MATHEUS RESENDE NOBRE

DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA NANOESTRUTURADA CONTENDO METRONIDAZOL PARA O TRATAMENTO TÓPICO DE TRICOMONOSE BOVINA

LAVRAS – MG

2026

MATHEUS RESENDE NOBRE

DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA NANOESTRUTURADA CONTENDO METRONIDAZOL PARA O TRATAMENTO TÓPICO DE TRICOMONOSE BOVINA

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Fisiologia e Metabolismo, para a obtenção do título de Mestre.

Dr. Humberto de Mello Brandão

Orientador

Prof. Dr. Marcos Ferrante

Coorientador

Dr. Cristian Lépori

Coorientador

LAVRAS – MG

2026

Ficha Catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Nobre, Matheus Resende.
Desenvolvimento de formulação farmacêutica nanoestruturada contendo metronidazol para o tratamento tópico de tricomonose bovina / Matheus Resende Nobre. - 2026.
61 p. : il.

Orientador: Humberto de Mello Brandão
Coorientador: Marcos Ferrante
Coorientador: Cristian Lepori

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2026.
Bibliografia.

1. Nanotecnologia. 2. tricomonose bovina. 3. Metronidazol. 4. Quitosana. 5. Gelificação iônica. I. de Mello Brandão, Humberto. II. Ferrante, Marcos. III. Lepori, Cristian. IV. Universidade Federal de Lavras. V. Título.

MATHEUS RESENDE NOBRE

DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA NANOESTRUTURADA CONTENDO METRONIDAZOL PARA O TRATAMENTO TÓPICO DE TRICOMONOSE BOVINA

DEVELOPMENT OF A NANOSTRUCTURED PHARMACEUTICAL FORMULATION CONTAINING METRONIDAZOLE FOR THE TOPICAL TREATMENT OF BOVINE TRICHOMONIASIS

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Fisiologia e Metabolismo, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 3 de março de 2026

Dr. Rafael Marques UFJF

Dr. Cristian Lepori UNRC

gov.br Documento assinado digitalmente
HUMBERTO DE MELLO BRANDAO
Data: 27/05/2026 16:08:03-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Orientador

Prof. Dr. Humberto de Mello Brandão

Coorientadores

Prof.ª Dr. Marcos Ferrante e Cristian Lepori

LAVRAS – MG

2026

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço a Deus, fonte de sabedoria, força e propósito, por ter me sustentado em todos os momentos desta caminhada. Foi n'Ele que encontrei direção nos dias de incerteza, ânimo nas dificuldades e gratidão em cada conquista alcançada.

À minha namorada, Carolina, minha companheira de vida e maior incentivadora, agradeço por todo amor, paciência e compreensão durante essa jornada. Seu apoio constante, suas palavras de encorajamento e sua presença foram fundamentais para que eu seguisse firme. Você é inspiração diária e parte essencial de cada vitória.

Ao meu pai, Francinildo, meu maior exemplo na área acadêmica, deixo minha profunda admiração e gratidão. Sempre me espelhei em sua dedicação, disciplina e compromisso com o conhecimento. Sua trajetória moldou meus valores e despertou em mim o desejo de trilhar o caminho da ciência com seriedade e responsabilidade. À minha mãe, Eliane, agradeço por todo amor incondicional, cuidado e suporte em todos os momentos. Sua força, carinho e confiança foram alicerces fundamentais para que eu chegasse até aqui. Ao meu irmão, Rafael, companheiro de vida, obrigado pelo apoio, incentivo e parceria. Crescer em um ambiente acadêmico, cercado por estímulos ao estudo, à curiosidade e ao pensamento crítico, foi um privilégio que moldou quem sou hoje.

Ao Almofadinhas, meu fiel companheiro de quatro patas, agradeço pela presença silenciosa e constante durante as longas horas de escrita. Sua companhia tornou os dias mais leves e trouxe conforto nos momentos de cansaço e ansiedade.

Agradeço de forma especial ao meu orientador, Professor Humberto, pela confiança, orientação segura, disponibilidade e ensinamentos que foram essenciais para a construção deste trabalho. Sua condução firme e seu compromisso com a excelência científica foram determinantes para meu crescimento acadêmico e profissional.

Aos meus coorientadores, Marcos e Cristian, agradeço pelas valiosas contribuições, discussões enriquecedoras e apoio técnico-científico ao longo do desenvolvimento da pesquisa.

À Michelle, analista do laboratório, registro minha sincera gratidão pelo suporte técnico, pela disposição em ajudar e pela colaboração diária, fundamentais para a execução experimental deste estudo.

Por fim, agradeço ao CNPQ que financiou este projeto. Agradeço a todos, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desta dissertação. Esta conquista não é apenas minha, mas de todos que caminharam ao meu lado e fizeram parte desta trajetória.

RESUMO

A tricomonose bovina é uma enfermidade de importante impacto reprodutivo, cujo tratamento apresenta limitações relacionadas à biodisponibilidade e à permanência do fármaco no sítio de ação. Nesse contexto, sistemas nanoparticulados à base de quitosana representam uma estratégia promissora para otimizar a liberação e retenção local de fármacos. O presente estudo teve como objetivo desenvolver e otimizar nanopartículas de quitosana contendo metronidazol (MTZ), obtidas por gelificação ionotrópica com tripolifosfato de sódio (TPP), avaliando a influência das condições de síntese na eficiência de encapsulamento, capacidade de carga e propriedades físico-químicas do sistema. Diferentes estratégias de incorporação do MTZ foram comparadas, sendo observado melhor desempenho na condição em que o fármaco foi previamente adicionado à solução de quitosana ([Q+MTZ]+TPP), alcançando eficiência de encapsulamento de 45% ± 0,28. A caracterização físico-química demonstrou a formação de nanopartículas com diâmetro hidrodinâmico médio entre 148 e 174 nm, índice de polidispersão inferior a 0,3 na maioria das formulações e potencial zeta positivo, compatível com a protonação dos grupamentos amina da quitosana em meio ácido. O aumento da concentração inicial de MTZ promoveu elevação significativa do diâmetro hidrodinâmico e redução progressiva da eficiência de encapsulamento, sugerindo limitação intrínseca do processo de encapsulação, possivelmente associada à saturação dos sítios de interação eletrostática entre o fármaco, a quitosana e o TPP. Embora diferenças estatísticas tenham sido observadas entre as formulações quanto à capacidade de carga, os valores obtidos foram considerados baixos, indicando limitações para futuras aplicações in vivo. Os resultados demonstram que as condições de incorporação do fármaco e sua concentração inicial exercem influência determinante nas propriedades estruturais e no desempenho de encapsulamento das nanopartículas de quitosana, fornecendo subsídios para o desenvolvimento racional de sistemas nanoestruturados destinados à liberação controlada de metronidazol.

Palavras-chave: quitosana; metronidazol; nanopartículas; gelificação ionotrópica; eficiência de encapsulamento; capacidade de carga.

.

ABSTRACT

Bovine trichomoniasis is a disease with significant reproductive impact, whose treatment presents limitations related to drug bioavailability and residence time at the site of action. In this context, chitosan-based nanoparticulate systems represent a promising strategy to optimize drug release and local retention. The present study aimed to develop and optimize chitosan nanoparticles containing metronidazole (MTZ), obtained by ionic gelation with sodium tripolyphosphate (TPP), evaluating the influence of synthesis conditions on encapsulation efficiency, loading capacity, and physicochemical properties of the system. Different MTZ incorporation strategies were compared, and the best performance was observed when the drug was previously added to the chitosan solution ([Q+MTZ]+TPP), reaching an encapsulation efficiency of 45% ± 0.28. Physicochemical characterization demonstrated the formation of nanoparticles with mean hydrodynamic diameters ranging from 148 to 174 nm, polydispersity index values below 0.3 for most formulations, and positive zeta potential, consistent with the protonation of chitosan amino groups in acidic medium. Increasing the initial MTZ concentration promoted a significant increase in hydrodynamic diameter and a progressive reduction in encapsulation efficiency, suggesting an intrinsic limitation of the encapsulation process, possibly associated with saturation of electrostatic interaction sites among the drug, chitosan, and TPP. Although statistically significant differences were observed among formulations regarding loading capacity, the obtained values were considered low, indicating limitations for future in vivo applications. The results demonstrate that drug incorporation conditions and initial concentration exert a determining influence on the structural properties and encapsulation performance of chitosan nanoparticles, providing support for the rational development of nanostructured systems intended for the controlled release of metronidazole.

Keywords: chitosan; metronidazole; nanoparticles; ionic gelation; encapsulation efficiency; loading capacity.

INDICADORES DE IMPACTO

O presente trabalho apresenta impacto científico, tecnológico, econômico e social ao desenvolver uma formulação farmacêutica nanoestruturada contendo metronidazol para potencial aplicação no tratamento tópico da tricomonose bovina, enfermidade responsável por importantes prejuízos reprodutivos na bovinocultura. A utilização de nanopartículas de quitosana obtidas por gelificação ionotrópica representa uma abordagem inovadora no contexto da farmacotécnica veterinária, contribuindo para o avanço do conhecimento relacionado aos sistemas nanoestruturados de liberação controlada de fármacos. Os resultados obtidos fornecem subsídios relevantes para a compreensão da influência das condições de síntese sobre as propriedades físico-químicas e o desempenho de encapsulamento das nanopartículas, favorecendo o desenvolvimento racional de formulações mais eficientes e seguras. Do ponto de vista tecnológico, o estudo apresenta potencial para aplicação futura na obtenção de produtos farmacêuticos veterinários com maior permanência local do fármaco e possível melhoria da eficácia terapêutica, podendo contribuir para a redução da frequência de administração e otimização do tratamento. Além disso, a pesquisa fortalece a integração entre as áreas de nanotecnologia, farmácia e medicina veterinária, ampliando as perspectivas para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas voltadas à sanidade animal. Em relação aos impactos econômicos e sociais, o desenvolvimento de alternativas terapêuticas mais eficazes para a tricomonose bovina pode colaborar para a redução de perdas reprodutivas e produtivas na pecuária, favorecendo a sustentabilidade e a competitividade do setor agropecuário. Adicionalmente, a proposta pode contribuir para o uso mais racional de antimicrobianos, reduzindo desperdícios e minimizando impactos ambientais associados à utilização inadequada de fármacos veterinários.

IMPACT INDICATORS

The present study presents scientific, technological, economic, and social impacts by developing a nanostructured pharmaceutical formulation containing metronidazole for potential application in the topical treatment of bovine trichomoniasis, a disease responsible for significant reproductive losses in cattle production. The use of chitosan nanoparticles obtained by ionic gelation represents an innovative approach in the context of veterinary pharmaceutics, contributing to the advancement of knowledge related to nanostructured systems for controlled drug delivery. The obtained results provide relevant support for understanding the influence of synthesis conditions on the physicochemical properties and encapsulation performance of the nanoparticles, favoring the rational development of more efficient and safer formulations. From a technological perspective, the study demonstrates potential for future application in the development of veterinary pharmaceutical products with greater local drug retention and possible improvement in therapeutic efficacy, potentially contributing to reduced administration frequency and treatment optimization. Furthermore, the research strengthens the integration between nanotechnology, pharmacy, and veterinary medicine, expanding perspectives for the development of new therapeutic strategies aimed at animal health. Regarding economic and social impacts, the development of more effective therapeutic alternatives for bovine trichomoniasis may contribute to reducing reproductive and productive losses in livestock farming, thereby supporting the sustainability and competitiveness of the agricultural sector. Additionally, the proposed system may contribute to the more rational use of antimicrobials, reducing waste and minimizing environmental impacts associated with the inappropriate use of veterinary drugs.

Abreviaturas e siglas

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANOVA – Análise de Variância
AUC – Área sob a Curva (Area Under the Curve)

BSA – Albumina Sérica Bovina (Bovine Serum Albumin)

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute

DLS – Espalhamento Dinâmico de Luz (Dynamic Light Scattering)
DO – Densidade Óptica

EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
EE% – Eficiência de Encapsulação

FDA – Food and Drug Administration
FTIR – Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
ICH – International Council for Harmonisation
INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

kDa – Quilodalton

LC – Concentração Letal
LD – Dose Letal

mV – Milivolt
MTZ – Metronidazol

NBR – Norma Brasileira
NP – Nanopartícula
NPS – Nanopartículas
NTA – Nanoparticle Tracking Analysis

PDI – Índice de Polidispersão
pH – Potencial Hidrogeniônico
PLGA – Poli(ácido lático-co-glicólico)

RPM – Rotações por Minuto

SEM – Microscopia Eletrônica de Varredura (Scanning Electron Microscopy)
SNEDDS – Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System

T. foetus – Tritrichomonas foetus
TPP – Tripolifosfato de Sódio

UV – Ultravioleta
UV-Vis – Espectroscopia de Absorção no Ultravioleta-Visível

ζ – Potencial Zeta

1. Introdução

A tricomonose (tricomoníase) bovina, causada por Tritrichomonas foetus, é uma doença sexualmente transmissível que afeta principalmente a eficiência reprodutiva de rebanhos bovinos leiteiros e de corte. Com uma distribuição geográfica ampla que inclui as Américas, Europa, Ásia e Austrália, apresentando taxas de prevalência bastante variada, entre 0,2% a mais de 40% em rebanhos de regiões que dependem de reprodução natural, de sistemas extensivos e de touros mais velhos(Filho et al., 2018; Mendoza-Ibarra et al., 2012; Soares et al., 2023). Apesar de suas reconhecidas consequências reprodutivas, no Brasil, ainda há uma escassez de dados epidemiológicos recentes e análises econômicas abrangentes, sendo relatada particularmente nas principais regiões produtoras de gado de corte, como por exemplo Mato Grosso e Minas Gerais(Botelho et al., 2018; Nascimento et al., 2018; Soares et al., 2023)

Economicamente, as perdas decorrentes tricomonose bovina incluem diminuição da eficiência reprodutiva, abortos, aumento do intervalo entre partos, diminuição do peso comercializável dos bezerros, descarte prematuro de touros e aumento da demanda de manejo, com estimativas de impacto financeiro atingindo milhares de dólares por rebanho afetado anualmente (Yao, 2021). Em casos extremos, a queda na produção de bezerros podem chegar a 50% durante uma estação de monta (Rae, n.d.)

Os dados de impacto financeiros da tricomonose bovina na pecuária nacional são escassos, todavia suas potenciais consequências na pecuária brasileira podem ser inferidas baseadas dados de outras regiões endêmicas. Por exemplo, dados de modelagem estadunidenses, sugerem que a tricomonose bovina pode causar perdas anuais de cerca de US$ 389 milhões na pecuária de corte (Samper et al., 2025). Por sua vez, Goodger & Skirrow (Goodger & Skirrow, n.d.)avaliando rebanhos leiteiros californianos estimaram um prejuízo de US$ 665,00 por vaca/ano.

Mesmo considerando os significativos potenciais impactos econômicos negativos para o setor, a disponibilidade de alternativas terapêuticas medicamentosas eficientes para o tratamento da tricomonose bovina é limitada. Com isso, as medidas de controle da enfermidade se restringem a práticas de manejo, muitas vezes onerosas, e à testagem rotineira de animais. Tais condições, muitas vezes, comprimem ainda mais as penas margens de lucro da pecuária, sendo mais danosa para pequenos e médios produtores rurais.

Dentro deste contexto, o presente trabalho tem por objetivo desenvolver um sistema de liberação controlada mucoadesivo de metronidazol para ser utilizado em abordagens terapêuticas medicamentosas tópicas para o controle da tricomonose bovina, contribuindo, assim para mitigar os impactos negativos desta enfermidade na pecuária nacional.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 - Tricomonose bovina

A tricomonose bovina constitui uma enfermidade de natureza venérea causada pelo protozoário *Tritrichomonas foetus*, que apresenta tropismo pelo trato genital e tem na monta natural sua principal via de transmissão. Nos machos, o parasito aloja-se predominantemente na mucosa prepucial e na região do orifício uretral, onde permanece de forma assintomática, atuando como importante agente disseminador da infecção no rebanho (IRONS ET AL., 2022). Embora classicamente associada ao trato reprodutivo, evidências recentes têm demonstrado a presença de *T. foetus* em segmentos do trato gastrointestinal, o que sugere a possibilidade de adaptação a diferentes microambientes e sua potencial disseminação pela via extra-genital (MARTÍNEZ ET AL., 2023). Com o avanço da idade, observa-se um aumento fisiológico na profundidade e complexidade das criptas prepuciais, favorecendo a persistência do protozoário e dificultando a penetração e eficácia dos agentes farmacológicos, o que contribui para a cronificação do processo infeccioso (MICHI ET AL., 2016A).

De uma forma geral, a tricomonose bovina é considerada uma enfermidade de difícil controle, sobretudo em propriedades que utilizam sistemas extensivos de reprodução. Isso ocorre em função da ausência de sinais clínicos nos machos, o que favorece a disseminação silenciosa do protozoário, permitindo que um único touro infectado comprometa a fertilidade de um grande número de vacas. No caso das fêmeas, a infecção resulta em processos inflamatórios no trato reprodutivo e perdas de magnitude variável, afetando diretamente os índices zootécnicos do rebanho e a rentabilidade do sistema de produção. (GHARBAN, 2023; MICHI ET AL., 2016A). Como consequência, em rebanhos acometidos pela tricomonose, observa-se com elevada frequência a identificação de morte embrionária, repetição de cios, abortos, vacas vazias no final da estação de monta, necessidade de maior frequência na reposição de touros, aumento do período entre partos e, queda na produção de bezerros nascidos(GALVÃO ET AL., 2019). Em suma, gera grandes prejuízos econômicos para a atividade.

Apesar dos avanços no diagnóstico e manejo sanitário, o controle da tricomonose bovina ainda depende majoritariamente de medidas preventivas, como a testagem periódica dos reprodutores, do uso de inseminação artificial e do descarte dos animais infectados. Entretanto, tais estratégias podem ser economicamente inviáveis para pequenos e médios produtores, reforçando a necessidade de alternativas terapêuticas eficazes que minimizem o impacto da enfermidade sem comprometer a viabilidade produtiva dos sistemas (GALVÃO ET AL., 2019; MICHI ET AL., 2016B).

Sob a óptica terapêutica da enfermidade, o tratamento sistêmico com antiprotozoários demonstra maior eficácia em touros com idade inferior a quatro anos, enquanto para touros mais velhos, em decorrência das limitações farmacológicas, o descarte é a abordagem mais recomendada (FILHO ET AL., 2018). Segundo os autores, tal diferença é explicada pela dificuldade do alcance e manutenção de doses terapêuticas no interior da cripta da mucosa prepucial que, em animais mais velhos, se presentam mais profundas que nos touros jovens. Assim, as limitações do tratamento sistêmico refletem não apenas a

dificuldade de penetração do fármaco no interior das criptas, mas também a complexidade da microbiota prepucial e as barreiras fisiológicas locais que podem diferir, mesmo que sutilmente, entre touros jovens e maduros (FLOWER ET AL., 1983). Quando aplicado pela via sistêmica, o fármaco deve difundir através da barreira hemato-mucosa para só então atingir o microambiente mucoso formado pelo glicocálix, o qual possui elevada viscosidade e está em constante renovação, dificulta a retenção de medicamentos, o que pode reduzir a eficácia terapêutica do fármaco(FLOWER ET AL., 1983). No caso da tricomonose bovina, o desafio terapêutico se intensifica em função da localização anatômica do protozoário, que se aloja no interior das criptas prepuciais, que formam microambientes protegidos e de difícil acesso farmacológico, resultando em falhas terapêuticas recorrentes, principalmente em touros com idade superior a quatro anos por possuírem criptas mais profundas que animais mais jovens. (DA SILVA SILVEIRA ET AL., 2020)

Outro ponto relevante na terapêutica da tricomonose bovina é a resistência do *T. foetus* contra agentes antiprotozoários clássicos, bem como a dificuldade de manutenção de seus níveis plasmáticos eficazes no tratamento sistêmico. O metronidazol, embora amplamente reconhecido por sua eficácia contra protozoários anaeróbios, apresenta limitações farmacocinéticas que comprometem seu desempenho em infecções localizadas de mucosas, como no prepúcio bovino. Dessa forma, o aprimoramento de veículos farmacotécnicos capazes de promover a liberação sustentada do fármaco diretamente no sítio de infecção pode representar um avanço significativo na terapêutica da tricomonose bovina .(FLOWER ET AL., 1983)

2.2 - Metronidazol

Apesar de não apesentar uma efetividade universal e não haver relatos de fármacos registrado para o tratamento medicamentoso da tricomonose bovina, este pode ser feito com o ipronidazol, dimetridazol e metronidazol, sendo o último considerada a droga de primeira escolha terapêutica. (HERMADI ET AL., 2024)

O metronidazol é um composto pertencente à classe dos nitroimidazóis, amplamente utilizado devido à sua eficácia frente a microrganismos anaeróbios e protozoários. Sua fórmula molecular é $C_6H_9N_3O_3$, apresentando um peso molecular de aproximadamente 171,15 g/mol. Estruturalmente, é constituído por um anel imidazólico substituído (2-metil-5-nitroimidazol) ligado a uma cadeia etanólica no nitrogênio-1 do anel, o que confere propriedades químicas relevantes para sua atividade biológica (DrugBank, 2024; https://go.drugbank.com/drugs/DB00916). Trata-se de um sólido cristalino branco a levemente amarelado, com ponto de fusão entre 158 °C e 160 °C e pKa próximo a 2,6, o que indica caráter levemente ácido e favorece sua ionização parcial em meios fisiológicos. Apresenta solubilidade alta em água (1–5 mg/mL a 20 °C) e alta solubilidade em etanol, sendo classificado no Sistema de Classificação Biofarmacêutica (BCS) como fármaco de alta solubilidade e alta permeabilidade(Shahzad et al., 2025). Por sua vez, a lipofilicidade do metronidazol é baixa, resultando em valor de log P próximo a 0, o que indica

afinidade por fases aquosas. Se por um lado essa característica favorece a sua difusão em compartimentos biológicos contendo fluidos, por outro limita a penetração em barreiras altamente lipofílicas (ROCHA-GARDUÑO ET AL., 2020). Segundo os autores, essa propriedade fisicoquímica contribui para a ampla distribuição do fármaco em tecidos e fluidos corporais, incluindo saliva, secreções vaginais, sêmen e fluido cerebrospinal.

O mecanismo de ação do metronidazol é complexo e depende da redução enzimática do grupo nitro presente em sua estrutura. O fármaco atua como profármaco, sendo inativo até sofrer redução sob condições anaeróbias ou microaerofílicas (EDWARDS, 1980; SCHNEIDEREIT ET AL., 2025). De acordo com os autores, em protozoários como *Tritrichomonas foetus*, sua ativação ocorre via sistemas enzimáticos de transferência de elétrons (como por exemplo a piruvato:ferredoxina oxidoredutase e a ferredoxina), que convertem o grupo nitro em radicais nitroaniônicos instáveis. Esses radicais interagem com o DNA do microrganismo, causando quebras de fita simples e dupla, inibição da síntese de ácidos nucleicos e consequente morte celular. Por sua vez, a seletividade do metronidazol está diretamente relacionada à necessidade de um ambiente com baixo potencial redox para sua ativação, haja vista que em condições aeróbicas, o oxigênio compete com o grupo nitro pela captação de elétrons, regenerando a forma inativa do fármaco e impedindo a formação de radicais citotóxicos. Essa dependência da redução anaeróbia explica a especificidade do metronidazol contra protozoários e bactérias anaeróbias, preservando as células dos hospedeiros (EDWARDS, 1980; SCHNEIDEREIT ET AL., 2025). Tal condição, é de grande importância para o uso tópico do metronidazolem touros, pois com o avançar da idade, ocorre um aumento da profundidade das criptas prepuciais resultando na intensificação a condição de microaerofilia no colo da cripta. (SAMUELSON & WINTER, 1966)

Do ponto de vista farmacológico, quando administrado oralmente para mammíferos, o metronidazol apresenta boa biodisponibilidade oral, geralmente superior a 90%, sendo rapidamente absorvido pelo trato gastrointestinal e atingindo pico plasmático em 1 a 2 horas após administração (SHAHZAD ET AL., 2025). O volume de distribuição situa-se entre 0,5 e 1,1 L/kg, indicando ampla penetração tecidual, e a ligação às proteínas plasmáticas é baixa (10–20%), o que favorece a difusão para fluidos biológicos (DrugBank, 2024; https://go.drugbank.com/drugs/DB00916). O metabolismo ocorre predominantemente no fígado, por oxidação e conjugação, resultando em metabólitos como o ácido hidroximetilmetronidazol, que mantém parte da atividade biológica do composto (ROCHA-GARDUÑO ET AL., 2020). A excreção do metronidazol e seus metabólitos ocorre principalmente pela via renal (60–80%), e em menor extensão pela bile e fezes (SHAHZAD ET AL., 2025). Estes autores mencionam que a meia-vida plasmática varia entre 6 e 14 horas, podendo ser prolongada em pacientes com comprometimento hepático. Assim, por apresentar eliminação predominantemente renal, ajustes de dose são recomendados em casos de insuficiência hepática ou renal severa.

Além de sua reconhecida atividade antimicrobiana, o metronidazol tem sido amplamente estudado pela sua capacidade de atravessar barreiras biológicas e acumular-se em tecidos inflamatórios, o que o torna especialmente útil em infecções de mucosas e tecidos moles. Essa característica o torna particularmente promissor para o tratamento localizado de infecções como a tricomonose bovina, onde o fármaco pode atingir diretamente o sítio de infecção, maximizando a eficácia terapêutica e reduzindo a exposição sistêmica. (EDWARDS, 1980; ROCHA-GARDUÑO ET AL., 2020; SCHNEIDEREIT ET AL., 2025; SHAHZAD ET AL., 2025)

A busca por opções terapêuticas para a tricomonose bovina tem se intensificado no âmbito científico, em parte motivada pelos resultados clínicos satisfatórios obtidos nos casos de Tricomoníase humana, nos quais o metronidazol demonstrou elevado grau de eficácia. Baseado nisso, o metronidazol começou a ser investigado para o tratamento sistêmico em bovinos acometidos pela doença. Em estudo realizado em touros infectados por *Tritrichomonas foetus*, o regime intravenoso com metronidazol (60 mg/kg, duas aplicações em 24 h) mostrou negativação de cultura após cinco semanas de tratamento consecutivas, evidenciando a viabilidade do uso antiprotozoário nessa espécie-hospedeira (LOVE ET AL., 2017)

Apesar de resultado promissor, o amplo uso do metronidazol em bovinos enfrenta obstáculos regulatórios e práticos: nos Estados Unidos, por exemplo, sua utilização extra-bula em animais de produção é proibida pela Animal Medicinal Drug Use Clarification Act of 1994 (AMDUCA) em razão de potenciais riscos à segurança alimentar (LOVE ET AL., 2017). Adicionalmente, há evidências recentes de que isolados de *T. foetus* exibem menor suscetibilidade ao metronidazol sob condições aeróbicas e anaeróbicas, o que indica risco de ocorrência de sub-tratamento e a seleção de estirpes resistentes (RIVERO ET AL., 2019).

Dentro desse panorama, a aplicação tópica do metronidazol direcionada ao sítio de infecção, isto é, à mucosa prepucial dos touros aparece como alternativa viável para otimizar o uso desse medicamento, minimizando absorção sistêmica e, consequentemente, o risco de seleção de resistência bacteriana inespecífica pela exposição de microbiotas não-alvo. Dessa forma, a via tópica permite que o fármaco atue diretamente sobre o protozoário, reduzindo doses totais e o uso indiscriminado de antimicrobianos, alinhando-se às recomendações modernas de uso racional e sustentável de medicamentos veterinários (RAY ET AL., 2019). Além disso, a administração tópica possibilita maior concentração local do princípio ativo e prolongado contato com o tecido infectado, o que é particularmente relevante no contexto da tricomonose bovina.

O local de colonização do protozoário, criptas da mucosa prepucial e orifício uretral, representam um microambiente de difícil acesso para fármacos sistêmicos, dada sua barreira anatômica, secreção local contínua e micromicrobiota residente (FLOWER ET AL., 1983). Nesse sentido, um fármaco que permaneça mais tempo no sítio local de infecção pode resultar em maior

eficácia terapêutica, menor necessidade de repetição de dose e menor impacto sistêmico.

2.3 - Nanotecnologia aplicada à entrega de fármacos

A nanotecnologia aplicada à liberação de fármacos representa um avanço paradigmático em relação às formulações clássicas, sobretudo para terapias tópicas ou mucosas. Isso porque os nanocarregadores podem ser projetados para oferecer liberação controlada e sustentada do princípio ativo, o que reduz a frequência de reaplicações e mantém concentrações terapêuticas locais por períodos prolongados. Em particular, para mucosas com alta renovação de muco ou secreções, a nanoescala minimiza a perda rápida do fármaco, favorecendo sua persistência no sítio de ação. Além disso, a estrutura reduzida das nanopartículas favorece penetração em nichos anatômicos de difícil acesso — por exemplo, dobras, microfissuras ou criptas — o que é fundamental quando o alvo terapêutico é um protozoário alojado em regiões protegidas da mucosa. Em suma, a nanotecnologia permite contornar limitações clássicas de biodisponibilidade, retenção e penetração em aplicações tópicas e mucosas (VELOSO & CASTANHEIRA, 2023)

A escolha da plataforma nanocarreadora depende diretamente das propriedades físico-químicas do fármaco a ser entregue, da via de administração e das características da mucosa alvo. Entre as opções mais estudadas destacam-se nanopartículas poliméricas biodegradáveis, nanopartículas lipídicas (como SLN e NLC), lipossomas, nanoemulsões, dendrímeros e sistemas híbridos. Cada sistema oferece vantagens e limitações específicas: enquanto polímeros permitem grande versatilidade e modulação de liberação, os lipídeos conferem biocompatibilidade e boa aceitação para fármacos lipofílicos, por exemplo. A flexibilidade de design destas plataformas possibilita encapsular fármacos hidrofílicos ou lipofílicos, proteger moléculas sensíveis (contra pH, enzimas, oxidação), e adaptar a liberação conforme o ambiente local — o que amplia o leque de aplicações terapêuticas (GUGLEVA & ANDONOVA, 2023A)

No contexto de administração por mucosa, as nanopartículas podem ser ainda funcionalizadas para interagir com a camada de muco, visando aderência (mucoadesão) ou penetração (mucopenetração) na rede de mucina. Essa dualidade — adesão e penetração — é crítica: adesão prolonga o tempo de residência, enquanto penetração permite alcançar o epitélio ou nichos mais profundos. A combinação dessas propriedades torna os nanossistemas altamente promissores para entrega de fármacos em regiões de difícil acesso anatômico, como as criptas prepuciais infectadas por protozoários, favorecendo ação local eficaz e prolongada (SATO ET AL., 2023)

O controle das propriedades físico-químicas da nanopartícula é fundamental para otimizar desempenho e segurança. Tamanho médio, distribuição de tamanho (PDI), carga superficial (zeta-potencial), morfologia, densidade de polímero ou lipídeo, composição da matriz, entre outros, influenciam diretamente a capacidade de encapsulamento, liberação, penetração e toxicidade. Nanopartículas com diâmetro na faixa de algumas

dezenas a poucas centenas de nanômetros facilitam penetração em poros e microestruturas da mucosa, ao passo que uma distribuição estreita (baixo PDI) garante uniformidade de comportamento. Ao mesmo tempo, a carga superficial deve ser cuidadosamente modulada: catiônica para favorecer interação com mucina (em formulações mucoadesivas), mas sem exceder limites que provoquem citotoxicidade ou irritação local (GUGLEVA & ANDONOVA, 2023B)

As nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) constituem plataformas particularmente interessantes para liberação tópica ou mucosa, por combinar biocompatibilidade, capacidade para encapsular fármacos hidrofílicos e lipofílicos, estabilidade físico-química e aptidão para liberação controlada. A matriz lipídica sólida protege o fármaco contra degradação e pode favorecer liberação prolongada, reduzindo picos de concentração local e promovendo perfil terapêutico mais uniforme. Todavia, as SLN sozinhas podem ter seu efeito potencializados em mucasas quando teem suas cargas superficiais moduladas. Assim, estudos recentes têm demonstrado que nanocarregadores lipídicos, quando, revestidos com quitosana (polímero catiônico) para controlar a mucoadesaõ em formulações intranasais aumentaram a permeação e captação celular de fármacos, melhorando, assim, eficácia direta sobre células-alvo (GANGAVARAPU ET AL., 2024). Esses resultados concluem que o revestimento superficial da nanoestrutura foi fundamental para otimizar o direcionamento na mucosa., o que demonstra que a incorporação de quitosana ou polímero mucoadesivo em nanocarreador lipídico ou polimérico pode aumentar a penetração e retenção no prepúcio bovino.

Além da versatilidade de composição e funcionalização, a nanotecnologia farmacêutica vem evoluindo no sentido de desenvolver nanocarregadores multifuncionais, estímulo- responsivos (pH, temperatura, redox), com liberação controlada, direcionamento específico, e biocompatibilidade aprimorada. Tais sistemas permitem que o fármaco seja liberado somente sob condições específicas, por exemplo, ao atingir o pH local da mucosa, ou em resposta a enzimas ou redox presentes no ambiente terapêutico, reduzindo efeitos adversos e aumentando seletividade.

Essa “programabilidade” dos nanossistemas amplia significativamente o alcance terapêutico, sobretudo para fármacos com janela terapêutica estreita ou para aplicações onde seletividade e segurança são cruciais. Do ponto de vista farmacodinâmico e farmacocinético local, os nanocarregadores permitem concentrar o fármaco no sítio de ação e evitar a dispersão sistêmica, diminuindo efeitos adversos e reduzindo o risco de toxicidade fora do alvo. A liberação lenta e sustentada evita picos e quedas bruscas de concentração, favorecendo um perfil terapêutico mais estável e prolongado. Isso é especialmente desejável em terapias tópicas de longo prazo, em mucosas ou tecidos sensíveis, e também em aplicações veterinárias, onde a segurança do animal e potencial contaminação de produtos derivados (no caso de animais destinados ao consumo humano) devem ser considerados (DUARTE ET AL., 2024A; VELOSO & CASTANHEIRA, 2023B). Outro ponto positivo da nanotecnologia é a possibilidade de reduzir a irritação ou toxicidade local associadas à aplicação

tópica ou mucosa de fármacos com capacidade irritativa, pois a liberação controlada evita altas concentrações transitórias de fármaco e distribui o ativo de forma mais uniforme ao longo do tempo, o que pode favorecer a tolerabilidade, especialmente em mucosas sensíveis. Essa suavização da liberação é particularmente relevante quando se trata de fármacos com potencial irritante ou de ação local intensa (GUGLEVA & ANDONOVA, 2023C)

De uma forma geral, o tamanho nanométrico também favorece a penetração e distribuição em nichos anatômicos restritos, como microfissuras, dobras ou criptas mucosas. Partículas pequenas o suficiente podem penetrar em espaços estreitos e permitir que o fármaco alcance locais inacessíveis, quando comparados a algumas formulações convencionais (géis, pomadas, soluções), onde o acesso é dificultado por barreiras físicas ou pela estrutura da mucosa. (GUGLEVA & ANDONOVA, 2023B; VELOSO & CASTANHEIRA, 2023B). Nesses casos em que o tamanho das nanopartículas são determinantes no efeito final da fórmula farmacêutica, a avaliação da estabilidade da formulação, a reprodutibilidade do processo, a toxicidade local e sistêmica, e escalabilidade demandam atenção ainda mais rigorosa para assegurar que o fármaco mantenha integridade e perfil de liberação desejado (SATO ET AL., 2023)

No contexto da produção em escala industrial ou semi-industrial de nanocarregadores farmacêuticos, é importante que sejam empregados métodos reproduzíveis e rigorosamente controlados, nos quais parâmetros críticos como tamanho, índice de polidispersão (PDI), carga superficial, eficiência de encapsulamento e perfil de liberação sejam monitorados sistematicamente, uma vez que tais fatores exercem impacto direto sobre a qualidade, segurança e vida útil da formulação(VELOSO & CASTANHEIRA, 2023). Conforme destacado em revisões sobre fármacos nanoestruturados, a transição bem-sucedida do desenvolvimento de bancada para a etapa de pesquisa clínica, demanda não apenas a padronização rigorosa dos processos de manufatura, mas também a validação robusta de todos os parâmetros de controle de qualidade. (VELOSO & CASTANHEIRA, 2023)

Intrinsecamente associada aos requisitos de manufatura, a seleção dos materiais constituintes da nanopartícula deve ser fundamentada em critérios de biocompatibilidade, biodegradabilidade e perfil toxicológico favorável. Nesse sentido, lipídios fisiológicos e polímeros biodegradáveis têm sido preferencialmente empregados, dado que tais materiais evitam o acúmulo de substâncias exógenas nos tecidos, reduzem o risco de reações adversas e facilitam a excreção ou degradação natural dos componentes nanoestruturados (GUGLEVA & ANDONOVA, 2023A; VELOSO & CASTANHEIRA, 2023). Estas características revelam-se relevantes em aplicações veterinárias, nas quais os produtos derivados do animal tratado, como por exemplo o leite, a carne ou os ovos, podem ser destinados ao consumo humano, exigindo, portanto, atenção adicional quanto à segurança e à presença de resíduos (GUGLEVA & ANDONOVA, 2023A; VELOSO & CASTANHEIRA, 2023).

Especificamente para fármacos como o metronidazol, cuja aplicação ocorre predominantemente em ambientes mucosos ou por via tópica, os nanocarreadores oferecem vantagens substanciais ao proteger o fármaco contra degradação prematura, permitir sua liberação sustentada e direcionada, e prolongar a permanência no local de ação, aspectos que podem resultar em melhoria da eficácia terapêutica e redução de recidivas (DUARTE ET AL., 2024). Segundo estes autores, a experiência acumulada com formulações nanoestruturadas contendo fármacos antimicrobianos, antimicóticos, anti-inflamatórios e antiparasitários demonstra que essa abordagem constitui uma estratégia promissora e tecnicamente viável (DUARTE ET AL., 2024).

Não obstante, para que a aplicação segura de nanocarreadores em sistemas mucosos seja assegurada, torna-se essencial que sejam conduzidos estudos abrangentes de irritabilidade local e toxicologia sistêmica, acompanhados de avaliações rigorosas de biocompatibilidade e potencial imunogênico, bem como da caracterização do comportamento das nanopartículas quando em contato direto com a mucosa ou com a mucina (DUARTE ET AL., 2024; SATO ET AL., 2023; VELOSO & CASTANHEIRA, 2023). Tal necessidade baseia-se no fato de que as interações estabelecidas com proteínas, carboidratos, fosfolipedes e outros componentes da microambiente biológico podem promover alterações significativas nas propriedades originais do sistema nanoestruturado, incluindo raio hidrodinâmico, carga superficial e perfil de liberação ((DUARTE ET AL., 2024; SATO ET AL., 2023; VELOSO & CASTANHEIRA, 2023). Nesse contexto, fenômenos como a formação de corona proteica sobre a nanopartícula, a deposição de camadas de muco sobre a superfície particulada e a eventual remoção mediada pelo fluxo mucociliar natural constituem fatores críticos que podem comprometer substancialmente a eficácia terapêutica pretendida (DUARTE ET AL., 2024; SATO ET AL., 2023; VELOSO & CASTANHEIRA, 2023). Assim, visando superar tais limitações e otimizar a performance terapêutica, estratégias de funcionalização têm sido implementadas para conferir aos nanocarreadores capacidade de resposta a estímulos ambientais específicos, incluindo variações de pH, presença de enzimas e potencial redox, de modo que a liberação do fármaco seja desencadeada preferencialmente ao atingir o sítio-alvo de ação, resultando em maior seletividade e redução de efeitos adversos em locais não-alvo (VELOSO & CASTANHEIRA, 2023). Este mecanismo de "liberação inteligente" revela-se particularmente vantajoso em abordagens terapêuticas que demandam ação farmacológica restrita ao local de aplicação, como observado no tratamento de infecções localizadas em mucosas ou em intervenções envolvendo tecidos de elevada sensibilidade (VELOSO & CASTANHEIRA, 2023)

De forma complementar às estratégias de resposta do sistema nanoparticulado a estímulos, a superfície das nanopartículas pode ser modificada mediante revestimento com polímeros de propriedades mucoadesivas (e.g. quitosana) ou pela conjugação de ligantes específicos, abordagens que visam potencializar a penetração ou prolongar a retenção na camada mucosa, promover direcionamento celular seletivo ou, ainda, facilitar a

permeação através de barreiras biológicas (Sato et al., 2023). Tal capacidade de funcionalização amplia substancialmente o espectro de possibilidades no design farmacêutico, permitindo que as formulações sejam adaptadas de forma racional às características anatômicas e fisiológicas do tecido-alvo, bem como ao perfil farmacocinético e farmacodinâmico desejado para cada estratégia terapêutica (Sato et al., 2023).

Do ponto de vista prático de formulação destinada ao uso veterinário, como por exemplo, em aplicações na mucosa prepucial bovina , essa flexibilidade de design possibilita a personalização do sistema de acordo com as condições anatômicas, ambientais e fisiológicas específicas do animal, incluindo a composição da mucosa, a presença de secreções, o pH local e as possíveis perdas decorrentes de lambedura ou exposição ao ambiente externo, entre outras variáveis relevantes. Dessa forma, a nanotecnologia configura-se como uma ferramenta altamente adaptável e promissora para esse tipo de aplicação

Apesar de todo o potencial teórico e experimental já descrito na literatura, a translação de sistemas nanoetruturados para aplicações práticas ainda enfrenta barreiras importantes, que incluem questões regulatórias, padronização de métodos de produção em escala industrial, controle de qualidade, avaliação de segurança e toxicidade a longo prazo, viabilidade econômica e aceitabilidade pelo produtor ou usuário final (Samanthula et al., 2022; Sato et al., 2023). A literatura científica aponta que muitos fármacos nanoestruturados permanecem em fase pré-clínica ou de pesquisa, especialmente em contextos veterinários, o que evidencia a necessidade de esforços contínuos de desenvolvimento, validação e regulação para viabilizar sua aplicação real (Samanthula et al., 2022; Sato et al., 2023).

2.4 - Sistemas mucoadesivos para administração de fármacos

A utilização de sistemas mucoadesivos para liberação controlada de fármacos em superfícies mucosas têm sido intensificada nos últimos anos, impulsionada pela necessidade de prolongar o tempo de residência da formulação no local de aplicação e aprimorar a eficácia terapêutica local, com concomitante redução da frequência de reaplicação. (Pandey et al., 2022) Nesse contexto, sistemas que combinam nanocarregadores com polímeros mucoadesivos têm demonstrado ganhos de eficiência em relação a formulações convencionais quando considerado o direcionamento de moléculas ativas em superfícies mucosas, protegendo o fármaco contra remoção precoce e possibilitando sua liberação sustentada no local de interesse e, com isso, conseguido tempo de faixa terapêutica mais estáveis e previsíveis nesse tecido biológico.(Pandey et al., 2022)

A base físico-química que fundamenta o fenômeno da mucoadesão envolve múltiplos mecanismos interdependentes. Além da simples adsorção mediada por forças de van der Waals ou ligações de hidrogênio, também observa-se a interpenetração de cadeias poliméricas na rede tridimensional de mucina que forma o glicocálix, ocorrência de interações eletrostáticas (particularmente quando polímeros catiônicos são empregados), incrementos na

otimização da molhabilidade da formulação e, dependendo da natureza química do polímero, potencial formação de ligações covalentes. A eficácia da adesão mucosa é determinada diretamente por propriedades como peso molecular do polímero, densidade de grupos funcionais, conformação da cadeia polimérica e carga superficial, bem como pelas características intrínsecas da mucosa-alvo, incluindo pH, viscosidade e taxa de renovação do muco (Ahmad et al., 2021).

Em tempos mais recentes do desenvolvimento científico, a polimerização e modificação química de biopolímeros mucoadesivos têm sido mais exploradas com o objetivo de superar limitações inerentes aos sistemas mucoadesivos convencionais. Um exemplo é representado pelo uso de nanocarreadores à base de quitosana, cuja aplicabilidade é justificada por sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e pela presença de grupos amino que, em condições de pH favorável, conferem carga positiva à superfície da nanopartícula, favorecendo sua interação eletrostática com a mucina.(de Sousa Victor et al., 2020) Segundo os autores, tais características têm destacado o papel da quitosana como matriz estrutural ou de revestimento de nanopartículas, géis, filmes e outras formas farmacêuticas destinadas a aplicações mucosas.(de Sousa Victor et al., 2020)

Todavia, mesmo a quitosana apresentando vários pontos positivos em seu uso farmacotécnico, este biopolímero também possui limitações inerentes, particularmente no que concerne à sua solubilidade e mucoadesividade, ambas dependentes de pH ácido, o que pode comprometer a eficiência de adesão em mucosas onde o pH é neutro ou variável .(Amin & Boateng, 2022) Para mitigar tais limitações, modificações de superfície têm sido adotadas, incluindo o revestimento com polímeros adicionais, como por exemplo o polietilenoglicol (PEG) ou alguns poliânions (e.g. alginato), estratégias estas que visam aumentar a estabilidade, a mucoadesão e a compatibilidade do sistema em diferentes ambientes fisiológicos.(Amin & Boateng, 2022)

Paralelamente ao aprimoramento dos sistemas mucoadesivos tradicionais, tem crescido o interesse por estratégias híbridas que combinam mucoadesão com capacidade de penetração através da camada mucosa, denominadas "muco-deslizantes" ou "muco-penetrantes" (Amin & Boateng, 2022; Zheng et al., 2025). Recentemente, revisões de literatura têm descrito sistemas denominados "mucoadhesive-to-mucopenetrating nanoparticles", nos quais a superfície do nanocarreador é projetada de modo a permitir, inicialmente, adesão à camada mucosa, seguida de translocação através da rede de mucina, atingindo o epitélio subjacente e, consequentemente, aumentando a eficácia do direcionamento do fármaco.(Amin & Boateng, 2022; Zheng et al., 2025)

Uma vantagem importante atribuída a esses sistemas de função dual, isto é, mucoadesiva e mucopenetrante, reside na possibilidade de proporcionar tanto retenção superficial quanto penetração profunda no glicocálix, característica que se revela particularmente relevante para mucosas dotadas de estruturas complexas e com camadas espessas de muco. (Zheng et al., 2025) Essa flexibilidade de design amplia substancialmente as possibilidades de aplicação

em contextos variados, incluindo mucosas respiratória, oral, vaginal ou ocular.(Zheng et al., 2025)

No que tange à segurança e biocompatibilidade desses sistemas nanoestruturados mucoadesivos, verificações recentes têm indicado que nanopartículas baseadas em quitosana e seus derivados exibem baixo perfil de citotoxicidade em uma variedade de ensaios *in vitro* e *in vivo*, fortalecendo a viabilidade de uso clínico, embora haja necessidade de que todo novo sistema modificado deva ser avaliado individualmente quanto à sua segurança. (Frigaard et al., 2022)

Assim, de uma forma geral, o desenvolvimento racional de sistemas mucoadesivos modernos exige uma abordagem multidisciplinar, na qual sejam combinadas caracterização físico-química e biológicas detalhadas, incluindo tamanho, índice de polidispersão (PDI), potencial zeta, estabilidade, eficiência de encapsulamento, avaliação de propriedades mucoadesivas e/ou mucopenetrantes, testes de liberação e permeação (in vitro, ex vivo e in vivo), além de considerações rigorosas de biocompatibilidade, segurança e escalabilidade. (Ferreira & Zucolotto, 2024) Tais premissas são essenciais para garantir que a formulação desenvolvida seja não apenas eficaz, mas também segura, especialmente em aplicações médicas que apresentam implicações práticas e regulatórias específicas.(Ferreira & Zucolotto, 2024)

2.5 - Quitosana

A quitosana é um biopolímero natural derivado da quitina, a qual constitui o principal componente estrutural do exoesqueleto de crustáceos como caranguejos, camarões e lagostas. (Yaneva et al., 2020) Sua estrutura química é composta por unidades de β-(1,4)-2-acetamido-D-glicose e β-(1,4)-2-amino-D-glicose, conferindo-lhe caráter policatiônico. (Yaneva et al., 2020) Em virtude de suas peculiares características que incluem biocompatibilidade, biodegradabilidade, ausência de toxicidade em baixas concentrações e biodisponibilidade, as nanopartículas de quitosana têm sido selecionadas como candidatas ideais para diversas aplicações médicas e farmacêuticas, abrangendo curativos, engenharia de tecidos e componente de veículos farmacêuticos para administração de medicamentos(Filipowska et al., 2018; Jing et al., 2020; Neto et al., 2021; Niaz et al., 2019) Em adição, a flexibilidade estrutural da quitosana permite que sejam realizadas modificações químicas capazes de aprimorar seu desempenho como nanocarreador, como por exemplo, a realização de reticulações iônicas ou químicas para ajustar a carga superficial, o tempo de degradação e o perfil de liberação do fármaco (Gagliardi et al., 2023). Em estudo recente envolvendo nanopartículas de quitosana reticuladas demonstrou-se que a nanoestrutura proporciona forte aderência a mucosas e promove a liberação gradual do fármaco em aplicações intranasais (Gagliardi et al., 2023). Para os autores, tais sistemas podem ser adaptados para aumentar a penetração nas camadas mucosas, prolongar o contato com o tecido e reduzir a necessidade de reaplicações frequentes (Gagliardi et al., 2023).

A aplicação veterinária da quitosana encontra-se em expansão, por exemplo, em aves, foi demonstrado efeito imunomodulador da quitosana quando empregada na forma de nanopartícula em suplementos, evidenciando sua versatilidade além da liberação de fármacos convencionais(Ahmad et al., 2023). Em peixes de couro, nanopartículas de quitosana reticuladas com tripolifosfato demonstraram potencial uso para veicular fármacos em peixes imergidos em uma suspensão de nanopartículas por minutos e, as mesmas se aderirem em toda a superfície dos peixes, às brânquias e serem identificadas ao longo do trato gastrintestinal (Costa et al., 2016). Por sua vez, em bovinos, nanopartículas de quitosana foram utilizadas para encapsular o papiloma vírus bovino inativado em vacinas(BRITO et al., 2025). Assim, esse panorama sugere que, a quitosana poderia não apenas servir como veículo para o fármaco, mas também contribuir com efeitos adjuvantes tais como proteção da mucosa, modulação da microbiota residente e mitigação da inflamação local associada à infecções (Ahmad et al., 2023).

Desta forma, o uso de nanopartículas mucoadesivas para liberação sustentada de fármacos pode resultar em elevação da retenção local do medicamento e, consequentemente, em incremento da eficácia terapêutica de medicamentos de uso tópico(Niaz et al., 2019), o que pode ser de alta aplicabilidade na medicina veterinária. No contexto da produção de nanopartículas mucoadesivas, durante o planejamento de uma formulação tópica, tornam-se relevantes aspectos tecnológicos como a capacidade de produção em escala de nanopartículas com distribuição de tamanho homogêneas (< 300 nm), carga superficial positiva moderada (por exemplo, +20 a +40 mV) para assegurar mucoadesão eficiente, estabilidade coloidal em formulações aquosas ou semissólidas, e liberação controlada adaptada à frequência de aplicações do medicamento (Pereira Parchen et al., 2025). De acordo com os autores, o sistema nanoparticulado de quitosana tem aplicação tanto na área farmacêutica humana, quanto veterinária, além de sugerir que as especificações supracitadas são factíveis de serem alcançasdas e eficazes para aplicação clínica (Pereira Parchen et al., 2025). Além disso, a ausência de solventes tóxicos e o emprego de materiais recicláveis ou biodegradáveis , reforçam a compatibilidade do uso de sistemas nanoparticulados baseados em quitosana com boas práticas agropecuárias e com rebanhos de produção. (Pereira Parchen et al., 2025)

3 - Hipótese de Trabalho

A incorporação do metronidazol em nanopartículas mucoadesivas de quitosana será capaz de aumentar o tempo de residência do fármaco na mucosa prepucial bovina, promover liberação controlada e maior concentração local do princípio ativo, resultando em maior eficácia antiprotozoária in vitro contra *Tritrichomonas foetus* quando comparado ao metronidazol livre, além de reduzir a necessidade de doses sistêmicas e potencialmente minimizar efeitos adversos e falhas terapêuticas associadas à baixa penetração farmacológica nas criptas prepuciais.

3.1-Objetivo Geral

Desenvolver e caracterizar uma formulação farmacêutica nanoestruturada mucoadesiva contendo metronidazol, baseada em nanopartículas de quitosana, destinada à aplicação tópica na mucosa prepucial bovina, visando o tratamento da tricomonose bovina causada por *Tritrichomonas foetus*.

3.2-Objetivos Específicos

- Sintetizar nanopartículas de quitosana contendo metronidazol por meio do método de gelificação iônica utilizando tripolifosfato de sódio (TPP) como agente reticulante.
- Caracterizar físico-quimicamente as nanopartículas obtidas quanto ao tamanho médio hidrodinâmico, índice de polidispersão (PDI), potencial zeta e morfologia.
- Avaliar a eficiência de encapsulação do metronidazol nas nanopartículas por técnicas cromatográficas e espectrofotométricas.
- Investigar a estabilidade físico-química das nanopartículas ao longo do tempo, bem como a viabilidade do processo de liofilização e redispersão.
- Comparar a atividade antiprotozoária **in vitro** do metronidazol nanoencapsulado com o metronidazol livre frente a culturas de *Tritrichomonas foetus*.
- Avaliar o potencial mucoadesivo e a adequação tecnológica da formulação para aplicação tópica na mucosa prepucial bovina.

4 - Materiais e Métodos

4.1- Quantificação

A quantificação do metronidazol foi realizada por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas em triplo quadrupolo (UPLC-MS/MS) TQSmicro, utilizando equipamento Waters®, com base em um método previamente validado por (Stancil et al., 2018). O procedimento consistiu da ampliação de escopo conduzida conforme as diretrizes do International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use Q2(R1) (ICH), contemplando os parâmetros de linearidade, precisão, exatidão, seletividade, limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ), bem como robustez.

4.1.1- Linearidade

A linearidade foi avaliada por meio da construção de curva analítica utilizando soluções padrão de metronidazol (Sigma-Aldrich) preparadas em matriz compatível com o sistema nanoparticulado. Foram preparados seis níveis

de concentração distribuídos ao longo da faixa previamente estabelecida (1 – 10 – 25 – 50 – 75 – 100 ppb), com injeções em triplicata para cada ponto.

A relação entre a razão da área do analito e do padrão interno Sulfatiazol, versus a concentração nominal foi submetida à regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. Foram determinados o coeficiente angular, intercepto e coeficiente de determinação (R^2). A significância estatística da regressão foi avaliada por meio da análise de variância (ANOVA), considerando-se significativo $p < 0,05$. A homocedasticidade dos resíduos foi verificada por meio do teste de Cochran, enquanto a normalidade dos resíduos foi avaliada pelo teste de Shapiro–Wilk. A presença de valores discrepantes foi investigada utilizando o teste de Grubbs. A adequação do modelo linear foi confirmada pela ausência de falta de ajuste significativa (*lack of fit*), conforme ANOVA da regressão.

4.1.2 - Precisão

A precisão foi determinada em dois níveis: repetibilidade (intra-dia) e precisão intermediária (inter-dia). A repetibilidade foi avaliada por meio da análise de três injeções independentes em cada nível de concentração no mesmo dia, sob condições experimentais idênticas. A precisão intermediária foi determinada por análises realizadas em dias distintos, com preparo independente das soluções padrão.

Os resultados foram expressos como desvio padrão relativo (RSD%). A comparação entre médias obtidas em dias distintos foi realizada por meio do teste t de Student para amostras independentes, considerando nível de significância de 5%. A homogeneidade das variâncias foi previamente verificada pelo teste F. A precisão foi considerada adequada quando os valores de RSD permaneceram dentro dos limites recomendados para métodos quantitativos, sem diferença estatisticamente significativa entre os conjuntos avaliados ($p > 0,05$).

4.1.3 - Exatidão

A exatidão foi avaliada por meio de ensaios de recuperação, empregando o método de adição padrão à matriz nanoparticulada isenta de metronidazol. Quantidades conhecidas do analito foram adicionadas em três níveis de concentração (baixo, médio e alto), dentro da faixa linear do método (10 – 50 – 100 ppbs). As amostras foram preparadas e analisadas em triplicata.

Os percentuais de recuperação foram calculados pela razão entre a concentração determinada experimentalmente e a concentração teórica adicionada. A comparação entre os níveis de concentração foi realizada por análise de variância (ANOVA one-way), verificando-se a ausência de diferenças estatisticamente significativas entre os níveis avaliados ($p > 0,05$). A exatidão foi considerada satisfatória quando os valores de recuperação permaneceram dentro da faixa preconizada para métodos quantitativos (ICH).

4.1.4 - Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram estimados com base nos parâmetros estatísticos da curva analítica, considerando o desvio padrão da resposta (σ) e o coeficiente angular da regressão (S), conforme descrito no ICH Q2(R1). Os valores foram calculados empregando as equações:

$$LOD = 3{,}3\ (\sigma/S)$$
$$LOQ = 10\ (\sigma/S)$$

A confirmação experimental do LOQ foi realizada por meio da avaliação da precisão e exatidão no menor nível de concentração quantificável, sendo analisados os critérios de RSD e recuperação. A consistência estatística dos resultados nessa faixa foi verificada por análise descritiva e comparação com os demais níveis da curva.

4.2.Estudo de estabilidade do metronidazol no meio aceptor (acetato de amônio)

A estabilidade do metronidazol (MTZ) no meio aceptor foi avaliada com o objetivo de verificar a manutenção da integridade do analito nas condições experimentais empregadas nos ensaios subsequentes. O meio aceptor consistiu em tampão acetato de amônio ajustado para pH 4,5. O preparo do tampão foi realizado por dissolução do acetato de amônio em água ultrapura, seguido de ajuste de pH com ácido acético glacial (0,5M) ou hidróxido de amônio (1M), quando necessário. O pH final foi confirmado por potenciometria utilizando pHmetro devidamente calibrado.

4.2.1 – Preparo da solução

Uma solução padrão de metronidazol foi preparada no tampão acetato de amônio em concentração previamente definida dentro da faixa linear do método analítico validado (100 ppbs). A solução foi acondicionada em frascos de vidro âmbar hermeticamente fechados, a fim de evitar degradação fotoquímica, e mantida sob temperatura controlada de 4 ± 2 °C, ao abrigo da luz.

4.2.2 - Quantificação

Alíquotas independentes (n = 3) foram analisadas nos tempos de 5, 10, 15, 20 e 21 dias. Em cada tempo experimental, as amostras foram retiradas e analisadas imediatamente por UPLC-MS/MS, nas condições previamente validadas. A quantificação foi realizada por meio de curva analítica construída no mesmo meio aceptor, de modo a minimizar efeitos de matriz.

A estabilidade foi expressa como porcentagem da concentração remanescente em relação à concentração inicial (tempo zero), considerada como 100%. Os resultados foram apresentados como média ± desvio padrão (n = 3). A variação percentual ao longo do tempo foi calculada para determinar a taxa de degradação do analito nas condições avaliadas.

Como critério de aceitação, considerou-se estável a amostra cuja concentração permanecesse dentro da faixa de 90–110% do valor inicial,

conforme recomendações regulatórias para estudos de estabilidade de fármacos (FDA-2002-D-0222).

4.3.Caracterização da quitosana – Determinação do grau de desacetilação (GD)

A determinação do GD foi realizada por titulação ácido–base, conforme metodologia descrita na literatura. Inicialmente, uma massa pesada de quitosana 0,100 mg, foi dissolvida em 100 mL de solução de ácido clorídrico (HCl-[0,1mol/l]) padronizada, sob agitação magnética contínua, até completa solubilização do polímero e protonação dos grupos amino livres ($–NH_2 \rightarrow –NH_3^+$). A solução foi mantida sob agitação por tempo suficiente para garantir equilíbrio químico (24 horas).(Zhang et al., 2011)

Posteriormente, a solução foi titulada com hidróxido de sódio (NaOH – [0,05M]) padronizado, adicionado gradualmente sob agitação constante. O monitoramento do pH foi realizado por potenciometria utilizando pHmetro previamente calibrado. A curva de titulação foi construída a partir do registro do pH em função do volume de NaOH adicionado.

Durante o processo de titulação, observou-se inicialmente a neutralização do excesso de ácido clorídrico livre em solução, seguida da desprotonação dos grupos amônio ($–NH_3^+$) presentes na cadeia polimérica da quitosana. A curva potenciométrica apresentou dois pontos de inflexão distintos, correspondentes às duas etapas de neutralização. O volume de NaOH correspondente à segunda inflexão foi utilizado para o cálculo estequiométrico da concentração de grupamentos amino livres.

O grau de desacetilação foi calculado com base na quantidade de grupos amino tituláveis, considerando a massa da amostra analisada e os volumes consumidos de ácido e base padronizados. O resultado foi expresso em percentual (%), representando a fração molar de unidades desacetiladas presentes na cadeia polimérica.

O grau de desacetilação (GD) foi calculado a partir da diferença entre os volumes de NaOH correspondentes ao primeiro (V_1) e segundo (V_2) pontos de equivalência da curva potenciométrica, utilizando a seguinte equação:

$$GD\ (\%) = [(CNaOH \times (V_2 - V_1) \times 161) / m] \times 100$$

onde, CNaOH corresponde à concentração da solução titulante (mol/L), $V_2 - V_1$ representa o volume de base consumido na desprotonação dos grupos amônio (L), 161 g/mol refere-se à massa molar da unidade monomérica desacetilada da quitosana em corresponde à massa da amostra analisada (g).

4.4 - Síntese das Nanopartículas de Quitosana por Gelificação Ionotrópica

As nanopartículas de quitosana foram preparadas pelo método de gelificação ionotrópica, utilizando tripolifosfato de sódio (TPP) como agente reticulante aniônico.

4.4.1 - Preparo da solução de quitosana

A quitosana de baixo peso molecuar (Sigma-Aldrich) previamente caracterizada quanto ao grau de desacetilação foi utilizada na concentração de 1,0 mg/mL. Para o preparo, a massa correspondente foi dissolvida em solução aquosa de ácido acético a 2% (v/v).

Para cada 100 mL de solução foram utilizados:

- 1,0 g de quitosana
- 2 mL de ácido acético glacial
- Volume completado com água ultrapura (Milli-Q)

A solução permaneceu sob agitação magnética contínua (600 rpm) por 24 horas, à temperatura ambiente (25 ± 2 °C), até completa solubilização do polímero.

Após dissolução, o pH foi ajustado para os valores experimentais desejados (3,0; 4,5 ou 5,5) utilizando solução de hidróxido de sódio 1,0 mol/L, com monitoramento por pHmetro previamente calibrado.

4.4.2 - Preparo da solução de TPP

O tripolifosfato de sódio (Sigma-Aldrich) foi dissolvido em água ultrapura na concentração de 1,0 mg/mL, sob agitação magnética até completa solubilização. A solução foi preparada imediatamente antes do uso.

4.4.3 - Formação das nanopartículas

A formação das nanopartículas ocorreu por gotejamento (1 gota/5segundos) da solução de TPP à solução de quitosana sob agitação magnética constante.

A adição foi realizada por gotejamento controlado (aproximadamente 1 gota a cada 5 segundos), nas seguintes proporções volumétricas de quitosana:TPP:

- 1:1
- 3:1
- 6:1

O volume final de cada formulação foi padronizado conforme o delineamento experimental.

Após a adição completa do TPP, o sistema permaneceu sob agitação por 30 minutos para estabilização da reticulação iônica.

O delineamento foi conduzido em esquema fatorial 3 × 3 × 3, no qual foram avaliados:

- pH de síntese (3,0; 4,5; 5,5)
- Razão quitosana:TPP (1:1; 3:1; 6:1)

- Tempo de armazenamento (1 hora, 24 horas e 168 horas)

As formulações preparadas na razão 1:1 apresentaram precipitação visível e foram desconsideradas nas etapas subsequentes de caracterização.

4.4.4 - Estabilização e armazenamento

Após a síntese, as suspensões foram acondicionadas em frascos de vidro âmbar hermeticamente fechados e armazenadas sob refrigeração (4 ± 2 °C). Para avaliação da estabilidade coloidal inicial, as amostras foram analisadas após 1 hora, 24 horas e 168 horas (7 dias).

4.5 - Caracterização Físico-Química das Nanopartículas

4.5.1 - Determinação do tamanho hidrodinâmico, índice de polidispersão e potencial Zeta

O diâmetro hidrodinâmico médio e o índice de polidispersão (PDI) foram determinados por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS), utilizando equipamento Zetasizer Nano (Malvern Instruments). As análises foram realizadas a 25 °C, com ângulo de detecção de 173°. Cada amostra foi analisada em triplicata, sendo os resultados expressos como média ± desvio padrão.

4.5.2- Caracterização Morfológica por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia das nanopartículas de quitosana foi avaliada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) em um equipamento 6701F JEOL. Foram analisadas nanopartículas produzidas em pH 4,5, na razão quitosana:TPP de 3:1, selecionadas com base nos resultados preliminares de estabilidade coloidal. As análises foram realizadas pelo Laboratório Nacional de Nanotecnologia do Agronegócio.

Para tanto, uma alíquota da suspensão de nanopartículas foi previamente diluída em água ultrapura e submetida à secagem controlada para obtenção do material sólido. Para análise, uma pequena quantidade da amostra seca foi depositada sobre suporte metálico (*stub*) utilizando fita condutiva de carbono. As amostras foram submetidas à metalização por sputtering com uma fina camada de ouro em equipamento Sputter Coater SCD 050 Leica por 90 segundos com 40 mA.

As imagens foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura operando sob alto vácuo, com tensão de aceleração ajustada conforme as características da amostra (tipicamente entre 5 e 15 kV). Diferentes ampliações foram utilizadas para avaliação da morfologia e da distribuição dimensional das partículas.

4.5.3 - Caracterização Morfológica por Microscopia de Força Atômica (AFM)

A Microscopia de Força Atômica foi realizada em um equipamento EasyScan 2 (NanoSurf, Suíça), com auxílio de uma sonda Tap 190Al-G (Budget-Sensors,

Bulgária) no modo de contato intermitente. Para tanto as amostras foram previamente depositadas e secas em uma superfície de Mica, seguida de aspersão de um jato fraco de N_2 para remoção de material particulado solto.

4.6Avaliação das Estratégias de Incorporação do Metronidazol

Foram investigadas três estratégias distintas de incorporação do metronidazol (MTZ) durante o processo de formação das nanopartículas de quitosana (Q) reticuladas com tripolifosfato de sódio (TPP), com o objetivo de avaliar a influência da sequência de adição dos componentes nas propriedades físico-químicas do sistema e na eficiência de encapsulamento do fármaco.

Todas as formulações foram preparadas utilizando solução de quitosana na concentração de 1,0 mg/mL e solução de TPP na concentração de 1,0 mg/mL, em pH 4,5, mantendo-se a razão volumétrica quitosana:TPP de 3:1, sob agitação magnética constante (600 rpm) e temperatura ambiente (25 ± 2 °C).

Estratégia 1 – Formação prévia da nanopartícula seguida da adição do fármaco ((Q + TPP) + MTZ)

Inicialmente, as nanopartículas foram formadas pela adição controlada da solução de TPP à solução de quitosana, promovendo a reticulação iônica do polímero. Após 30 minutos de estabilização do sistema, o metronidazol previamente solubilizado foi adicionado à suspensão nanoparticulada sob agitação magnética contínua, permanecendo em homogeneização por 60 minutos.

Estratégia 2 – Pré-incorporação do fármaco à quitosana seguida da reticulação ((Q + MTZ) + TPP)

O metronidazol foi inicialmente dissolvido na solução de quitosana (1,0 mg/mL), permanecendo sob agitação magnética por 60 minutos para garantir completa homogeneização e interação inicial fármaco-polímero. Em seguida, a solução de TPP foi adicionada por gotejamento controlado (uma gota a cada cinco segundos), na razão volumétrica de 3:1 (quitosana:TPP), promovendo a formação das nanopartículas. O sistema foi mantido sob agitação por 30 minutos adicionais para estabilização da reticulação iônica.

Estratégia 3 – Adição simultânea do fármaco ao agente reticulante (Q + (TPP + MTZ))

O metronidazol foi inicialmente solubilizado na solução de TPP (1,0 mg/mL), sob agitação magnética até completa dissolução. A solução contendo TPP + MTZ foi então adicionada por gotejamento à solução de quitosana (1,0 mg/mL), mantendo-se a razão volumétrica de 3:1. Após a adição completa, o sistema permaneceu sob agitação por 30 minutos para estabilização da formação das nanopartículas.

4.7 - Determinação da Eficiência de Encapsulamento

A eficiência de encapsulamento (EE%) foi determinada por método indireto, quantificando-se a fração de metronidazol livre presente no meio após separação da fração nanoparticulada.

Para tanto, alíquotas das suspensões foram submetidas à ultrafiltração utilizando dispositivos contendo membrana com corte molecular de 10 kDa (Millipore). As amostras foram centrifugadas sob condições controladas (10.000 RPM, 5Cº, 10 minutos) até completa separação da fração permeável (ultrafiltrado), contendo o metronidazol não associado às nanopartículas (ZHANG; ZHANG, 2017). O ultrafiltrado foi coletado e analisado por UPLC-MS/MS nas condições previamente descritas para quantificação do fármaco.

Cálculo da eficiência de encapsulamento

A eficiência de encapsulamento foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$EE\ (\%) = [(C_{total} - C_{livre}) / C_{total}] \times 100$$

onde:

C_{total} corresponde à concentração inicial de metronidazol adicionada à formulação;
C_{livre} corresponde à concentração de metronidazol quantificada no ultrafiltrado.

As determinações foram realizadas em triplicatas autênticas, sendo os resultados expressos como média ± desvio padrão.

4.8 - Influência da Concentração Inicial de Metronidazol na Eficiência de Encapsulamento (EE%) e na Capacidade de Carregamento (LC%) das Nanopartículas de Quitosana

A influência da concentração inicial de metronidazol sobre a eficiência de encapsulamento (EE%) e a capacidade de carregamento (LC%) foi avaliada por meio da preparação de formulações contendo diferentes concentrações iniciais do fármaco (2,5; 5,0; 10,0 e 20,0 µg/mL), mantendo-se constantes os demais parâmetros de síntese das nanopartículas, incluindo pH do meio (4,5), razão quitosana:TPP (3:1) e condições de agitação.

A capacidade de carregamento (LC%) foi calculada com base na relação entre a quantidade de metronidazol efetivamente encapsulada e a massa total de nanopartículas recuperadas após o processo de síntese, conforme a equação:

$$LC\ (\%) = (MTZ_{encapsulado} / Massa_{total_nanopartículas}) \times 100$$

onde:
$MTZ_{encapsulado}$ corresponde à quantidade de fármaco retido nas nanopartículas;
$Massa_{total_nanopartículas}$ corresponde à massa de polímeros e MTZ encapsulado.

Para cada concentração avaliada, os experimentos foram realizados em triplicata independente (n = 3), incluindo preparo completo da formulação e etapa de separação. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão.

Os dados obtidos para eficiência de encapsulamento, quantidade total de fármaco encapsulado e capacidade de carregamento foram organizados em função da concentração inicial de metronidazol, permitindo a avaliação da influência da carga inicial do fármaco sobre o desempenho do sistema nanoestruturado.

4.9 - Avaliação da Estabilidade Físico-Química das Nanopartículas de Quitosana Contendo Metronidazol Durante Armazenamento

A estabilidade físico-química das nanopartículas de quitosana contendo metronidazol foi avaliada ao longo de três semanas de armazenamento, por meio da determinação do diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta.

Após a síntese por gelificação iônica, as dispersões nanoparticuladas foram acondicionadas em frascos de vidro âmbar, hermeticamente fechados, e armazenadas sob condições controladas de temperatura (25 ± 2 °C), protegidas da luz e da umidade. As análises foram realizadas nos tempos correspondentes à Semana 1, Semana 2 e Semana 3 após a preparação.

4.10 - Ensaio de liberação in vitro do metronidazol

O perfil de liberação *in vitro* do metronidazol livre e nanoencapsulado foi determinado por meio de ensaio de difusão utilizando sistema com membrana de diálise com corte molecular de 10 kda (Béduneau et al., 2014). Como meio aceptor foi empregado tampão de acetato de amônio ajustado para pH 4,5.

Para o ensaio, alíquotas das formulações contendo metronidazol livre ou metronidazol nanoencapsulado em nanopartículas de quitosana foram acondicionadas no compartimento doador, separado do compartimento aceptor por membrana de diálise previamente hidratada no meio experimental. O sistema foi mantido sob agitação constante de 120 RPM e temperatura controlada fisiológica de 38 Cº, garantindo homogeneidade do meio e condições reprodutíveis ao longo do experimento.

Em intervalos previamente estabelecidos (0, 15, 30, 60, 120, 210, 240 e 300 minutos), alíquotas do meio aceptor foram retiradas para quantificação do metronidazol liberado. Após cada coleta, o volume retirado (1mL) foi imediatamente reposto com igual volume de tampão fresco previamente aquecido à temperatura do ensaio, de modo a manter o volume total constante e assegurar a condição sink durante todo o experimento.

A condição sink foi estabelecida garantindo que a concentração do fármaco no meio aceptor permanecesse inferior a 20% de sua solubilidade de saturação, preservando o gradiente de concentração entre os compartimentos doador e aceptor. A quantificação do metronidazol nas amostras coletadas foi realizada pelo método de LC-MS/MS. Todos os ensaios foram realizados em

triplicatas autênticas, e os resultados foram expressos como média ± desvio padrão.

4.11 - Ensaio in vitro de inibição da proliferação de *Tritrichomonas foetus*

A atividade antiprotozoária do metronidazol livre (MTZ) e do metronidazol nanoencapsulado em nanopartículas de quitosana (NM) foi avaliada por meio de ensaio in vitro de inibição da proliferação de *Tritrichomonas foetus*, seguindo os mesmos padrões metodológicos descritos por Hernández et al. (Villafraz et al., 2018), com adaptações para as formulações desenvolvidas no presente estudo.

Para tanto, isolados de *Tritrichomonas foetus* foram mantidos em meio de cultura apropriado para protozoários trichomonadídeos, sob condições controladas de temperatura (37 °C) e atmosfera adequada, até atingirem fase logarítmica de crescimento. A fase exponencial foi confirmada por contagem em câmara de Neubauer, assegurando densidade celular padronizada antes da realização dos ensaios. As culturas foram ajustadas para concentração padronizada de parasitos viáveis por mililitro antes da distribuição nos grupos experimentais. Os ensaios foram conduzidos em placas estéreis de cultivo celular, contendo os seguintes grupos experimentais:

- **NM**: nanopartículas de quitosana contendo metronidazol;
- **NB**: nanopartículas de quitosana sem fármaco (controle de veículo);
- **MTZ**: metronidazol livre em solução;

Foram avaliadas as concentrações finais equivalentes a: 0,625 µg/mL; 1,25 µg/mL; 2,5 µg/mL; e 5 µg/mL de MTZ.

As concentrações das nanopartículas brancas (NB) foram ajustadas para corresponder à massa de veículo necessária para veicular as respectivas concentrações de metronidazol nos grupos NM.

As placas foram incubadas a 37 °C por 48 horas, sem renovação do meio, em condições estáticas. O tempo de incubação foi definido com base em estudos prévios de determinação de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração mínima letal (CML/MLC) para *T. foetus*. Após o período de incubação (48 horas), a viabilidade dos protozoários foi determinada por contagem direta em câmara de Neubauer, utilizando microscopia óptica.

A distinção entre parasitos viáveis e não viáveis foi realizada com base em: Motilidade ativa característica; Integridade morfológica; e ausência de sinais de lise celular. Os resultados foram expressos como número de parasitos vivos por mililitro (parasitos vivos/mL).

A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a menor concentração capaz de reduzir significativamente a proliferação parasitária em comparação ao grupo controle não tratado. Enaquanto que a concentração mínima letal (MLC) foi definida como a menor concentração capaz de promover

lise total dos protozoários ao final do período experimental, caracterizada pela ausência de parasitos viáveis detectáveis.

4.12 - Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata independente. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão. A comparação entre os grupos experimentais foi realizada por análise estatística apropriada (especificar: ANOVA seguida de pós-teste de Tukey, ou teste t, conforme utilizado), adotando-se nível de significância de 5% ($P < 0,05$), com auxílio do software PAST.

4.13 - Ensaio de viabilidade celular – Captação do Vermelho Neutro

A avaliação do potencial citotóxico das formulações foi realizada por meio do ensaio de captação do vermelho neutro, método baseado na capacidade de células viáveis incorporarem e acumularem o corante nos compartimentos lisossomais funcionalmente íntegros, conforme descrito por Mersch-Sundermann et al. (2004).

Foi utilizada a linhagem celular bovina eternizada MAC-T (Mammary Alveolar Cells – Transformed), mantida em meio de cultura apropriado suplementado com soro fetal bovino e antibióticos, sob condições controladas de incubação (37 °C, atmosfera umidificada contendo 5% de CO_2). As células foram semeadas em placas de 96 poços, em densidade previamente padronizada, e incubadas por 24 horas para permitir adesão e estabilização do crescimento celular antes da exposição aos tratamentos.

Após o período de adesão, o meio de cultura foi substituído por meio fresco contendo os seguintes grupos experimentais: Controle sem veículo (meio de cultura); Controle com veículo (água acidificada); Quitosana em macroescala; Nanopartículas de quitosana branca (NB), em massa equivalente à necessária para encapsular 5 µg/mL de metronidazol; Metronidazol livre (5 µg/mL); Metronidazol nanoencapsulado em nanopartículas de quitosana (NM), em concentração equivalente a 5 µg/mL de metronidazol.

A concentração de 5 µg/mL foi selecionada por corresponder à concentração mínima letal (MLC) previamente determinada para o metronidazol livre no ensaio antiparasitário. As células permaneceram expostas aos tratamentos por período previamente estabelecido (especificar: 24 ou 48 horas, conforme realizado), sob as mesmas condições de incubação.

Após o período de exposição, o meio contendo as formulações foi removido, e as células foram incubadas com solução de vermelho neutro previamente preparada e filtrada, em concentração padronizada, por tempo suficiente para incorporação lisossomal do corante (geralmente 2–3 horas a 37 °C).

Decorrido o período de incubação com o corante, as células foram lavadas cuidadosamente com solução tampão apropriada para remoção do excesso de corante extracelular. Em seguida, foi adicionada solução de extração (etanol/ácido acético ou solvente equivalente) para lise celular e solubilização do vermelho neutro incorporado. A absorbância foi medida em leitor de microplacas em comprimento de onda adequado (geralmente 540–570 nm).

A viabilidade celular foi expressa como porcentagem em relação ao grupo controle, considerado 100% de viabilidade. Todos os experimentos foram realizados em triplicata independente, com múltiplas réplicas técnicas por grupo experimental. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão. A análise estatística foi realizada utilizando teste apropriado para comparação múltipla entre grupos, adotando nível de significância de 5% ($P < 0,05$) com auxílio do software PAST.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Atividades e padronizações pré-experimentais para assegurar a confiabilidade dos resultados.

5.1.1. Ampliação de escopo do método analítico

A incerteza de medição constitui parâmetro metrológico crítico durante o desenvolvimento de novos produtos, pois quantifica a dispersão dos valores plausíveis atribuídos a um resultado analítico, refletindo o grau de confiança associado ao erro experimental. De uma forma geral, a incerteza não expressa o “erro verdadeiro”, mas delimita um intervalo probabilístico dentro do qual se espera que o valor real esteja contido. Dessa forma, sua estimativa adequada é essencial para a interpretação robusta de dados durante os processos de desenvolvimento, o que contribui tanto para assegurar a confiabilidade dos resultados finais, quanto para subsidiar tomadas de decisão na mudanças de estratégias experimentais. Assim, no que tange o desenvolvimento de formulações farmacêuticas utilizadas para animais sencientes, a validação dos métodos analíticos constitui etapa fundamental, uma vez que assegura que o método empregado no desenvolvimento farmacotécnico é adequado à sua finalidade, produz resultados precisos, exatos e reprodutíveis e atende às exigências regulatórias, haja vista que a validação é um processo que fornece evidência objetiva de que um procedimento analítico é eficaz e confiável para o propósito pretendido, assegurando a qualidade dos dados analíticos e a conformidade com padrões científicos e regulatórios aplicáveis ao desenvolvimento e controle de produtos farmacêuticos (ICH, 2005).

Neste sentido, previamente ao início das atividades experimentais, o método analítico para quantificação do metronidazol foi realizado seguindo as diretrizes ICH Q2 (R1/R2), contemplando as figuras de mérito: linearidade, faixa de trabalho, precisão, exatidão e, limites de detecção e quantificação.

A ampliação de escopo mostrou-se linear, com curva preditiva expressa pela equação y=0,01627x+0,00351 e coeficiente de correlação expresso com R^2 de 0,9945. A significância estatística da regressão foi confirmada por meio da análise dos parâmetros angular e linear da reta, bem como pelos testes estatísticos associados, apresentando de $P<0,05$. Os resultados demonstraram que o coeficiente angular é significativamente diferente de zero, enquanto o intercepto não compromete a linearidade do método, evidenciando a adequação do modelo matemático utilizado para a quantificação do metronidazol na matriz avaliada.

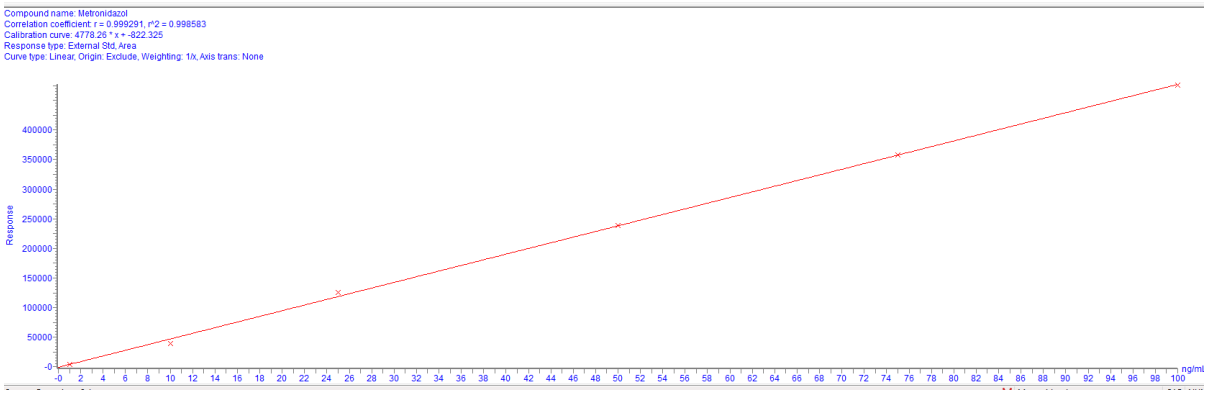

Figura 1- Representação da curva de calibração utilizada no caculo de linearidade do método.

A faixa de trabalho do método foi definida a partir da avaliação conjunta da linearidade, precisão e exatidão, contemplando concentrações inferiores e superiores às normalmente descritas em métodos convencionais. Essa ampliação de escopo está alinhada com a abordagem proposta por González et al. (2018), que demonstram a importância de validar métodos em faixas mais amplas para aplicações farmacêuticas e bioanalíticas (STANCIL ET AL., 2018B). Os resultados obtidos confirmam que o método mantém uma faixa de detecção de 1 a 100 ppbs o que representou um desempenho analítico satisfatório.

A precisão do método foi avaliada conforme preconizado pela diretriz Q2(R1) do International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, por meio da análise da repetibilidade (injeções independentes no mesmo dia) e da precisão intermediária (análises realizadas em dias distintos), sendo os resultados expressos em termos de desvio padrão relativo (RSD%). Para a repetibilidade, os valores de RSD% obtidos nos níveis de 10, 25, 50, 75 e 100 ppb foram de 2,73%, 2,21%, 3,40%, 0,70% e 7,41%, respectivamente.

A diretriz ICH Q2(R1) não estabelece limites numéricos fixos universais para aceitabilidade da precisão, recomendando que os critérios sejam definidos de acordo com a finalidade do método e a faixa de concentração analisada. Na prática analítica, para métodos de doseamento em concentrações da ordem de mg/mL ou porcentagem (%), valores de RSD ≤ 2% são frequentemente considerados indicativos de excelente precisão.

Entretanto, para métodos quantitativos em níveis de traço (faixa de µg/L ou ppb), critérios mais amplos são adotados por diretrizes internacionais. O guia de validação bioanalítica da U.S. Food and Drug Administration (2018) estabelece que a precisão deve apresentar coeficiente de variação ≤ 15% para amostras controle de qualidade em níveis baixo, médio e alto, e ≤ 20% no limite inferior de quantificação (LLOQ), que corresponde ao menor nível quantificável com precisão e exatidão aceitáveis.

De forma complementar, o guia “Fitness for Purpose of Analytical Methods” da Eurachem indica que, para concentrações próximas ao limite de quantificação — tipicamente na faixa inferior da curva analítica, frequentemente abaixo de 1–10 µg/L (1–10 ppb) em métodos de traço — valores de RSD entre 5% e 10% são geralmente considerados adequados, podendo atingir valores ainda maiores conforme previsto pela equação de Horwitz, a qual admite variabilidade crescente em baixas concentrações (por exemplo, RSD teórico aproximado de até 16% para concentrações na ordem de 1 ppb).

O documento DOQ-CGCRE-008 do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia também ressalta que não há limite fixo universal para precisão, indicando que a aceitabilidade deve considerar a concentração do analito, sendo esperado aumento do RSD em níveis mais baixos, especialmente próximos ao limite de quantificação.

Dessa forma, observa-se que os níveis de 10 a 75 ppb apresentaram RSD inferiores a 3,5%, caracterizando excelente precisão para análises em nível de traço. O valor observado em 100 ppb (7,41%), embora superior aos demais, permanece significativamente abaixo dos limites de 15% estabelecidos pelo FDA para métodos quantitativos e dentro da faixa de 5–10% indicada pelo guia Eurachem para concentrações próximas ao limite inferior da curva analítica, demonstrando que o método apresenta precisão adequada para a faixa estudada.

Por sua vez, a exatidão do método foi avaliada por meio de ensaios de recuperação, nos quais quantidades conhecidas de metronidazol foram adicionadas à matriz e posteriormente determinadas pelo método analítico desenvolvido. Os percentuais de recuperação obtidos variaram entre 98,6% e 101,2%, situando-se dentro da faixa recomendada pela diretriz International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use Q2(R1), que estabelece, para métodos de doseamento de fármacos, valores aceitáveis tipicamente entre 98% e 102%, dependendo da concentração e da finalidade analítica. Esses resultados demonstram que o método apresenta elevada exatidão, sendo capaz de fornecer valores próximos ao teor real, sem interferências significativas da matriz ou do procedimento analítico.

Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) foram estimados com base nos parâmetros estatísticos da curva analítica, considerando o desvio padrão da resposta e o coeficiente angular da regressão, resultando em valores de 0,48 µg/mL e 1,45 µg/mL, respectivamente. Contudo, ao se considerar que a faixa de trabalho previamente estabelecida foi de 1 a 100 ppb, observa-se que

os valores de LOD e LOQ, expressos em µg/mL, correspondem a concentrações superiores à faixa em ppb (1 µg/mL = 1000 ppb), indicando a necessidade de uniformização das unidades ou reavaliação do cálculo, a fim de garantir coerência entre a sensibilidade do método e a faixa linear declarada.

De forma global, a ampliação de escopo apresenta desempenho adequado, sendo linear, preciso, exato e sensível dentro da faixa de trabalho estabelecida.

5.1.2. Avaliação da estabilidade do Metronidazol

Após a validação do método analítico, foi conduzido um estudo de estabilidade do metronidazol (MTZ) com o objetivo de assegurar que as condições experimentais não interferissem significativamente na concentração do analito. Em tampão acetato de amônio (pH 4,5), o MTZ apresentou redução progressiva da concentração ao longo do tempo na solução estoque, com valores médios de 99,0% ± 0,3; 96,0% ± 0,4; 94,3% ± 0,3; 92,5% ± 0,4; e 90,3% ± 0,5 após 5, 10, 15, 20 e 21 dias de avaliação, respectivamente. Os resultados evidenciam um decaimento gradual do teor ao longo do período estudado, mantendo-se, entretanto, próximo ao limite de 90% ao final de 21 dias, o que resulta uma degradação máxima de 9,7% do fármaco. Os dados de concentração de MTZ por unidade de tempo encontram-se apresentados na Figura 2.

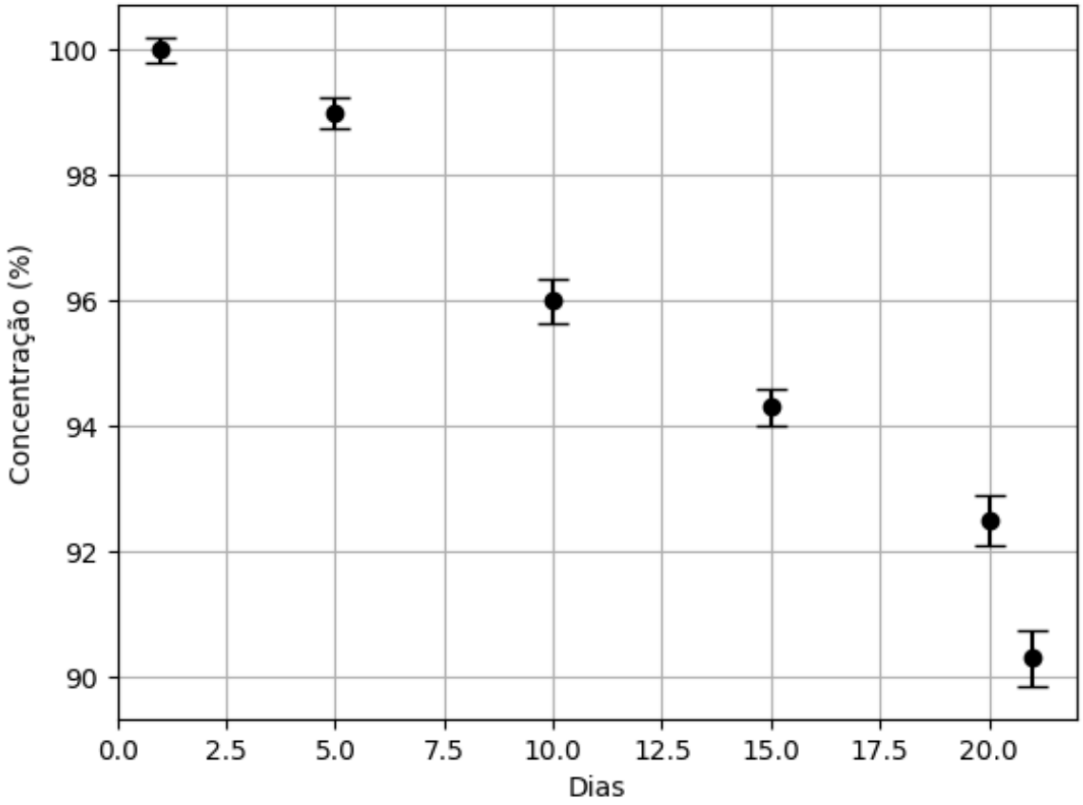

Figura 2 - Estabilidade do metronidazol em meio aceptor de acetato de amônio (ph 4,5) ao longo de 21 dias, expressa como concentração percentual média (n = 3) ± desvio padrão.

De acordo com Wang e Yeh (1993), a molécula do MTZ apresenta elevada estabilidade em tampão acetato sob condições controladas de pH e temperatura. Segundo os autores, nos casos de degradação, o MTZ seguiu uma cinética com comportamento de pseudo-primeira ordem, com taxas dependentes de pH e temperatura. Apesar do MTZ sofrer intensidade de degradação distinta nos diferentes pHs estudados, no artigo foi relatado que a faixa de pH entre 3,9 e 6,6 proporcionou relativa estabilidade para o fármaco, com um máximo de 2% de degradação a 25°C após 50 dias estudo. Para os autores, a ausência de catálise significativa por ions de tampão acetato, sugere que a simples presença de espécies tampão em concentrações usuais não acelera de maneira substancial a decomposição do MTZ. No presente experimento, observou-se que o MTZ degradou em torno de 7% após 20 dias de avaliação em tampão acetato de amônio, similar, mas discretamente distinto do tampão utilizado por Wang e Yeh (1993), que utilizaram o acetato de sódio como insumo. Apesar de haver uma pequena diferença entre os valores dos dois experimentos, quando se extrapola o parâmetro de teor mínimo do princípio ativo remanescente em período alvo (i.e. 90% a 110% do original/declarado) dos estudos de estabilidade de medicamentos (FDA-2002-D-0222), pode-se inferir que o MTZ possui boa estabilidade em tampão acetato de amamônio e que seu uso nos procedimentos experimentais com período de duração inferior a cinco dias não apresentam riscos de distorção os resultados analíticos quantitativos.

5.1.3. Qualificação da quitosana e definição das condições de produção de nanopartículas

O grau de desacetilação (GD) é um parâmetro que influencia diretamente a solubilidade, a densidade de carga positiva e a eficiência de ligação da quitosana, impactando, portanto, no processos de formação de nanopartícula produzida pela técnica de gelificação ionotrópica e, por consequência em sua eficiência de encapsulamento e seu comportamento mucoadesivo (Martins et al., 2025).

Quimicamente, o GD representa a % de grupamentos amino ($–NH_2$) existentes na cadeia polimérica da quitosana em relação à quantidade de grupos acetil ($–COCH_3$), ou seja, expressa a densidade de pontos potencialmente protonáveis ($–NH_2 \rightarrow –NH_3^+$) existentes no polímero (RINAUDO, 2006). Isso ocorre pois cada grupamento amino protonado ($–NH_3^+$) funciona como um ponto de ancoragem eletrostática do contra-íon, seja ele proveniente de um polieletrólito aniônico ou de um fármaco, possibilitando a formação de complexos polieletrolíticos e sistemas nanoestruturados por gelificação iônica (BERGER ET AL., 2004; AGNIHOTRI ET AL., 2004; RINAUDO, 2006). Assim, para assegurar confiabilidade aos resultados experimentais, a quitosana utilizada no trabalho foi previamente qualificada por titulação ácido–base. O procedimento consiste em

solubilizar a quitosana em solução ácida padronizada para protonação dos grupos amina livres e, posteriormente, realizar a titulação com base padronizada, quantificando o volume consumido para determinar estequiometricamente o grau de desacetilação do polímero. (RINAUDO, 2006).

Durante a titulação, o hidróxido de sódio neutralizou inicialmente o excesso de HCl livre em solução, seguido pela desprotonação dos grupos $–H_3^+$ presentes na quitosana. A curva de titulação apresentou dois pontos de inflexão claramente definidos, correspondentes às duas reações de neutralização mencionadas. O volume de NaOH referente à segunda inflexão foi utilizado para o cálculo da concentração molar equivalente de grupamentos amino presentes no polímero. O grau de desacetilação calculado para a amostra analisada foi de 95,3%, discretamente inferior ao valor do certificado de análise (COA), respectivamente de 98,3%. A diferença entre quitina e quitosana é determinada pela percentagem de grupamentos amino presentes na cadeia polimérica em relação à quantidade de grupos acetil, sendo o grau de desacetilação (GD) o parâmetro estrutural que define essa distinção. De forma geral, quando o GD é superior a 50%, o polímero passa a ser classificado como quitosana, enquanto valores inferiores caracterizam a quitina (Rinaudo, 2006; Roberts, 1992). Quitosanas com GD superior a 70% têm seu uso para síntese de nanopatrtículas priorizado em detrimento a quitosanas com valores entre 50 e 70%, pois resultam em partículas menores e mais estáveis, maior eficiência de encapsulação do fármaco e melhor bioadesão (MARTINS et al., 2025)

A gelificação ionotrópica é um método físico-químico de encapsulamento que utiliza interações eletrostáticas entre um ou mais polieletrólitos e contra-íons para formar, de maneira controlada, nanopartículas (LAI; DAEAR; LÖBENBERG; PRENNER, 2014). De uma forma geral, o processo de produção de nanopartículas de quitosana reticuladas com tripolifosfato (TPP) é bem descrita na literatura, todavia em função da variabilidade existente entre origens e partidas de quitosa recomenda-se a repadronização de processo antes de seu uso (JHA & MAYANOVIC, 2023; SIPOLI ET AL., 2015). Assim, uma vez qualificada a quitosana, deu-se início ao processo de otimização da síntese de nanoparticulas às condições laboratoriais, bem como a avaliação de suas estabilidades coloidais iniciais ao longo de uma semana em temperatura de 4^0C. Para tanto, foi realizado um estudo em formato fatorial, no qual variou-se o pH de síntese, a relação de quitosana e TPP e os parâmetros fisico-químicos foram avaliados ao longo do tempo. Os resultados foram expressos na tabela 1, 2 e 3.

Tabela 1. Diâmetro hidrodinâmico médio (nm) das nanopartículas de quitosana/TPP em diferentes proporções, pHs e tempos de armazenamento (1h, 24h e 7 dias).

Proporção Q:TPP*	pH	Diâmetro (± DP) nm		
		1h	24h	168 hr
1:1	3,0	PPT	PPT	PPT
3:1	3,0	149,4 (± 3,8)^{aA}	143,4 (± 1,9)^{aA}	162,8 (± 3,9)^{aB}
6:1	3,0	168,0 (± 11,9)^{bAB}	207,5 (± 2,4)^{bcB}	188,9 (± 9,8)^{bcB}
1:1	4,5	PPT	PPT	PPT
3:1	4,5	120,5 (± 1,4)^{dC}	137,8 (± 35,8)^{dA}	113,7 (± 1,1)^{dA}
6:1	4,5	128,4 (± 2,6)^{eACD}	132,3 (± 1,5)^{eA}	134,2 (± 2,1)^{eA}
3:1	5,5	160,4 (± 10,8)^{fABD}	276,2 (± 22,6)^{ghC}	296,0 (± 2,0)^{ghB}
6:1	5,5	245,2 (± 18,3)^{iE}	348,2 (± 103,7)^{jD}	401,9 (± 92,8)l^{B}

Letras minúsculas diferem entre si (P<0,05) nas linhas. Letras maiúsculas diferem entre si (P<0,05) nas colunas. *Quitosana e tripolifosfato (Q:TPP); Precipitado (PPT).

Não houve sucesso para preparar nanopartículas com a razão 1:1 de quitosana:TPP, ocorrendo a formação de pequenos precipitados. Esta condição resultou em desconsideração dessa variável de trabalho durante o experimento. A formação de precipitados pode ser explicada por um provável excesso de cargas negativas derivadas dos grupos fosfato (PO43-) do TPP, resultando em reticulação excessiva das cadeias poliméricas da quitosana e subsequente formação de estruturas densas, pouco hidratadas e incapazes de permanecer em suspensão (JHA & MAYANOVIC, 2023).

Foi identificado efeito dos parâmetros pH, concentração e tempo sobre o tamanho das nanopartículas (P>0,05). De uma forma geral, em pH muito baixos, a quitosana apresenta maior densidade de grupos amina mais fortemente protonados, resultando em cadeias poliméricas mais solúvel e esticada, quando comparada aos pH mais elevados (SIPOLI ET AL., 2015). Em condições de alta protonação da cadeia polimérica da quitosada ocorre uma dificultação a formação uniforme de partículas, isso porque, as interações entre o TPP e os contra-íons da quitosana podem ocorrer de forma desordenada e com uma cinética desfavorável, resultando em um processo de nucleação e crescimento

do material particulado descontrolado e composto de muitas partículas pequenas em presença de alguns agregados miores (ANTONIOU ET AL., 2015; SIPOLI ET AL., 2015).

Em função da praticidade, baixo custo e velocidade analítica, o tamanho das nanopartículas foi estimado pela técnica de espalhamento dinâmico de luz (do inglês *Dynamic Light Scattering*, DLS). A técnica de DLS gera uma medida indireta que se baseia na análise das flutuações temporais da intensidade da luz dispersada por partículas em suspensão, decorrentes do movimento browniano, permitindo determinar o coeficiente de difusão translacional que, por meio da equação de Stokes–Einstein, possibilita a estimativa do diâmetro hidrodinâmico médio das partículas (BERNE; PECORA, 2000; STETEFELD et al., 2016). Assim, a presença de poucas partículas, mas com tamanho maior (alto valor de espalhamento de luz) presentes na amostra, podem deslocar o valor de diâmetro médio das partículas, conforme o observado nas nanopartículas sintetizadas em pH 3,0 apresentam diâmetro hidrodinâmico médio maior que as nanopartículas porduzidas em pH 4,5. Nessa condição, o aumento do diâmetro médio da partícula costuma ser acompanhado de elevação do índice de polidispersão (do inglês, PDI), o que pode ser observado na tabela 2.

Em paralelo, contribuindo para explicar as diferenças de tamanho entre as nanopartículas em pH 3,0 e 4,0, conforme mencionado previamente por Sipoli et al. (2015), quanto maior a densidade de protonação da cadeia polimérica da quitosana — em função da repulsão entre as cargas — mais linearizada esta se encontra. Essa condição resulta no aumento do diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas devido à intensificação da repulsão eletrostática entre os grupamentos protonados (ISIBOR; ADEOGUN; ENUNEKU, 2024). Por outro lado, a interação iônica da quitosana com o TPP aumenta a compactação da matriz e reduz se diâmetro hidrodinâmico (Mao et al., 2010), o que explica a formação de nanopartículas menores para as proporções 3:1, quando comparadas às proporções 6:1.

Tabela 2. Índice de polidispersão (PDI) das nanopartículas de quitosana/TPP em função da proporção polimérica, variação de pH e tempo de avaliação.

Proporção Q:TPP*	pH	Índice de polidispersão (± DP)		
		1h	24h	168 hr
3:1	3,0	0,446 (± 0,016)^{A}	0,452 (± 0,006)^{A}	0,477 (± 0,019)^{A}
6:1	3,0	0,581 (± 0,105)^{A}	0,588 (± 0,160)^{A}	0,506 (± 0,140)^{A}
3:1	4,5	0,375 (± 0,023)^{AB}	0,311 (± 0,093)^{B}	0,313 (± 0,039)^{B}
6:1	4,5	0,378 (± 0,006)^{B}	0,300 (± 0,005)^{BC}	0,302 (± 0,006)^{B}
3:1	5,5	0,248 (± 0,026)^{C}	0,144 (± 0,022)^{CD}	0,125 (± 0,010)^{D}
6:1	5,5	0,181 (± 0,029)^{C}	0,140 (± 0,020)^{D}	0,151 (± 0,025)^{E}

Letras maiúsculas diferem entre si (P<0,05) nas colunas. *Quitosana e tripolifosfato (Q:TPP).

Do ponto de vista coloidal, a estabilidade do sistema está diretamente relacionada ao equilíbrio entre forças atrativas de van der Waals e forças repulsivas eletrostáticas da dupla camada elétrica, conforme descrito pela teoria DLVO, proposta por Derjaguin e Landau (1941) e por Verwey e Overbeek (1948). Segundo esse modelo, a estabilidade das dispersões resulta da soma das interações atrativas e repulsivas atuantes entre as partículas, determinando a presença ou não de barreira energética suficiente para evitar agregação. Dentro deste contexto, o potencial Zeta possui grande importância na estabilização coloidal mediada por repulsão eletrostática. O potencial Zeta reflete a relação de íons dissociados na superfície de cisalhamento hidrodinâmico de uma partícula em suspensão e, quando seus valores em módulo são próximos ou superiores à 30 mV, a repulsão eletrostáticas entre o material particulado é suficientemente forte para promover estabilidade coloidal no sistema (POCHAPSKI ET AL., 2021). Confor observado na tabela 3, a medida que o pH das suspensões se elevam, os potencial Zeta das partículas diminuem.

Tabela 3. Potencial zeta (mV) das nanopartículas de quitosana/TPP em diferentes proporções, pHs e tempos de armazenamento (1h, 24h e 7 dias).

Proporção	pH	Potencial Zeta (± DP) mV		
		1h	24h	168 hrs
3:1	3,0	40,6 (± 2,0)^{aA}	39,2 (± 1,8)^{aA}	37,8 (± 1,6)^{aA}
6:1	3,0	49,4 (± 1,5)^{cB}	47,9 (± 1,4)^{cB}	46,3 (± 1,2)^{bB}
3:1	4,5	25,9 (± 2,0)^{dC}	24,6 (± 1,7)^{dC}	23,2 (± 1,5)^{dC}
6:1	4,5	33,1 (± 3,4)^{eD}	31,8 (± 2,6)^{eD}	30,4 (± 2,2)^{eD}
3:1	5,5	14,3 (± 2,6)^{fE}	13,5 (± 2,1)^{fE}	12,4 (± 1,8)^{fE}
6:1	5,5	17,4 (± 0,7)^{gE}	16,8 (± 0,6)^{ghF}	15,9 (± 0,5)^{ghF}

Letras minúsculas diferem entre si (P<0,05) nas linhas. Letras maiúsculas diferem entre si (P<0,05) nas colunas. *Quitosana e tripolifosfato (Q:TPP); Precipitado (PPT).

Ambas as suspensões produzidas em pH 5,5 apresentaram módulo do potencial zeta abaixo de 20 mV, valor considerado insuficiente para garantir a estabilidade coloidal das nanopartículas ao longo do tempo, uma vez que sistemas com módulo de potencial zeta inferior a ±30 mV tendem a apresentar instabilidade por agregação (LAI et al., 2014). Nessa condição, após a formação das nanopartículas, as forças atrativas podem superar as forças repusivas, resultando em " crescimento" das nanopartículas ao longo do tempo de estocagem (POCHAPSKI ET AL., 2021). Fato que foi observado nas patíiculas produzidas em pH 5,5 (P<0,05), mas não nas partículas produzidas nos pHs 4,5 e 3,0 (P>0,05).

As nanopartículas produzidas em pH 4,5, tanto com a proporção de quitosana:TPP de 3:1, quanto de 6:1 mostraram-se estáveis ao longo do tempo, sem variar tamanho, PDI e Potencial Zeta (P>0,05) e encontam-se em consonância com valores relatados na literatura para nanopartículas similares, as quais reportam diâmetro hidrodinâmico inferior a 300nm, potencial Zeta entre 25 a 35 mV e PDI próximo ou inferior à 0,3 (ANTONIOU ET AL., 2015; POCHAPSKI ET AL., 2021; SIPOLI ET AL., 2015). Diante desses resultados, e em função da maior quantidade de de TPP optou-se seguir os experimentos com as nanopartículas de quitosana produzidas em pH de 4,5 com a rasão de quitosana:TPP em 3:1. Assim, de forma preliminar, uma análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) dessas nanopartículas, que apresentaram tamanho compatível com os achados obtidos por DLS e morforogia esférica,

similar aos foematos relatados por Antoniou et al. (2015), Pochapski et al. (2021) e por Sipoli et al. (2015), figura 3.

Figura 3: Fotomicrografia Eletrônica de Varredura de nanopartículas de quitosanas produzidas em pH de 4,5 com a rasão de quitosana:TPP em 3:1.

5.2. Desenvolvimento do sistema nanoparticulado mucoadesivo contendo Metronidazol.

A eficiência de encapsulamento (EE) é influenciada pelas propriedades físico-químicas do fármaco em estudo e pela forma de preparo do sistema nanoparticulado final. Assim, o momento de incorporação do princípio ativo ao sistema nanoestruturado constitui uma variável importante no delineamento farmacotécnico, uma vez que influencia os resultados de EE e pode impactar sua distribuição espacial na matriz polimérica, repercutindo no perfil de liberação da droga (HERDIANA et al., 2024).

Dessa forma, considerando a multiplicidade de variáveis envolvidas no processo de encapsulamento, avaliou-se o impacto da estratégia de incorporação do MTZ ao sistema nanoparticulado sobre parâmetros físico-químicos e farmacotécnicos críticos (Tabela 4), incluindo tamanho hidrodinâmico, PDI, potencial zeta e EE. Para tal, investigou-se inicialmente a capacidade de adsorção/incorporação do MTZ às nanopartículas previamente formadas, mediante sua adição após a síntese do sistema (estratégia pós-encapsulação, [Q+TPP]+MTZ), bem como a incorporação do fármaco durante o processo de formação das nanopartículas (carregamento *in situ*), seja por adição do MTZ à solução de quitosana [Q+MTZ]+TPP, seja por sua adição à solução de tripolifosfato Q+[TPP+MTZ], ambas previamente à reticulação iônica.

Tabela 4 – Influência da forma de incorporação do metronidazol (MTZ) ao processo de síntese das nanopartículas nas características físico-químicas das nanopartículas (Tamanho médio, PDI, Potencial Zeta) e eficiência de encapsulamento(EE).

Método de Incorporação do MTZ	Tamanho (±DP) nm	PDI (±DP)	Potencial Zeta (±DP) mV	EE% (±DP)
NP + MTZ	148,7 (± 1,83)	0,291 (± 0,03)	18,93 (± 1,09)	0 (±0,96)
[Q+MTZ] + TPP	173,63 (± 1,72)	0,419 (± 0,02)	17,87 (± 1,16)	45 (±0,28)
Q+ [TPP+MTZ]	152,27 (± 2,97)	0,370 (± 0,01)	20,67 (± 0,31)	0 (±0,31)

NP+MTZ - adição de MTZ após produção de nanopartículas; (Q + MTZ)+TPP – Adição de MTZ à solução de quitosana durante o processo de síntese da nanopartícula; Q+ (TPP + MTZ); Adição de MTZ à solução de TPP durante o processo de síntese da nanopartícula

Tanto a produção de nanopartículas pelo processo NP+MTZ quanto pelo processo Q+ [TPP+MTZ] resultaram em valores de eficiência de encapsulamento (EE) muito baixos, próximos de zero. Estratégias similares descritas na literatura reportaram valores distintos aos obtidos no experimento. No caso da estratégia pós-encapsulação, Cadinoiu e colaboradores (CADINOIU et al., 2025) atingiram valores de até 20 % de EE de metronidazol em nanopartículas híbridas de ácido tânico/quitósana/TPP em suas formulações. Por sua vez, Sreeharsha e colaboradores (SREEHARSHA et al., 2020) reportaram valores de EE do metronidazol variando entre 29 % e 65 % durante o processo de otimização do encapsulamento em nanopartículas de quitosana, onde o fármaco foi adicionado à solução de TPP durante o processo de produção. Cabe destacar que, nesse artigo, os maiores valores de EE foram obtidos nas condições em que o TPP encontrava-se em maiores concentrações nas formulações, o que sugere que o metronidazol funciona como contra-íon do TPP e não da quitosana.

A condição que proporcionou melhor eficiência de encapsulamento (EE) do metronidazol nas nanopartículas foi a adição do fármaco à solução de quitosana ([Q+MTZ]+TPP), resultando em encapsulamento de 45 % ± 0,28 do fármaco. Ao término de otimização de processo de encapsulamento do metronidazol similar, Jahura e colaboradores atingiram valor de EE de até 89 %, empregando uma estratégia de adsorção eletrostática em nanopartículas de quitosana (JAHURA et al., 2025).

Interações eletrostáticas, como as que ocorrem entre aminas protonadas e grupos fosfato, são conhecidas por promover encapsulamento eficiente de fármacos catiônicos em matrizes de quitosana (DONG; FAN, 2006). Nas condições do presente experimento, o pH final da solução de quitosana e

metronidazol foi de 2,5, um valor importante, pois o fármaco possui pKa de 2,8 (SOBH; SADAGOPAN, 2001). Em valores de pH inferiores ao pKa do metronidazol, a fração de espécies protonadas dos grupos imidazólicos da molécula aumenta (ALHADI; ALHIJAZI, 2019), que, em conjunto com os grupamentos amina da quitosana também protonados, interagem eletrostaticamente com os grupos fosfato do TPP durante o processo de reticulação iônica para formação da nanopartícula (DADASHI et al., 2024).

Todos os tratamentos apresentaram potencial zeta positivo (Tabela 4), comportamento frequentemente reportado na literatura para nanopartículas de quitosana, em virtude da protonação dos grupamentos amina em meio ácido (DOMARD; DOMARD, 1999; SREEHARSHA et al., 2020; JAHURA et al., 2025). Ao avaliar o diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas, observa-se que as nanopartículas do tratamento [Q+MTZ] + TPP foram numericamente maiores que aquelas produzidas nas condições NP + MTZ e Q+ [TPP+MTZ], respectivamente com 173,63 ± 1,72; 148,7 ± 1,83; e 152,27 ± 2,97 nm. Comportamento similar foi observado nos valores de índice de polidispersão (PDI) das três condições de síntese, respectivamente 0,419 ± 0,02; 0,291 ± 0,03; e 0,370 ± 0,01. Considerando que tanto a produção de nanopartículas pelo processo NP+MTZ quanto pelo processo Q+ [TPP+MTZ] culminaram em valores de eficiência de encapsulamento (EE) próximos a zero, os resultados supracitados, de forma geral, alinham-se aos reportados por Chantaburat e Rattanapan (2018), os quais observaram que a incorporação de pequenas moléculas de fármacos no interior da matriz de nanopartículas de quitosana pode resultar em aumento do tamanho hidrodinâmico e do PDI. Por outro lado, variações muito elevadas de PDI podem indicar que a adição do fármaco ao sistema promove um processo de nucleação e crescimento da nanopartícula de maneira descontrolada e/ou que a nanoestrutura apresenta interação fármaco-polímero pouco estável (ROSEN; ABU-REZQ, 2016).

Uma vez definidas as condições para melhor incorporação do metronidazol (MTZ) à nanopartícula, avaliou-se o efeito da concentração de MTZ na eficiência de encapsulamento (EE), bem como na capacidade de carga da nanopartícula (do inglês, *loading capacity* — LC), conforme apresentado na Tabela 5. A LC reflete a proporção em massa de fármaco em relação à massa da nanopartícula, enquanto a EE de um fármaco reflete sua eficiência de "aprisionamento" durante o processo de produção da nanopartícula (SHEN et al., 2017). Dentro desse contexto, a otimização desses dois parâmetros proporciona melhor desempenho farmacotécnico do sistema em estudo (VORUP-JENSEN; PEER, 2012).

Tabela 5 – Influência da concentração inicial de metronidazol no tamanho médio, índice de polidispersão, potencial Zeta, eficiência de encapsulamento (EE%) e na capacidade de carga (LC%) de nanopartículas de quitosana.

Concentração MTZ (µg/mL)	Tamanho médio (± DP) nm	PDI (± DP)	Potencial Zeta (± DP) mV	EE (± DP) %	LC (± DP) %
2,0	120,3 (±8,32) [a]	0,18 (±0,02)[a]	+21,60 (±1,52)[a]	73 (±2,10)[a]	0,15 (±0,01)[a]
4,2	145,5 (±10,63)[b]	0,20 (±0,03)[a]	+19,80 (±1,81)[a]	51 (±1,80)[b]	0,21 (±0,02)[b]
10,6	162,8 (±12,21)[bc]	0,23 (±0,02)[ab]	+17,40 (±2,35)[ab]	48 (±2,00)[b]	0,51 (±0,03)[c]
21,33	173,3 (±15,32)[c]	0,27 (±0,03)[b]	+16,90 (±2,30)[b]	40 (±2,40)[c]	0,85 (±0,05)[d]

Nas condições experimentais avaliadas, a maior EE foi conseguida com a menor concentração de MTZ adicionada ao processo de síntese das nanopartículas, de 73±2,10% (P<0,05). A medida em que se aumenta a concentração de MTZ no processo de síntese das nanopartículas para as concentrações 4,2, 10,6 e 21,33 µg/mL de MTZ, ocorre um aumento na EE respectivamente para 51±1,80, 48±2,00 e 40±2,40. Conforme previamente discutido, ocorreu a provável interação eletrostática entre os grupos imidazólicos do metronidazol e os grupos fosfatos do TPP, favoreceram a retenção do MTZ no interior da matriz. Essas interações são frequentemente apontadas como determinantes para a estabilidade do fármaco no interior das nanopartículas (HE ET AL., 2014).

A medida em que se aumenta a concentração de MTZ no processo de síntese também se observa aumento do diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas (P<0,05), resultados que estão em acordo com os resultados de EE. Nos quais o aumento da massa de fármaco retido na partícula resultam em produção de nanopartículas maiores, como supra-discutido. Por sua vez, o aumento das concentrações de MTZ no processo de síntese parece interferir pouco na dinâmica de formação das nanopartículas, haja vista que apenas a concentração de 21,33 µg/mL apresentou valor de PDI maior que as demais 0,27±0,03) formulações (P<0,05). Entretanto, considerando que a variação dos valores de PDI entre as formulações foi inferior a 0,05 e que todas as formulações apresentaram valores de PDI inferiores a 0,3 — faixa usualmente interpretada como indicativa de distribuição monodispersa em sistemas coloidais — (STETEFELD; MCKENNA; PATEL, 2016), a diferença estatística detectada para esta variável foi considerada sem relevância prática no contexto do experimento.

A capacidade de carga (*loading capacity*, LC) de um sistema nanoparticulado é um parâmetro fundamental para equilibrar eficácia terapêutica, segurança e viabilidade econômica da formulação (SHEN et al., 2017; HERDIANA et al., 2024). No presente experimento, à medida que se

aumentou a massa de fármaco encapsulado, detectou-se diferença estatística entre todas as formulações ($P < 0,05$); todavia, de forma geral, os valores foram considerados baixos. Resultados reduzidos de LC refletem a necessidade de atenção especial durante a condução de ensaios clínicos *in vivo*, uma vez que, em determinadas situações, pode ser necessário empregar maior quantidade de excipiente da nanopartícula para atingir o efeito terapêutico desejado (SHEN et al., 2017).

Ao plotar graficamente os dados de concentração de MTZ em relação à EE (figura 4) observa-se que, mesmo a EE seguir diminuindo com o aumento da concentração de MTZ no processo de síntese, esse parâmetro segue uma tendência de estabilização.

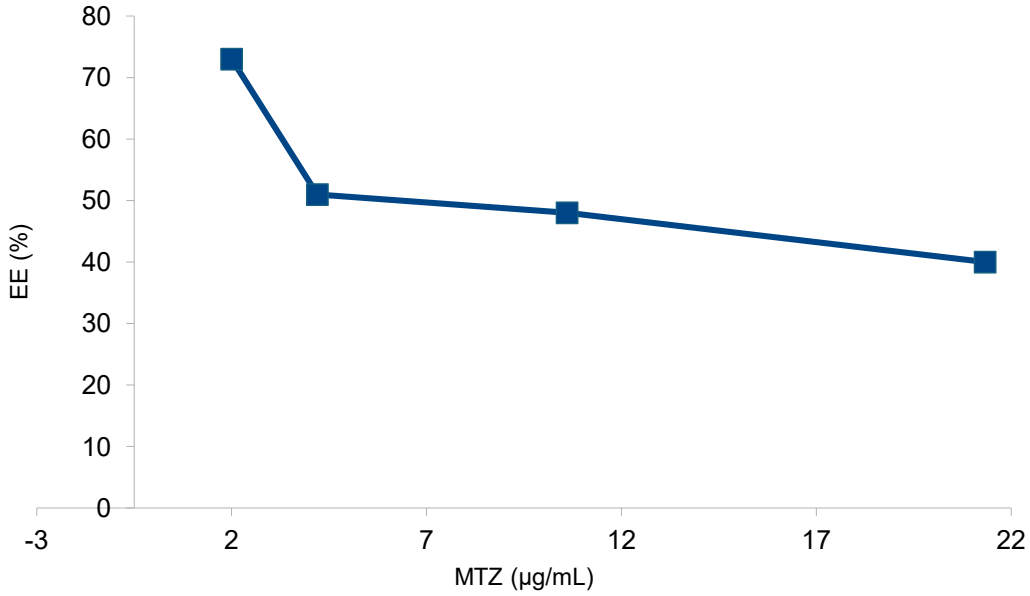

Figura 4 - Relação entre a concentração de metronidazol (MTZ, µg/mL) empregada no processo de síntese e a eficiência de encapsulamento (EE, %).

A tendência de estabilização da EE com o aumento da concentração do fármaco reflete uma limitação intrínseca do processo de encapsulação por gelificação inotópica (Im & Sah, 2009). Esse fenômeno está associado à redução disponibilidade de sítios de interação entre o fármaco e a matriz polimérica (YANG ET AL., 2012), fato que sugere a ocorrência de saturação dos grupos funcionais disponíveis na matriz polimérica, limitando a capacidade de incorporação adicional do fármaco (WANG ET AL., 2011), no presente experimento provavelmente grupos fosfatos do TPP. Por outro lado, a ocorrência de escape do MTZ por difusão do interior da nanopartícula logo após sua síntese não pode ser descartada, haja vista que quando a quantidade de fármaco excede a capacidade de retenção da matriz esse fenômeno pode se manifestar de forma mais intensa no sistema nanoparticulado (CACCAVO ET AL., 2016).

Para assegurar que as nanopartículas mantiveram o formato esférico das nanopartículas brancas identificadas na análise de MEV, foi realizada uma

análise de microscopia de força atômica das naonopartículas produzidas utilizando a concentração de 21,33 µg/mL de MTZ, figura 5.

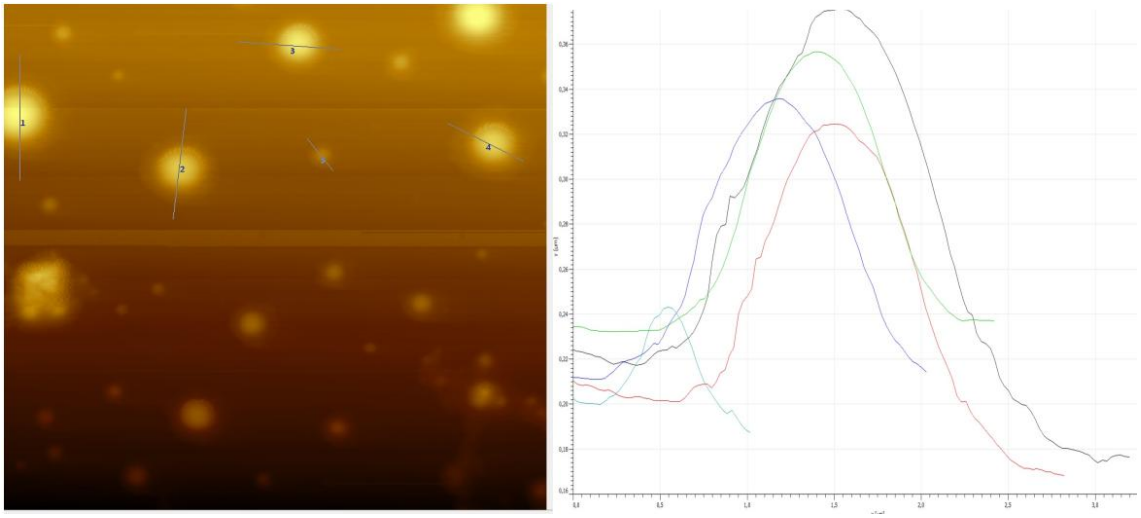

Figura 5: Análise topográfica de Microscopia de Força Atômica representativa de nanopartículas contendo metronidazol.

Conforme observado na figura 5, as nanopartículas contendo MTZ apresentaram formato esférico, com diâmetro estimado pela altura das nanopartículas variando entre 4^0 e 180nm. Esses achados corroboram com os resultados obtidos por DLS,

5.2.2. Avaliação da estabilidade coloidal do sistema nanoparticulado mucoadesivo contendo Metronidazol.

Em tecnologia de nanopartículas, o monitoramento de curto prazo (entre duas e quatro semanas) da suspensão é amplamente empregado como etapa preliminar para avaliar sua integridade físico-química antes da condução de ensaios biológicos ou estudos de estabilidade prolongados (HANDA, 2007). Isso é importante porque dispersões nanoestruturadas poliméricas frequentemente formam sistemas termodinamicamente instáveis e, portanto, suscetíveis a fenômenos como agregação, floculação e crescimento nas primeiras semanas após seu preparo. Assim, avaliar alterações nos parâmetros de potencial zeta, diâmetro hidrodinâmico e PDI das partículas podem gerar indicadores sensíveis de instabilidade físico-química inicial, uma vez que estes parâmetros refletem mudanças na repulsão eletrostática e no equilíbrio interparticulado durante o período de avaliação (OVERBEEK, 1952).

Na tabela 6 pode-se observar que com o passar do tempo houve redução do diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas, especialmente ao término do período de avaliação, quando comparado com os demais tempos de avaliação ($P<0,05$). Por sua vez, após a produção, as suspensões apresentaram PDI de 0,27±0,03, elevando-se ($P<0,05$) para 0,42±0,031 após sete dias de estocagem, onde permaneceram estáveis até o décimo quarto dia de avaliação externando

valor de 0,383±0,01 (P>0,05). No vigésimo primeiro dia de avaliação observou-se que do valor de PDI para 0,243±0,002 (P>0,05).

Tabela 6. Avaliação dos parâmetros físico-químicos das nanopartículas de quitosana produzidas utilizando a concentração de 21,33 µg/mL durante o período de três semanas de armazenamento.

Semana	Tamanho (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
0	173,3 (±15,32)^{ab}	0,27 (±0,03)^{a}	16,90 (±2,30)^{a}
1	176,83 ± (3,59)^{a}	0,42 ± (0,031)^{b}	19,70 ± (0,35)^{a}
2	157,87 ± (2,31)^{ab}	0,383 ± (0,01)^{b}	17,07 ± (0,15)^{a}
3	123,33 ± (2,15)^{c}	0,243 ± (0,002)^{a}	16,10 ± (0,70)^{a}

Letras minúsculas diferem entre si (P<0,05) nas colunas.

Sistemas poliméricos nanoparticulados podem apresentar reestruturação interna nas primeiras semanas após a preparação, resultando em compactação da matriz e redução do diâmetro hidrodinâmico medido por espalhamento dinâmico de luz (DLS) (Mao et al., 2010; Soppimath et al., 2001). No presente experimento, a redução de diâmetro hidrodinâmico acompanhada de modificações significativas de PDI ao longo do tempo permite inferir que durante o processo de estocagem das nanopartículas houve uma reorganização dos componentes da nanopartícula sem que essa perdesse a estabilidade coloidal.

Por sua vez, não foi observado alterações entre os valores de potencial zeta ao longo do tempo (P>0,05), com seus valores variando entre 19,7± 0,35 a 16,1±0,70 mV. Valores de potencial zeta entre ±15 e ±30 mV podem conferir estabilidade coloidal ao sistema, quando combinados a estabilização estérica e hidratação superficial (HONARY & ZAHIR, 2013; RAMPINO ET AL., 2013). Baseado nessas informações e, considerando que o pH final das suspensões é de 4,5, pode-se especular que a fração de MTZ livre e não ionizadas pode estar contribuindo para a estabilização coloidal do sistema com forças repulsivas de caráter estérico.

5.2.3. Avaliação do perfil de liberação do metronidazol livre e nanoencapsulado sob condição *Sink*.

A seleção do pH experimental para o ensaio de padrão de liberação baseou-se em dados do monitoramento do pH urinário de vacas em pré parto para prevenção de cetose, conduzido na fazenda experimental da Embrapa Gado de Leite. A figura 4 expressa a concentração de metronidazol livre em meio aceptor durante ensaio de liberação de 6 horas.

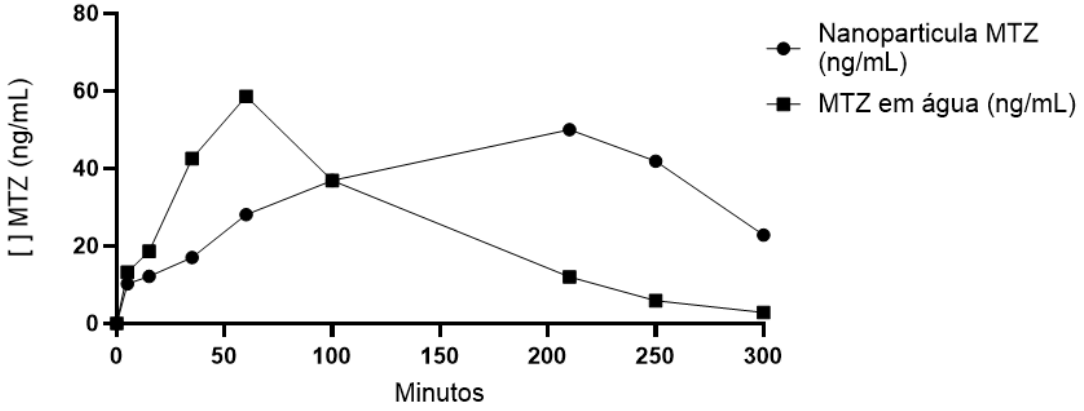

Figura 4: Padrão de liberação em tampão de acetato de amônio pH4,5 do metronidazol livre (quadrados) e metronidazol nanoencapsulado em nanopartículas de quitosana (círculos).

O metronidazol em sus na forma livre (Figura 4, linha com quadrados) demonstra rápido e progressivo aumento da concentração do fármaco no meio aceptor nos primeiros 60 minutos de avaliação, com comportamento aproximadamente linear e compatível com uma cinética de liberação de ordem zero. Tal padrão, reflete predominantemente a difusão passiva do fármaco através da membrana de diálise, impulsionado por um gradiente de concentração favorável em direção ao meio aceptor, com ausência de qualquer mecanismo físico-químico de modulação ou controle cinético de sua liberação (PALUCH ET AL., 2011). Em uma segunda fase do ensaio, a partir de 60 minutos, ocorreu uma redução da concentração de metronidazol no meio aceptor, refletindo a manutenção da condição *Sink* adotada no experimento. A condição *Sink* visa simular um regime de diluição virtualmente infinito, garantindo que a concentração do fármaco dissolvido não exceda 20% de sua solubilidade de saturação, o que preserva o gradiente difusional e favorece a relevância biológica do ensaio, ampliando a correlação entre os resultados *in vitro* e o comportamento esperado *in vivo* (GIBALDI & FELDMAN, 1967).

Por sua vez, o metronidazol na forma nanoencapsulada (Figura 4, linha com círculos) também apresenta um incremento rápido da concentração do fármaco no meio aceptor nos primeiros 45 minutos de ensaio, embora com menor magnitude quando comparado ao metronidazol livre. Esse comportamento é atribuível, principalmente, à difusão inicial de frações do fármaco não efetivamente encapsuladas, bem como de moléculas fracamente associadas ou adsorvidas à superfície das nanopartículas, resultando em um fenômeno característico de liberação inicial abrupta e consolidado no termo *burst release* (HUANG & BRAZEL, 2001). Em uma fase subsequente do ensaio, compreendida entre 45 e 210 minutos, observa-se uma desaceleração na taxa de incremento da concentração de metronidazol no meio aceptor, fenômeno que pode ser atribuído à atuação da matriz polimérica como uma barreira difusional, o que limita o contato imediato do fármaco encapsulado com o meio doador e, com isso, modulando o fluxo de difusão e promovendo a liberação gradual do princípio ativo (PARDEIKE ET AL., 2012). Nessa condição, a incorporação do

fármaco à matriz da nanopartícula, impõe resistência à livre difusão do fármaco no meio doador, resultando em sua liberação sustentada (VORUP-JENSEN & PEER, 2012B; XIE ET AL., 2014). A partir de 210 minutos de ensaio, observa-se um declínio da concentração de MTZ no meio aceptor, possivelmente em decorrência da renovação do volume do meio aceptor empregada para manutenção das condições *Sink*. Nessa etapa, a fração de meio substituída passa a conter uma quantidade de MTZ superior àquela que as nanopartículas conseguem liberar no meio.

5.2.3. Determinação *in vitro* da sensibilidade do *Tritrichomonas foetus* ao metronidazol livre ou nanoencasulado.

Uma vez caracterizado o perfil de liberação do MTZ nanoestruturado, procedeu-se à avaliação *in vitro* de sua atividade antiprotozoária por meio do ensaio de inibição do crescimento de *Tritrichomonas foetus*. Para esse fim, foram realizadas diluições seriadas de concentrações iguais do MTZ livre e nanoestruturado, visando à determinação da concentração inibitória mínima (CIM). Os resultados obtidos nos ensaios de inibição da proliferação parasitária encontram-se apresentados na Figura 6.

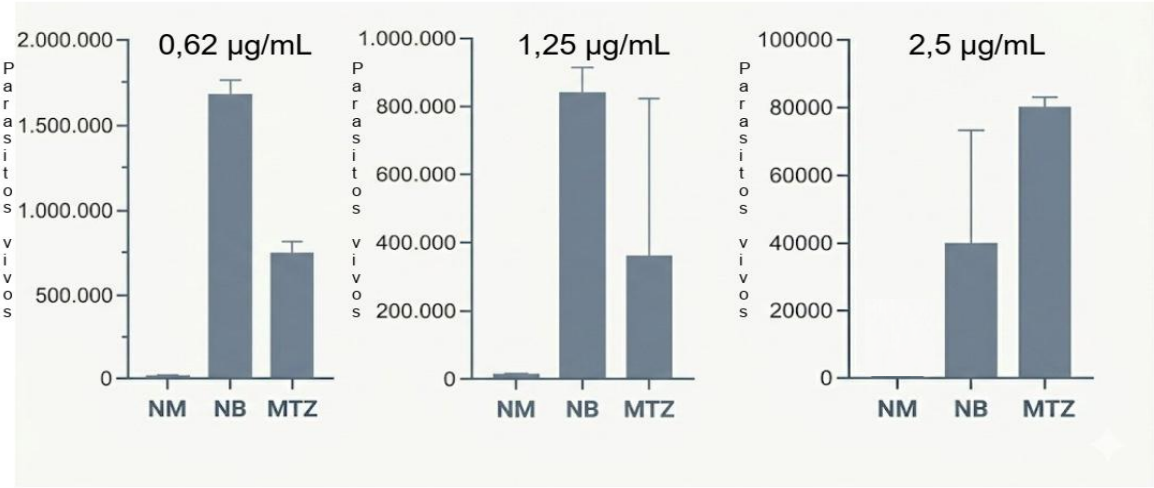

Figura 6- Ensaio de inibição de proliferação de metronidazol frente ao *Tritrichomonas foetus,* onde foram avaliadas as concentrações de 0,625; 1,25; e 2,5 µg/mL de metronidazol livre (MTZ) ou nanoencapsulado em quitosana (NM), bem como as nanopartículas de quitosana controle (NC). A concentração de 5 µg/mL MTZ provocou lise de 100% dos protozoários.

Após 48 horas de incubação, o metronidazol livre (MTZ) promoveu lise total dos protozoários na concentração de 5 µg/mL, sendo esta considerada a concentração letal mínima (MLC), já a concentração inibitória mínima (CIM) foi de 0,625µg/mL . Apesar de existem poucos estudos que MLC e a CIM do MTZ frente ao *T. foetus,* os achados de sensibilidade da cepa de *T. foetus* utilizada no presente experimento é similar aos descritos em literatura. Rivero e colaboradores (Rivero et al., 2019), utilizando seis isolados prepuciais de *T.*

foetus de origem Argentina relataram CIM variando entre 1,25 e 2,5 ug/ml para o MTZ, enquanto que a MLC variou entre 2,5 e 5 ug/ml em ensaios de 48 horas de duração. Por sua vez, Kater e colaboradores (Kather et al., 2007), realizaram um ensaios com duração de apenas 24h, no qual não identificaram a CIM do MTZ para quatro isolados prepuciais *T. foetus* de touros estadunidenses, enquanto que MLC apresentado pelos isolados variou entre 1,25 e 2,5 ug/ml deMTZ.

Por sua vez, MTZ nanoencapsulado em quitosana (NM) apresentou efeito inibitório (CIM) significativo sobre a capacidade proliferativa da estirpe de *T. foetus,* identificada já na menor concentração avaliada, especificamente 0,62 e 1,25 µg/mL ($P < 0,05$). Contudo, apesar das concentrações 0,62 e 1,25 µg/mL terem inibido a proliferação da cepa de *T. foetus,* não foram suficientes para induzir lise completa dos protozoários durante o período experimental. A MLC do parasita só foi observada em concentrações iguais ou superiores a 5 µg/mL de MTZ nanoestruturado. Durante a revisão de literatura não foram identificados trabalhos científicos que fazem uso de metronidazol nanoestruturado para o tratamento de protozoários do gênero Tritrichomonas spp., todavia há relatos que a quitosana possui um efeito antiprotozoário. Pradines e colaboradores (PRADINES ET AL., 2015) relataram que a incorporação de nanopartículas de poly(isobutylcyanoacrylate) revestidas com quitosana incorporadas em hidrogel apresentaram efeito inibitório sobre a multiplicação do Trichomonas vaginalis. Contra este mesmo patógeno, Elmi e colaboradores (ELMI ET AL., 2021A) testaram nanoparticulas similares às utilizadas no presente experimento (*i.e*. quitosana/TPP) e identificaram a CIM destas nanoparticulas ocorreu na concentração de 50 µg/mL.

Nas condições experimentais avaliadas, e em consonância com dados previamente descritos na literatura, as nanopartículas controle, isentas de MTZ, também demonstraram atividade inibitória significativa sobre a proliferação de *T. foetus* a partir da concentração de massa do veículo equivalente à necessária para encapsular 1,25 µg/mL de MTZ ($P < 0,05$). A elevação da concentração de nanopartículas desse valor não resultou em alterações estatisticamente significativas nos valores de concentração inibitória mínima (CIM), quando comparado ao equivalente para veicular valores superiores a 1,25 µg/mL de metronidazol ($P > 0,05$). Embora o mecanismo de ação da quitosana frente a protozoários do gênero Tritrichomonas ainda não esteja completamente elucidada, é plausível postular que as nanopartículas de quitosana promovam adsorção à superfície celular de *T. foetus*, e com isso interfiram na manutenção da homeostase celular do parasito. Essa hipótese encontra respaldo no fato de que, tanto *T. foetus,* quanto o *T. vaginalis* apresentam carga superficial líquida predominantemente negativa, atribuída à elevada densidade de resíduos de ácido siálico na membrana celular (COSTA E SILVA FILHO ET AL., 1986). Mecanismo similar foi proposto para outros protozoários por Elsaadony et al. (2025), sendo tal mecanismo reforçado pelo caráter catiônico das nanopartículas de quitosana, que favorece sua interação eletrostática com a superfície do Tritrichomonas, e pode potencialmente modificar a carga líquida da superfície interfacial do protozoário/microambiente.

Em paralelo, deve-se considerar que *Tritrichomonas foetus* apresenta hábito nutricional baseado predominantemente na captação de bactérias, detritos celulares e nutrientes solúveis disponíveis no trato reprodutivo do hospedeiro e que, por não possuir citóstomo ou organelas digestivas especializadas, realiza a aquisição desses substratos nutricionais majoritariamente por mecanismos inespecíficos de pinocitose e fagocitose de partículas presentes no microambiente(KULDA, 1999; PETRIN ET AL., 1998). Nesse contexto, também é plausível postular que nanopartículas de quitosana adsorvidas à superfície de *T. foetus* sejam internalizadas por esses processos endocíticos concomitantemente com o processo de alimentação do protozoário. Assim, a internalização de grande quantidade de nanopartículas também apresenta potencial para causar danos a microestruturas intracelulares do protozoário, como por exemplo os hidrogenossomos. Essa hipótese adquire relevância adicional quando se considera o MTZ nanoencapsulado, uma vez que a internalização da nanopartícula carreando o fármaco pode promover aumento da sua concentração do fármaco no compartimento intracelular, além de potencializar sua atividade farmacológica pela maior permeação através das organelas lesadas. Tal efeito pode estar associado ao mecanismo de ação clássico do MTZ, que envolve a inibição da cadeia de transferência de elétrons nas vias enzimáticas piruvato:ferredoxina oxidorredutase e hidrogenase, localizadas nos hidrogenossomos (HRDÝ ET AL., 2005). À luz dessas duas hipóteses que são complementares, é plausível inferir a ocorrência de um efeito sinérgico entre as nanopartículas de quitosana e o MTZ, o que encontra respaldo nos resultados observados nos ensaios de proliferação do protozoário.

5.2.4. Avaliação da citotoxicidade do metronidazol nanoencasulado.

O ensaio de viabilidade celular baseado na captação do vermelho neutro fundamenta-se na manutenção da integridade funcional dos compartimentos lisossomais, sendo utilizado para a detectar lesões celulares induzidas por formulações farmacêuticas nanoestruturadas (MERSCH-SUNDERMANN ET AL., 2004). Nesse contexto, após a determinação da mínima concentração letal (MLC) do sistema nanoestruturado em estudo, procedeu-se à avaliação do seu potencial citotóxico em concentração equivalente a 5 µg/mL de metronidazol, utilizando-se uma linhagem celular bovina eternizada (MAC-T). Tal concentração foi selecionada por ser o dobro da MCL do MTZ nanoestruturado e por corresponder à MLC estabelecida para o metronidazol na forma livre. A figura 6 representa os resultados de viabilidade celular obtidos no experimento de viabilidade celular *in vitro*.

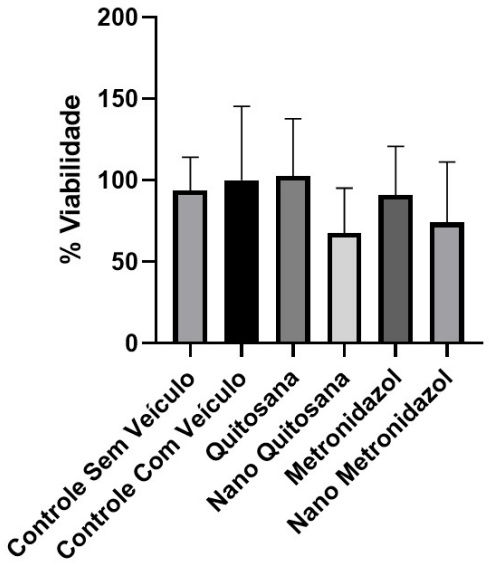

Figura 7: Ensaio de viabilidade celular com linhagem MacT baseado na captação do vermelho neutro. As concentrações de massa foram ajustadas para o equivalente a 5 µg/mL de metronidazol livre. Controle sem veículo (sem água); Controle com veículo (água); quitosana pura; Nanopartículas de quitosana, equivalente a massa para encapsular 5 µg/mL de metronidazol; 5 µg/mL de metronidazol; 5 µg/mL de metronidazol nanencapsulado.

Não foi identificada alteração da viabilidade celular entre nenhum dos tratamentos (P>0,05). A ausência de citotoxicidade tanto da formulação teste quanto de seus componentes na forma isolada indica que a formulação final apresenta potencial biocompatibilidade (LIU et al., 2016). Este achado é relevante, pois o baixo valor de capacidade de carga (LC) implica na necessidade de utilização de maior quantidade de excipiente para o carreamento do fármaco, o que pode resultar em efeitos tóxicos indesejáveis (ANAND et al., 2017).

Esses resultados são semelhantes aos reportados por Elmi et al. (2021b), que observaram ausência de citotoxicidade de nanopartículas de quitosana/TPP em células PC12 no ensaio de MTT, bem como ausência de hemólise significativa em hemácias murinas.

Assim, de uma forma simplista, a manutenção da viabilidade celular no ensaio realizado, sugere que o sistema nanoencapsulado testado apresenta provável compatibilidade biológica, atendendo a um dos critérios preliminares de segurança exigidos para sistemas de liberação controlada de fármacos, fato que contribui para seu avanço nas etapas de estudos clínicos (CHEN ET AL., 2012)

Conclusões parciais e perspectivas

O MTZ pode ser nanoencapsulado de forma eficiente em nanopartículas de quitosana. Estas nanopartículas apresentaram características catiônica e perfil de liberação sustentado, o que favorece sua mucoadesão e gera oportunidade de seu uso para aplicação em mucosas. O efeito sinérgico entre a

quitosana e MTZ observado contra o *T. foetus*, aliado à sua potenciao biocompatibilidade, permite criar a expectativa do uso destas nanopartículas para o tratamento da tricomonose bovina.

Do ponto de vista científico e tecnológico, a formulação proposta contribui para o avanço da pesquisa em nanotecnologia veterinária, área ainda incipiente em comparação com as aplicações em saúde humana. A adaptação de sistemas nanoestruturados para espécies animais representa um desafio adicional, que envolve a compreensão das particularidades anatômicas, fisiológicas e microbiológicas inerentes a cada espécie. Assim, o desenvolvimento de uma formulação tópica destinada ao tratamento da tricomonose bovina não apenas atende a uma demanda prática do campo, mas também fortalece o conhecimento aplicado à interface entre nanotecnologia e medicina veterinária.

De forma preliminar, os resultados do ensaio de absorção do vermelho neutro demonstram que o metronidazol nanoencapsulado apresenta perfil de biocompatibilidade adequado, reforçando seu potencial para aplicações tópicas ou mucosas. A ausência de citotoxicidade, aliada ao perfil de liberação prolongada previamente observado, confirma a viabilidade do sistema nanoparticulado como uma estratégia potencialmente segura e aplicável para a entrega controlada do metronidazol.

Referências Bibliográficas

Ahmad, A. A. M., Elmowalid, G. A., Abdelhamid, A. E., Mohammad, A. A. E., & Abdelwahab, A. M. O. (2023). Nigella sativa-chitosan nanoparticles: Novel intestinal mucosal immunomodulator controls and protects against Salmonella enterica serovar Enteritidis infection in broilers. BMC Veterinary Research, 19(1), 103. https://doi.org/10.1186/s12917-023-03632-1

Ahmad, A., Rilla, K., Zou, J., Zhang, W., Pyykkö, I., Kinnunen, P., & Ranjan, S. (2021). Enhanced gene expression by a novel designed leucine zipper endosomolytic peptide. *International Journal of Pharmaceutics*, *601*, 120556. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120556

Amin, M. K., & Boateng, J. S. (2022). Enhancing Stability and Mucoadhesive Properties of Chitosan Nanoparticles by Surface Modification with Sodium Alginate and Polyethylene Glycol for Potential Oral Mucosa Vaccine Delivery. *Marine Drugs*, *20*(3), 156. https://doi.org/10.3390/md20030156

Antoniou, J., Liu, F., Majeed, H., Qi, J., Yokoyama, W., & Zhong, F. (2015). Physicochemical and morphological properties of size-controlled chitosan–tripolyphosphate nanoparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, *465*, 137–146. https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2014.10.040

Béduneau, A., Tempesta, C., Fimbel, S., Pellequer, Y., Jannin, V., Demarne, F., & Lamprecht, A. (2014). A tunable Caco-2/HT29-MTX co-culture model mimicking variable permeabilities of the human intestine obtained by an original seeding procedure. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, *87*(2), 290–298. https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2014.03.017

Botelho, M. P. A., Hirsch, C., Lage, A. P., Rocha, C. M. B. M. da, Dorneles, E. M. S., Cardoso, P. G., & Costa, G. M. da. (2018). Prevalence of Tritrichomonas foetus and Campylobacter fetus subsp. venerealis among bulls slaughtered in the state of Minas Gerais, Brazil. *Semina: Ciências Agrárias*, *39*(5), 2039. https://doi.org/10.5433/1679-0359.2018v39n5p2039

BRITO, R. A., SILVA, C. A., & AMARAL, A. C. (2025). Design, preparation, and characterization of bovine papillomavirus chitosan-based nanoparticles as a prototype for a bovine papillomatosis vaccine. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, *97*(1). https://doi.org/10.1590/0001-3765202520241155

Caccavo, D., Ström, A., Larsson, A., & Lamberti, G. (2016). Modeling capillary formation in calcium and copper alginate gels. *Materials Science and Engineering: C*, *58*, 442–449. https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.08.040

Chen, D. W., Hsu, Y.-H., Liao, J.-Y., Liu, S.-J., Chen, J.-K., & Ueng, S. W.-N. (2012). Sustainable release of vancomycin, gentamicin and lidocaine from novel electrospun sandwich-structured PLGA/collagen nanofibrous membranes. *International Journal of Pharmaceutics*, *430*(1–2), 335–341. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.04.010

Costa, A. C. da S., Brandão, H. M., da Silva, S. R., Bentes-Sousa, A. R., Diniz, J. A. P., Viana Pinheiro, J. de J., de Melo, M. de F. C., Silva, J. O. C., Matos, E. R., & Ribeiro-Costa, R. M. (2016). Mucoadhesive nanoparticles: a new perspective for fish drug application. *Journal of Fish Diseases*, *39*(4), 503–506. https://doi.org/10.1111/jfd.12373

Da Silva Silveira, C., Fraga, M., Monesiglio, C., Delpiazzo, R., Macías-Rioseco, M., Giannitti, F., & Riet-Correa, F. (2020). Detección de Tritrichomonas foetus por PCR en esmegma prepucial de toros en Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)*, *56*(213), e20205621307. https://doi.org/10.29155/VET.56.213.7

de Sousa Victor, R., Marcelo da Cunha Santos, A., Viana de Sousa, B., de Araújo Neves, G., Navarro de Lima Santana, L., & Rodrigues Menezes, R. (2020). A Review on Chitosan's Uses as Biomaterial: Tissue Engineering, Drug Delivery Systems and Cancer Treatment. *Materials*, *13*(21), 4995. https://doi.org/10.3390/ma13214995

Duarte, J. L., Di Filippo, L. D., Azevedo Vilella, K. J., Paes Dutra, J. A., Ribeiro, D. M., Freitas da Silva, M., Ivo de Medeiros, A., & Chorilli, M. (2024). Chitosan-coated nanoemulsion for intranasal administration increases temozolomide mucosal permeation, cellular uptake, and In vitro cytotoxicity in glioblastoma multiforme cells. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, *102*, 106390. https://doi.org/10.1016/j.jddst.2024.106390

Elmi, T., Rahimi Esboei, B., Sadeghi, F., Zamani, Z., Didehdar, M., Fakhar, M., Chabra, A., Hajialiani, F., Namazi, M. J., & Tabatabaie, F. (2021a). In Vitro Antiprotozoal Effects of Nano-chitosan on Plasmodium falciparum, Giardia lamblia and Trichomonas vaginalis. *Acta Parasitologica*, *66*(1), 39–52. https://doi.org/10.1007/s11686-020-00255-6

Ferreira, L. M. B., & Zucolotto, V. (2024). Chitosan-based nanomedicines: A review of the main challenges for translating the science of polyelectrolyte complexation into innovative pharmaceutical products. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, *7*, 100441. https://doi.org/10.1016/j.carpta.2024.100441

Filho, R. B. de O., Malta, K. C., Borges, J. de M., Oliveira, P. R. F. de, Filho, G. J. dos S., Nascimento, G. G., Mota, R. A., & Júnior, J. W. P. (2018). Prevalence and risk factors associated with Tritrichomonas foetus infection in cattle in the state of Paraíba, Brazil. *Acta Parasitologica*, *63*(2), 346–353. https://doi.org/10.1515/ap-2018-0039

Filipowska, J., Lewandowska-Łańcucka, J., Gilarska, A., Niedźwiedzki, Ł., & Nowakowska, M. (2018). In vitro osteogenic potential of collagen/chitosan-based hydrogels-silica particles hybrids in human bone marrow-derived mesenchymal stromal cell cultures. *International Journal of Biological Macromolecules*, *113*, 692–700. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.02.161

Frigaard, J., Jensen, J. L., Galtung, H. K., & Hiorth, M. (2022). The Potential of Chitosan in Nanomedicine: An Overview of the Cytotoxicity of Chitosan Based Nanoparticles. *Frontiers in Pharmacology*, *13*. https://doi.org/10.3389/fphar.2022.880377

Gagliardi, M., Chiarugi, S., De Cesari, C., Di Gregorio, G., Diodati, A., Baroncelli, L., Cecchini, M., & Tonazzini, I. (2023). Crosslinked Chitosan Nanoparticles with Muco-Adhesive Potential for Intranasal Delivery Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(7), 6590. https://doi.org/10.3390/ijms24076590

Gangavarapu, A., Tapia-Lopez, L. V., Sarkar, B., Pena-Zacarias, J., Badruddoza, A. Z. M., & Nurunnabi, M. (2024). Lipid nanoparticles for enhancing oral bioavailability. *Nanoscale*, *16*(39), 18319–18338. https://doi.org/10.1039/D4NR01487A

Gibaldi, M., & Feldman, S. (1967). Establishment of sink conditions in dissolution rate determinations. Theoretical considerations and application to nondisintegrating dosage forms. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *56*(10), 1238–1242. https://doi.org/10.1002/jps.2600561005

Goodger, W. J., & Skirrow, S. Z. (n.d.). *Epidemiologic and economic analyses of an unusually long epizootic of trichomoniasis in a large California dairy herd*.

Gugleva, V., & Andonova, V. (2023a). Recent Progress of Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers as Ocular Drug Delivery Platforms. *Pharmaceuticals*, *16*(3), 474. https://doi.org/10.3390/ph16030474

He, Y., Chen, X., Bi, S., Fu, W., Shi, C., & Chen, L. (2014). Conferring pH-sensitivity on poly (vinylidene fluoride) membrane by poly (acrylic acid-co-butyl acrylate) microgels.

Reactive and Functional Polymers, *74*, 58–66. https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2013.10.012

Hermadi, H., Khairullah, A., Damayanti, Y., Safitri, E., Tyasningsih, W., Warsito, S., Fauzia, K., Wardhani, B., Ekawasti, F., Wibowo, S., Fauziah, I., Moses, I., Kurniasih, D., Kusala, M., & Julaeha, J. (2024). Bovine trichomoniasis: A hidden threat to reproductive efficiency *Open Veterinary Journal*, *14*(11), 2722. https://doi.org/10.5455/OVJ.2024.v14.i11.1

Hrdý, I., Cammack, R., Stopka, P., Kulda, J., & Tachezy, J. (2005). Alternative Pathway of Metronidazole Activation in *Trichomonas vaginalis* Hydrogenosomes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *49*(12), 5033–5036. https://doi.org/10.1128/AAC.49.12.5033-5036.2005

Huang, X., & Brazel, C. S. (2001). On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*, *73*(2–3), 121–136. https://doi.org/10.1016/S0168-3659(01)00248-6

Im, H.-Y., & Sah, H. (2009). Ammonolysis-based microencapsulation technique using isopropyl formate as dispersed solvent. *International Journal of Pharmaceutics*, *382*(1–2), 130–138. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.08.020

Jha, R., & Mayanovic, R. A. (2023). A Review of the Preparation, Characterization, and Applications of Chitosan Nanoparticles in Nanomedicine. *Nanomaterials*, *13*(8), 1302. https://doi.org/10.3390/nano13081302

Jing, H., Zhang, X., Zou, J., Yuan, Y., Chen, Z., Liu, D., Wu, W., Yang, F., Lu, D., Zou, Q., & Zhang, J. (2020). Oligomerization of IC43 resulted in improved immunogenicity and protective efficacy against Pseudomonas aeruginosa lung infection. *International Journal of Biological Macromolecules*, *159*, 174–182. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.05.057

Kather, E. J., Marks, S. L., & Kass, P. H. (2007). Determination of the In Vitro Susceptibility of Feline Tritrichomonas foetus to 5 Antimicrobial Agents. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, *21*(5), 966–970. https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2007.tb03050.x

Kotani, A., Hakamata, H., & Hayashi, Y. (2021). Chemometric evaluation of repeatability of internal standard methods in high-performance liquid chromatography with a Japanese pharmacopoeia assay for indomethacin as an example. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *202*, 114165. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.114165

Krautbauer, S., Büchler, C., & Liebisch, G. (2016). Relevance in the Use of Appropriate Internal Standards for Accurate Quantification Using LC–MS/MS: Tauro-Conjugated Bile Acids as an Example. *Analytical Chemistry*, *88*(22), 10957–10961. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b02596

Kulda, J. (1999). Trichomonads, hydrogenosomes and drug resistance. *International Journal for Parasitology*, *29*(2), 199–212. https://doi.org/10.1016/S0020-7519(98)00155-6

Mendoza-Ibarra, J. A., Pedraza-Díaz, S., García-Peña, F. J., Rojo-Montejo, S., Ruiz-Santa-Quiteria, J. A., San Miguel-Ibáñez, E., Navarro-Lozano, V., Ortega-Mora, L. M., Osoro, K., & Collantes-Fernandez, E. (2012). High prevalence of Tritrichomonas foetus infection in Asturiana de la Montaña beef cattle kept in extensive conditions in Northern Spain. *The Veterinary Journal*, *193*(1), 146–151. https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2011.09.020

Mersch-Sundermann, V., Knasmüller, S., Wu, X., Darroudi, F., & Kassie, F. (2004). Use of a human-derived liver cell line for the detection of cytoprotective, antigenotoxic and cogenotoxic agents. *Toxicology*, *198*(1–3), 329–340. https://doi.org/10.1016/j.tox.2004.02.009

Nascimento, G. G., Oliveira, P. R. F. de, Silva, E. M. da, Mota, R. A., & Pinheiro Junior, J. W. (2018). Occurrence of Campylobacter fetus subsp. venerealis and Tritrichomonas foetus dna in bulls from Alagoas State, Brazil. *Semina: Ciências Agrárias*, *39*(6), 2477. https://doi.org/10.5433/1679-0359.2018v39n6p2477

Neto, C. A. C. G., Silva, N. C. G. e, de Oliveira Costa, T., de Albuquerque, T. L., Gonçalves, L. R. B., Fernandez-Lafuente, R., & Rocha, M. V. P. (2021). The β-galactosidase immobilization protocol determines its performance as catalysts in the kinetically controlled synthesis of lactulose. *International Journal of Biological Macromolecules*, *176*, 468–478. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.02.078

Niaz, T., Ihsan, A., Abbasi, R., Shabbir, S., Noor, T., & Imran, M. (2019). Chitosan-albumin based core shell-corona nano-antimicrobials to eradicate resistant gastric pathogen. *International Journal of Biological Macromolecules*, *138*, 1006–1018. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.07.165

Paluch, K. J., Tajber, L., McCabe, T., O'Brien, J. E., Corrigan, O. I., & Healy, A. M. (2011). Preparation and characterisation of novel chlorothiazide potassium solid-state salt forms: Intermolecular self assembly suprastructures. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, *42*(3), 220–229. https://doi.org/10.1016/j.ejps.2010.11.012

Pandey, M., Choudhury, H., Ying, J. N. S., Ling, J. F. S., Ting, J., Ting, J. S. S., Zhia Hwen, I. K., Suen, H. W., Samsul Kamar, H. S., Gorain, B., Jain, N., & Mohd Amin, M. C. I. (2022). Mucoadhesive Nanocarriers as a Promising Strategy to Enhance Intracellular Delivery against Oral Cavity Carcinoma. *Pharmaceutics*, *14*(4), 795. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14040795

Pardeike, J., Weber, S., Matsko, N., & Zimmer, A. (2012). Formation of a physical stable delivery system by simply autoclaving nanostructured lipid carriers (NLC). *International Journal of Pharmaceutics*, *439*(1–2), 22–27. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.09.018

Pereira Parchen, G., Quaillet, M., Alves de Freitas, R., & Hillaireau, H. (2025). Chitosan-based nano-objects for drug delivery: a review of their chemical modifications, supramolecular organization and biological fate. *RSC Pharmaceutics*, *2*(6), 1292–1322. https://doi.org/10.1039/D5PM00095E

Petrin, D., Delgaty, K., Bhatt, R., & Garber, G. (1998). Clinical and Microbiological Aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Clinical Microbiology Reviews*, *11*(2), 300–317. https://doi.org/10.1128/CMR.11.2.300

Pochapski, D. J., Carvalho dos Santos, C., Leite, G. W., Pulcinelli, S. H., & Santilli, C. V. (2021). Zeta Potential and Colloidal Stability Predictions for Inorganic Nanoparticle Dispersions: Effects of Experimental Conditions and Electrokinetic Models on the Interpretation of Results. *Langmuir*, *37*(45), 13379–13389. https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.1c02056

Pradines, B., Bories, C., Vauthier, C., Ponchel, G., Loiseau, P. M., & Bouchemal, K. (2015). Drug-Free Chitosan Coated Poly(isobutylcyanoacrylate) Nanoparticles Are Active Against Trichomonas vaginalis and Non-Toxic Towards Pig Vaginal Mucosa. *Pharmaceutical Research*, *32*(4), 1229–1236. https://doi.org/10.1007/s11095-014-1528-7

Rae, D. O. (n.d.). *Food Animal Economics Impact of trichomoniasis on the cow-calf producer's profitability*.

Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, *31*(7), 603–632. https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001

Rivero, M. B., Luque, M. E., Abdala, M. E., Luna, B. E., Di Lullo, D., Echaide, I. E., Carranza, P. G., & Rivero, F. D. (2019). In Vitro Susceptibility to Metronidazole of Tritrichomonas foetus Bovine Isolates from Argentina. *Acta Parasitologica*, *64*(2), 232–235. https://doi.org/10.2478/s11686-019-00031-1

Samanthula, K. S., Kumar CB, M., Bairi, A. G., & Satla, S. R. (2022). DEVELOPMENT, IN-VITRO AND EX-VIVO EVALUATION OF MUCO-ADHESIVE BUCCAL TABLETS OF HYDRALAZINE HYDROCHLORIDE. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, *58*. https://doi.org/10.1590/s2175-97902020000318635

Samper, B. A., Koziol, J., & Williams, R. B. (2025). Economic Impacts of Reducing Bovine Trichomoniasis Prevalence in the US Beef Industry. *Journal of Agricultural and Applied Economics*, *57*(2), 292–302. https://doi.org/10.1017/aae.2025.7

Samuelson, J. D., & Winter, A. J. (1966). Bovine Vibriosis: The Nature of the Carrier State in the Bull. *Journal of Infectious Diseases*, *116*(5), 581–592. https://doi.org/10.1093/infdis/116.5.581

Sato, H., Yamada, K., Miyake, M., & Onoue, S. (2023). Recent Advancements in the Development of Nanocarriers for Mucosal Drug Delivery Systems to Control Oral Absorption. *Pharmaceutics*, *15*(12), 2708. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15122708

Sipoli, C. C., Santana, N., Shimojo, A. A. M., Azzoni, A., & de la Torre, L. G. (2015). Scalable production of highly concentrated chitosan/TPP nanoparticles in different pHs and evaluation of the in vitro transfection efficiency. *Biochemical Engineering Journal*, *94*, 65–73. https://doi.org/10.1016/j.bej.2014.11.008

Soares, L. C. de M., Carvalho, R. C. T., Santana, E. H. W. de, Motheo, T. F., Pimentel, M. F. A., Pinheiro, E. S., Duarte, F. C., Schein, F. B., Santos, C. E. P. dos, & Santos, M. D. dos. (2023). Investigação de Campilobacteriose e Tricomonose genital em touros de propriedades rurais do Pantanal Mato-Grossense, Brasil. *Semina: Ciências Agrárias*, *44*(3), 989–1000. https://doi.org/10.5433/1679-0359.2023v44n3p989

Stancil, S. L., van Haandel, L., Abdel-Rahman, S., & Pearce, R. E. (2018a). Development of a UPLC-MS/MS method for quantitation of metronidazole and 2-hydroxy metronidazole in human plasma and its application to a pharmacokinetic study. *Journal of Chromatography B*, *1092*, 272–278. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.06.024

Stancil, S. L., van Haandel, L., Abdel-Rahman, S., & Pearce, R. E. (2018b). Development of a UPLC-MS/MS method for quantitation of metronidazole and 2-hydroxy metronidazole in human plasma and its application to a pharmacokinetic study. *Journal of Chromatography B*, *1092*, 272–278. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.06.024

Stancil, S. L., van Haandel, L., Abdel-Rahman, S., & Pearce, R. E. (2018c). Development of a UPLC-MS/MS method for quantitation of metronidazole and 2-hydroxy metronidazole in human plasma and its application to a pharmacokinetic study. *Journal of Chromatography B*, *1092*, 272–278. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.06.024

Veloso, S. R. S., & Castanheira, E. M. S. (2023). Advances in Nanomaterials for Drug Delivery. *Biomedicines*, *11*(2), 399. https://doi.org/10.3390/biomedicines11020399

Villafraz, O., Rondón-Mercado, R., Cáceres, A. J., Concepción, J. L., & Quiñones, W. (2018). Molecular and biochemical characterization of natural and recombinant phosphoglycerate kinase B from Trypanosoma rangeli. *Experimental Parasitology*, *187*, 42–48. https://doi.org/10.1016/j.exppara.2018.03.009

Vorup-Jensen, T., & Peer, D. (2012a). Nanotoxicity and the importance of being earnest. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *64*(15), 1661–1662. https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.002

Vorup-Jensen, T., & Peer, D. (2012b). Nanotoxicity and the importance of being earnest. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *64*(15), 1661–1662. https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.002

Wang, Y., Ran, S., Man, B., & Yang, G. (2011). DNA condensations on mica surfaces induced collaboratively by alcohol and hexammine cobalt. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *83*(1), 61–68. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.10.040

Xie, F., Flanagan, B. M., Li, M., Sangwan, P., Truss, R. W., Halley, P. J., Strounina, E. V., Whittaker, A. K., Gidley, M. J., Dean, K. M., Shamshina, J. L., Rogers, R. D., & McNally, T. (2014). Characteristics of starch-based films plasticised by glycerol and by the ionic liquid 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate: A comparative study. *Carbohydrate Polymers*, *111*, 841–848. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.05.058

Yaneva, Z., Ivanova, D., Nikolova, N., & Tzanova, M. (2020). The 21st century revival of chitosan in service to bio-organic chemistry. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, *34*(1), 221–237. https://doi.org/10.1080/13102818.2020.1731333

Yang, J. S., Jiang, B., He, W., & Xia, Y. M. (2012). Hydrophobically modified alginate for emulsion of oil in water. *Carbohydrate Polymers*, *87*(2), 1503–1506. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.09.046

Yao, C. (2021). Control and eradication of bovine trichomonosis in Wyoming, USA by testing and culling positive bulls. *Veterinary Research*, *52*(1), 129. https://doi.org/10.1186/s13567-021-00996-w

Zheng, B., Liu, D., Qin, X., Zhang, D., & Zhang, P. (2025). Mucoadhesive-to-Mucopenetrating Nanoparticles for Mucosal Drug Delivery: A Mini Review. *International Journal of Nanomedicine*, *Volume 20*, 2241–2252. https://doi.org/10.2147/IJN.S505427