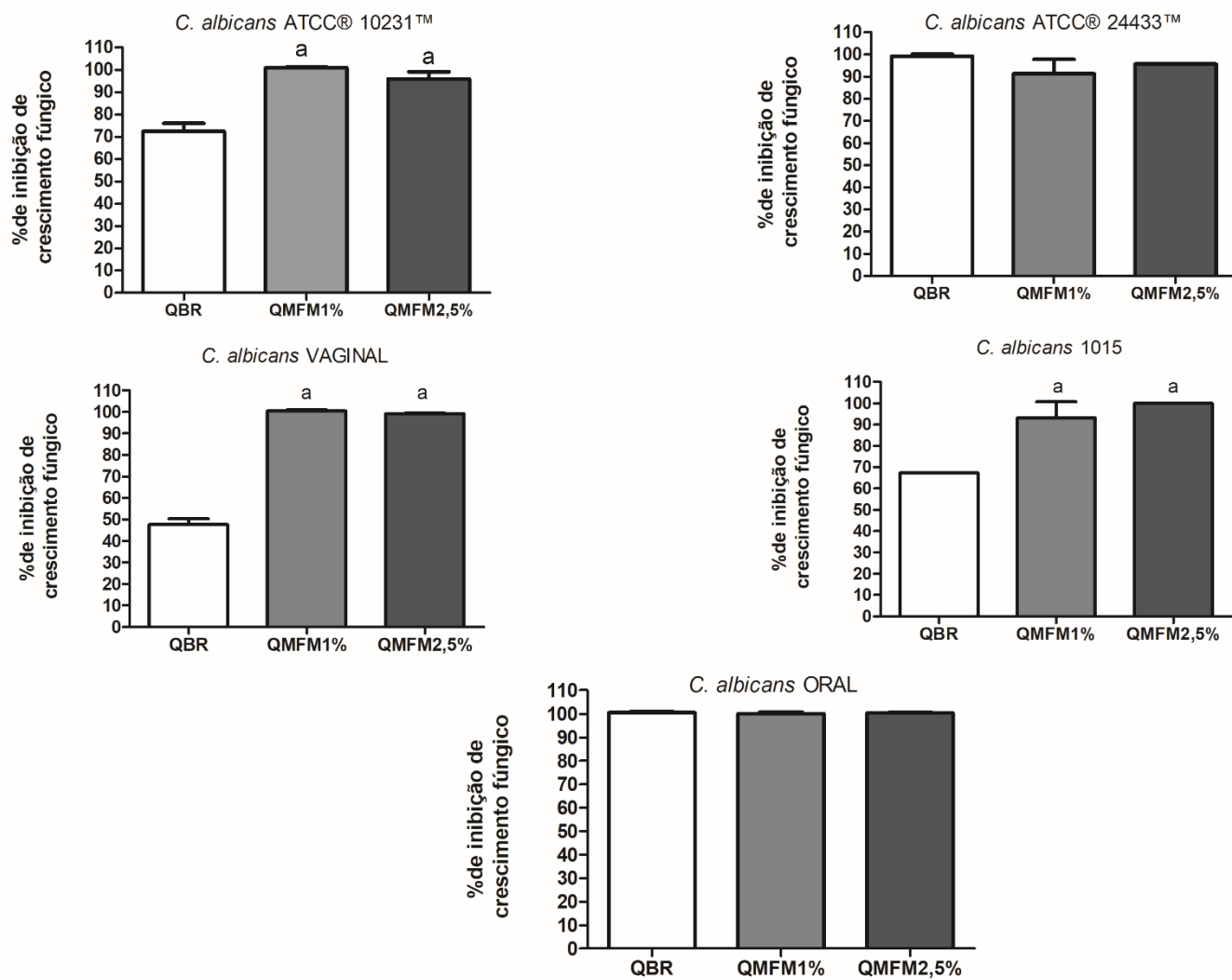


Figura 22.

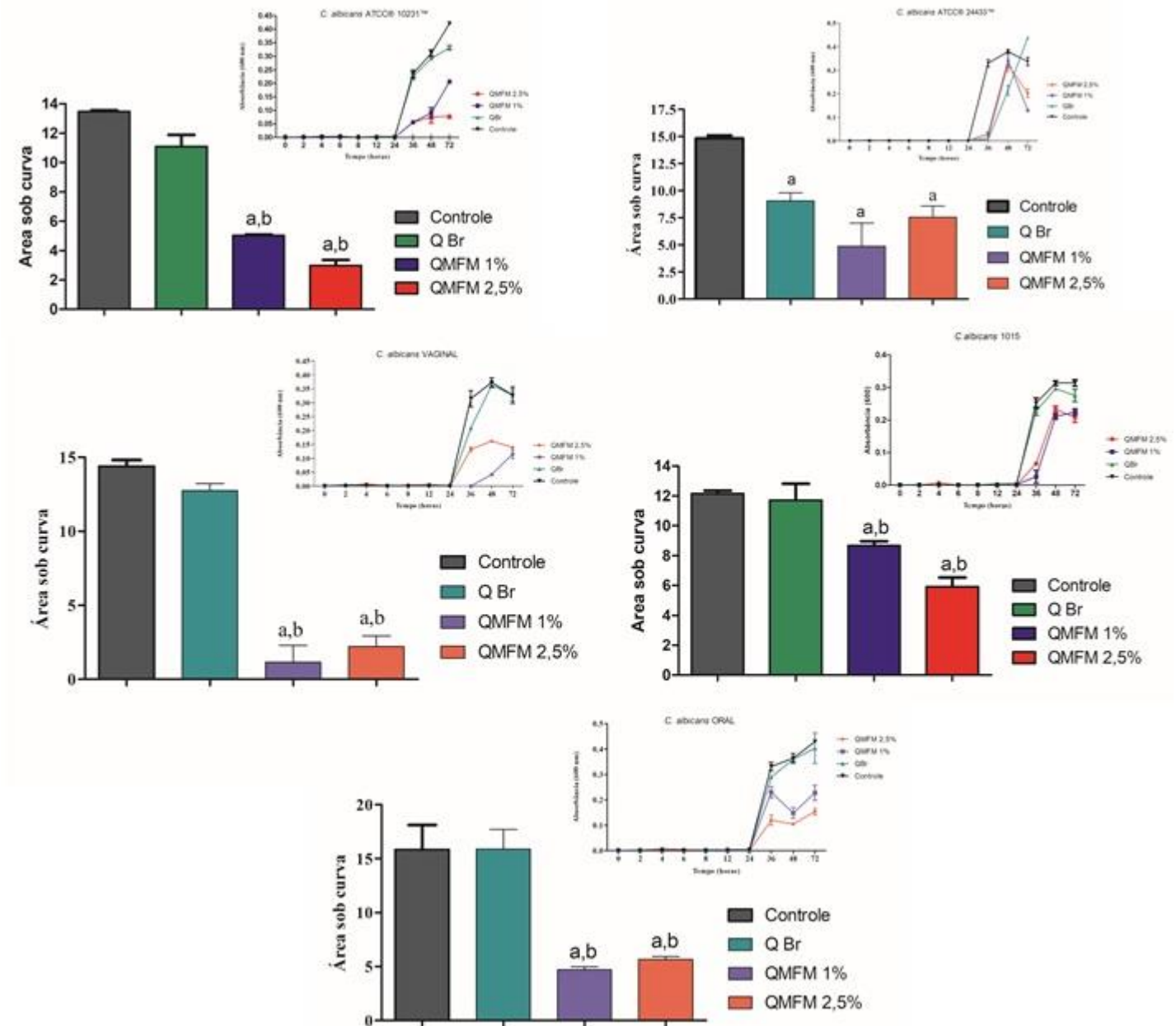


Figura 23.

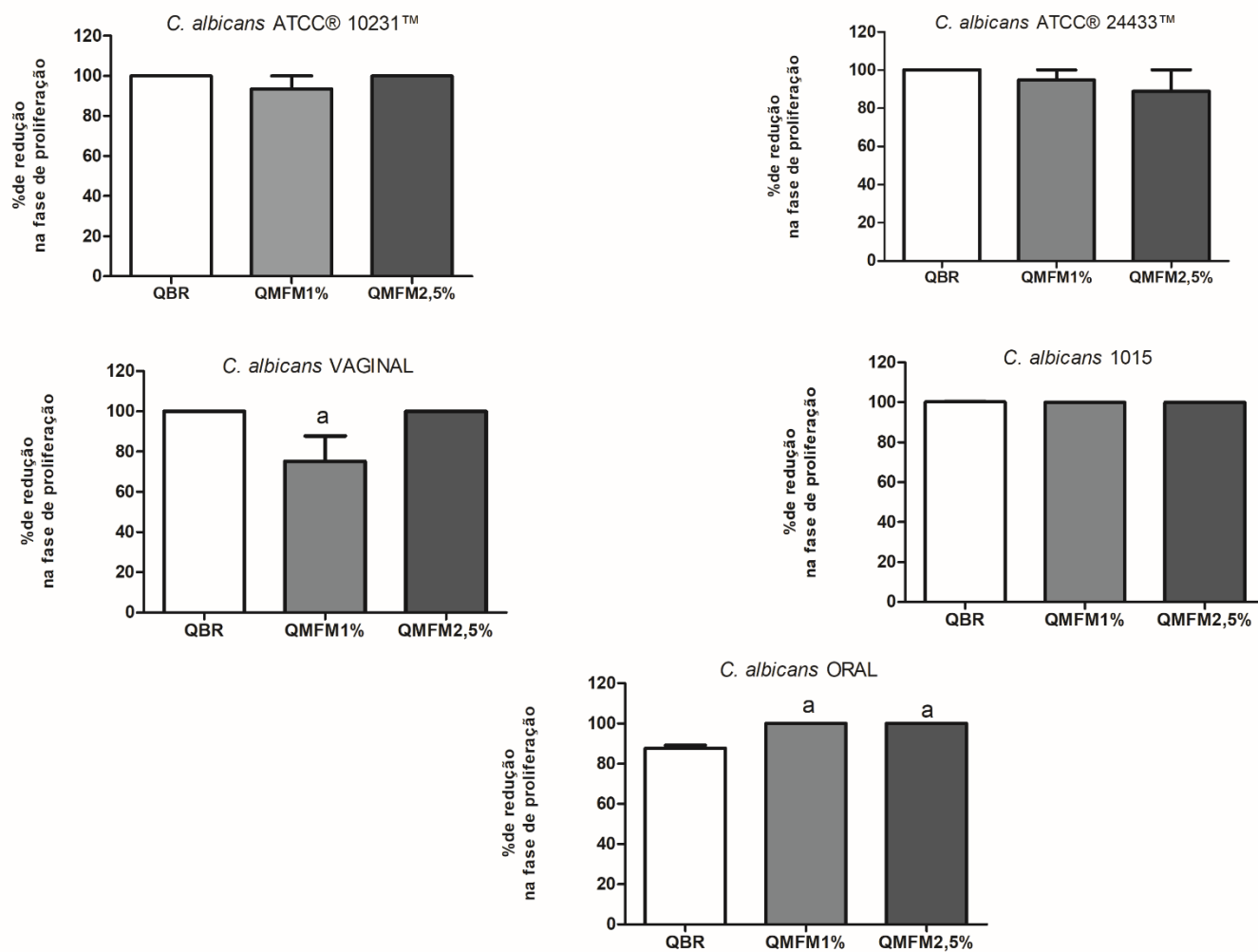
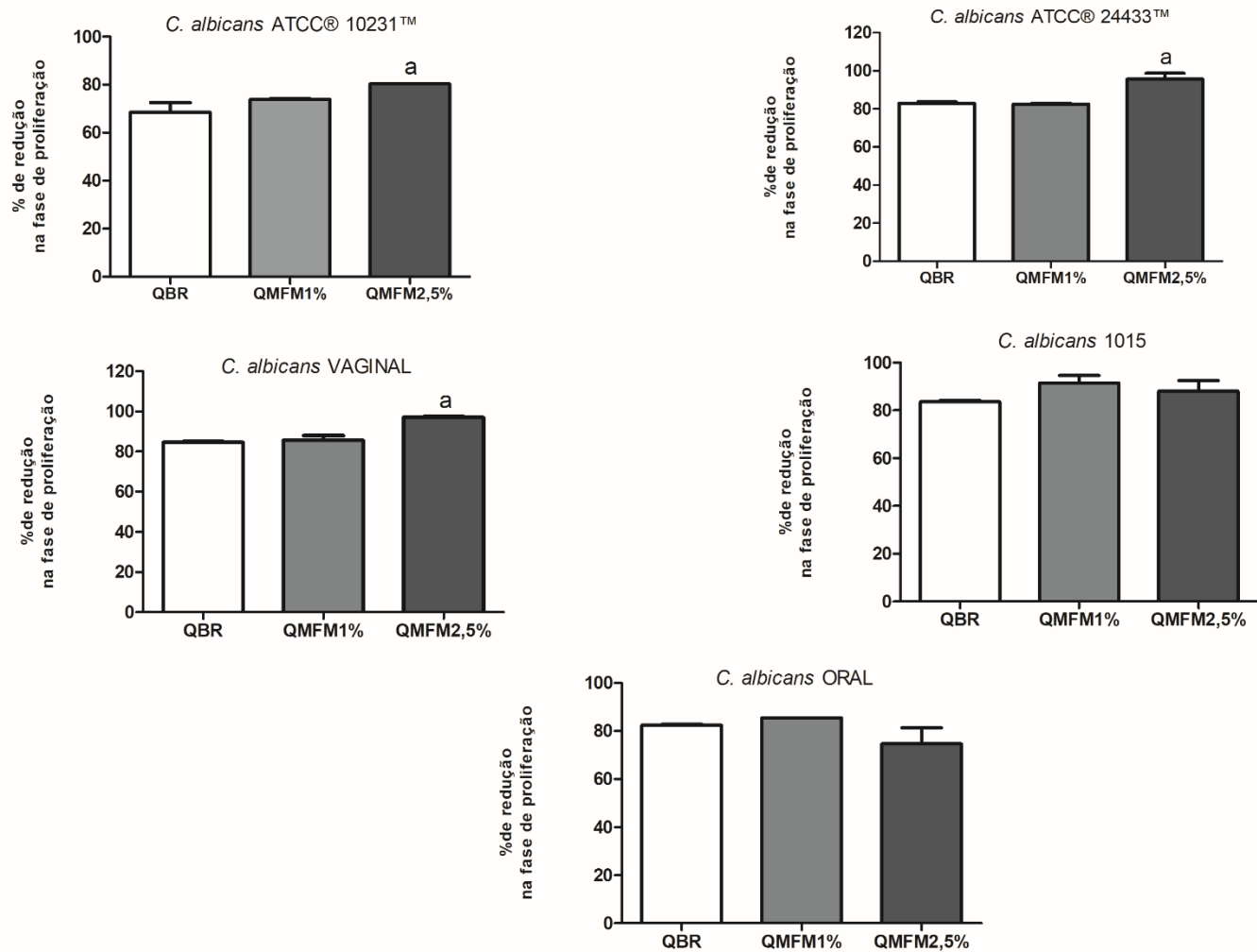


Figura 24.



RESUMO

**“BIOCURATIVOS ANTIFÚNGICOS À BASE DE QUITOSANA E
EXTRATO DE *Mitracarpus frigidus* PARA TRATAMENTO DE
CANDIDÍASE VULVOVAGINAL E OROFARÍNGEA: PROCESSO DE
OBTENÇÃO, COMPOSIÇÕES E USOS”**

A inovação proposta neste contexto refere-se a um método de obtenção, composições e uso de filmes poliméricos de quitosana (biocurativos) utilizando o extrato metanólico das partes aéreas de *Mitracarpus frigidus* (Willd. Ex Reem Schult.) K. Schum. destinado ao uso vaginal e orofaríngeo. Tanto a solução do extrato quanto os produtos finais podem ser empregados como agentes antifúngicos no tratamento de candidíases, especialmente as vulvovaginais e orofaríngeas. A presença da quitosana desempenha um papel crucial na dispersão dos princípios ativos na mistura, induzindo um mecanismo de liberação controlada dos componentes bioativos do extrato. Além disso, proporciona uma maior estabilidade para os compostos bioativos, melhorando a sua biodisponibilidade. O extrato potencializa as propriedades antifúngicas da quitosana, elevando a porcentagem de inibição do crescimento de células fúngicas, queda da curva de crescimento fúngico e aumento do efeito antibiofilme diante de espécies de *Candida*.