UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Obtenção e complexação de 3-*O*-metilquercetina com HPβCD: avaliação de sua liberação e permeação nasal a partir de dispersões coloidais hidrofílicas e análise da atividade seletiva anti-glioma

JENIFFER VIVIANA RAMÍREZ HERNÁNDEZ

Porto Alegre, 2026

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Obtenção e complexação de 3-*O*-metilquercetina com HPβCD: avaliação de sua liberação e permeação nasal a partir de dispersões coloidais hidrofílicas e análise da atividade seletiva anti-glioma

Tese apresentada por **Jeniffer Viviana Ramírez Hernández** para obtenção do TÍTULO DE DOUTOR em Ciências Farmacêuticas

Orientador(a): Profa Dra. Valquíria Linck Bassani
Co-Orientador(a): Profa Dra. Elizandra Braganhol
Porto Alegre, 2026

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Faculdade de aprovada em Farmacêuticas, em nível de Doutorado Acadêmico da Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e 26. 02. 2026, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra Diana Blach Vargas
Universidad del Quindío

Profa. Dra Dinara Jaqueline Moura
Universidade Federal de Ciências da Saúde

Prof. Dr Helder Ferreira Teixeira
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

CIP - Catalogação na Publicação

Ramírez Hernández, Jeniffer Viviana
Obtenção e complexação de 3-O-metilquercetina com HPβCD: avaliação de sua liberação e permeação nasal a partir de dispersões coloidais hidrofílicas e análise da atividade seletiva anti-glioma / Jeniffer Viviana Ramírez Hernández. -- 2026.
249 f.
Orientador: Valquíria Linck Bassani.

Coorientador: Elizandra Braganhol.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2026.

1. Atividade antiglioma. 2. 3-O-metilquercetina. 3. Hidroxipropil-β-ciclodextrina. 4. Flavonoides. 5. Cavidade nasal. I. Bassani, Valquíria Linck, orient. II. Braganhol, Elizandra, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Desenvolvimento Galênico (606), na Central Analítica (604) da Faculdade de Farmácia (FACFAR) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e no Laboratório Braganhol (602) da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. Todos os experimentos foram realizados com financiamento do Conselho da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar meu mais sincero agradecimento a todas as pessoas que, de uma forma ou de outra, tornaram possível a realização deste doutorado.

Em primeiro lugar, ao meu esposo, por estar ao meu lado desde o início desta trajetória, acompanhando-me com paciência e apoio incondicional em cada etapa. Obrigada por me sustentar nos momentos difíceis e por acreditar em mim mesmo quando eu própria duvidava. Este trabalho também é reflexo da sua companhia constante.

Aos meus pais, que, apesar da distância, sempre estiveram presentes, oferecendo apoio, confiança e carinho em todos os momentos. Obrigada por estenderem a mão sempre que foi possível e por serem um pilar fundamental ao longo de todo este processo.

À professora Valquiria Link Basani, agradeço profundamente por ter me aceitado e confiado em mim desde o início do meu ingresso no trabalho doutoral, mesmo diante das circunstâncias em que ele se deu. Obrigada pela orientação, pelo acompanhamento acadêmico e por todos os ensinamentos que contribuíram de forma significativa para a minha formação científica e profissional.

À professora Elizandra Braganhol, meu mais sincero agradecimento por me acompanhar na etapa final deste processo e por assumir o papel de coorientadora. Seu apoio, disponibilidade e orientação foram fundamentais para a conclusão deste trabalho.

À Sara e à Sheila, agradeço imensamente por terem sido parte essencial da minha formação ao longo de todas essas etapas. Obrigada pela orientação constante, pelo acompanhamento experimental e pelo apoio nos processos de escrita. Sua guia e disposição foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao grupo LDG, meu agradecimento pelo apoio ao longo desta caminhada, pelos incentivos nos momentos de insegurança e pela colaboração sempre que necessária. Obrigada pelo companheirismo, pela solidariedade e pelo ambiente de apoio que tornaram esta experiência muito mais leve.

Por fim, agradeço a oportunidade de ter podido realizar este doutorado neste país, o que me permitiu não apenas crescer acadêmica e profissionalmente, mas também conhecer uma nova cultura, aprender um novo idioma e me enriquecer pessoal e humanamente por meio desta experiência.

APRESENTAÇÃO

Seguindo o modelo proposto para elaboração de teses e dissertações, recomendado pelo Regimento do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, o presente exame de qualificação foi redigido no modelo com encarte de publicações no formato de capítulos. Dessa forma, o trabalho encontra-se dividido em:

- Introdução
- Objetivo Geral e objetivos específicos
- Capítulo 1 – Artigo de revisão: Flavonoids in Nasal Therapeutics: Biological Activities, Delivery Challenges, and Formulation Strategies- A Systematic Review.
- Capítulo 2 – Artigo de validação: Isolation and purification of 3-O-methylquercetin from *Achyrocline satureioides*, complexation with HPβCD and evaluation of its release and nasal permeation in polymer formulations
- Capítulo 3 – Artigo experimental: Obtenção e complexação de 3-*O*-metilquercetina com HPβCD: avaliação de sua liberação e permeação nasal a partir de dispersões coloidais hidrofílicas e análise da atividade seletiva anti-glioma.
- Discussão geral
- Conclusões parciais
- Perspectivas
- Referências

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1. Estrutura química da 3-*O*-metilquercetina (5,7,3',4'-tetrahidroxi-3-metoxiflavona; 3*O*MQ). 32
Figura 2. Estrutura das ciclodextrinas naturais e a formação de complexo de inclusão.. 36
Figura 3. Quitosana composta por unidade desacetilada distribuída aleatoriamente (y, z) e unidade acetilada (x).....38
Figura 4. Estrutura química do poloxâmero 407.....39
Figura 5. Estrutura química da hidroxipropilmetilcelulose (HPMC).....39

CAPÍTULO 2

Figura 1. Chemical structure of 3-*O*-methylquercetin (5,7,3',4'-tetrahydroxy-3-methoxyflavone; 3*O*MQ). 152
Figura 2. Liquid chromatography profile at 362 nm: (a) Chromatogram of porcine nasal mucosa extract; (b) Chromatogram of the biological matrix with 3*O*MQ at 10 µg/mL; (c) Chromatogram of the blank formulation; (d) Chromatogram of the 0.1 % chitosan formulation with 3*O*MQ at 10 µg/mL..... 160
Figura 3. *In vitro* release profile through a synthetic cellulose membrane with a pore size of 50 nm (Millipore®) of 3*O*MQ. 165
Figura 4. (a) Permeation and (b) retention profiles of 3*O*MQ through porcine nasal mucosa of (a). 166

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Linearity curve of the HPLC analysis of 3*O*MQ 161
Tabela 2. Precision and accuracy data of the method 162
Tabela 3. Robustness results of 3*O*MQ. 163
Tabela 4. Matrix effect and extraction recovery for 3*O*MQ 163
Tabela 5. Summary of permeation and retention through porcine nasal mucosa after 8 h……...166

DISCUSSÃO GERAL

Tabela 1. Comparação entre as características de liberação, permeação e retenção da 3*O*MQ incorporada em diversas formulações ou preparações 230

SUMÁRIO

RESUMO 19

ABSTRACT 21

INTRODUÇÃO 23

OBJETIVOS 27

REVISÃO DA LITERATURA 29

RESUMO CAPÍTULO 2 145

Capítulo 2 – Artigo de validação: Validation and application of an HPLC–UV method for the quantification of 3-*O*-methylquercetin in nasal mucosa 147

Abstract 150

1. INTRODUCTION 151

2. MATERIALS AND METHODS 153

2.1 Chemicals and reagents 153

2.2 Preparation of the stock and work solutions 154

2.3 Preparation of the biological matrix 154

2.4 Preparation of the chitosan-based formulation 154

2.5 Chromatographic system and conditions 155

2.6 Method validation 155

2.7 Method application 157

3. RESULTS AND DISCUSSION 159

3.1 Validation of the 3*O*MQ analytical method 159

3.2 Method application 164

4. CONCLUSION 167

REFERENCES 169

DISCUSSÃO GERAL 227

CONCLUSÕES 233

PERSPECTIVAS 235

REFERÊNCIAS 237

RESUMO

O glioblastoma (GB) é o tipo mais comum e agressivo de câncer do sistema nervoso central em adultos, apresentando prognóstico extremamente desfavorável. As limitações dos tratamentos atualmente disponíveis têm impulsionado a busca por novas estratégias terapêuticas, incluindo vias alternativas de administração e abordagens direcionadas a alvos moleculares envolvidos na progressão tumoral. Nesse contexto, a 3-*O*-metilquercetina (3*O*MQ) destaca-se como um flavonoide promissor, com atividades biológicas relevantes e efeito antitumoral demonstrado em linhagens celulares de glioma. No entanto, sua aplicação farmacêutica é limitada pela baixa solubilidade aquosa, tornando necessário o desenvolvimento de sistemas de liberação adequados para viabilizar seu uso potencial.

A presente tese está estruturada em três artigos que se complementam. O primeiro consiste em uma revisão crítica da literatura sobre o uso de flavonoides administrados por via nasal. O segundo aborda a validação de um método bioanalítico para a quantificação da 3*O*MQ, aplicado a uma formulação à base de quitosana como sistema modelo para estudos de liberação, permeação e retenção em mucosa nasal suína. O terceiro artigo aborda o isolamento da 3*O*MQ a partir de inflorescências de *Achyrocline satureioides*, sua complexação com hidroxipropil-β-ciclodextrina (HPβCD) com o objetivo de melhorar a sua solubilidade, e a incorporação do complexo em dispersões coloidais hidrofílicas obtidas com diferentes polímeros. Dentre as formulações avaliadas, aquela contendo hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) apresentou melhor desempenho na liberação em membrana sintética, bem como na permeação e retenção em mucosa nasal suína, em modelo *in vitro* com célula de Franz. Essa formulação foi selecionada para avaliação biológica, demonstrando citotoxicidade seletiva em células de glioma C6. Os resultados desta tese demonstram que a complexação da 3*O*MQ com HPβCD, aliada à escolha adequada de matrizes poliméricas hidrofílicas, constitui uma estratégia promissora para melhorar as características biofarmacêuticas desse flavonoide, fornecendo uma base sólida para futuras investigações no contexto do tratamento do GB pela via nasal.

Palavras-chave: Flavonoides; 3-*O*-metilquercetina; via nasal; glioblastoma; ciclodextrinas.

ABSTRACT

Glioblastoma (GB) is the most common and aggressive type of cancer of the central nervous system in adults and is associated with an extremely unfavorable prognosis. The limitations of currently available treatments have driven the search for new therapeutic strategies, including alternative routes of administration and approaches targeting molecular pathways involved in tumor progression. In this context, 3-*O*-methylquercetin (3*O*MQ) stands out as a promising flavonoid, with relevant biological activities and demonstrated antitumor effects in glioma cell lines. However, its pharmaceutical application is limited by low aqueous solubility, making the development of suitable drug delivery systems necessary to enable its therapeutic use.

This thesis is structured into three complementary articles. The first consists of a critical review of the literature on the use of flavonoids administered via the nasal route. The second addresses the validation of a bioanalytical method for the quantification of 3*O*MQ, applied to a chitosan-based formulation as a model system for release, permeation, and retention studies in porcine nasal mucosa.The third article addresses the isolation of 3*O*MQ from *Achyrocline satureioides* inflorescences, its complexation with hydroxypropyl-β-cyclodextrin (HPβCD) to improve solubility, and the incorporation of the complex into hydrophilic colloidal systems containing different polymers. Among the evaluated formulations, the one containing hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) showed the best performance in release using a synthetic membrane, as well as in permeation and retention using porcine nasal mucosa, in an in vitro Franz diffusion cell model. This formulation was selected for biological evaluation, showing selective cytotoxicity in C6 glioma cell line. The results of this thesis demonstrate that the complexation of 3*O*MQ with cyclodextrins, combined with an appropriate hydrophilic polymeric matrix, represents a promising strategy to improve the biopharmaceutical performance of this flavonoid, providing a solid foundation for future investigations in the context of GB treatment via the nasal route.

Keywords: Flavonoids; 3-*O*-methylquercetin; intranasal delivery; glioblastoma; cyclodextrins.

INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença caracterizada pela proliferação e crescimento descontrolado de células, que afeta milhões de pessoas em todo o mundo. Em 2022, a Organização Mundial da Saúde (OMS), reporto cerca de 20 milhões de novos casos, resultando em quase 9,7 milhões de óbitos, tornando-se uma das três principais causas de morte no mundo (Bray et al., 2024). No Brasil, para 2023-2025, estima-se uma taxa de incidência de 704.000 novos casos de câncer, onde o câncer de pele não melanoma é o mais frequente (221.000), concentrando cerca de 70% da incidência, nas regiões Sul e Sudeste do país (Instituto Nacional de Câncer (INCA), 2022).

Um tipo de câncer representativo nas estatísticas mundiais é o localizado no sistema nervoso central (SNC), com cerca de 321.000 novos casos registrados no mundo em 2022 (Bray et al., 2024). No Brasil, estima-se o aparecimento de mais de 11 mil casos para o período de 2023 a 2025. É importante ressaltar que, em 2020, este tipo de câncer apresentou taxa de mortalidade superior a 9 mil óbitos no ano (Instituto Nacional de Câncer (INCA), 2022).

O tipo mais comum de câncer do SNC é o glioblastoma, constituindo cerca de 50% dos casos de neoplasias do sistema nervoso central (Lan; Li; Zhang, 2024; Sahoo; Mitra; Nagaiah, 2024). Apesar da variedade de terapias modernas contra GB, os tratamentos disponíveis são pouco efetivos, tornando o prognóstico desta doença fatal extremamente desfavorável (Hanif et al., 2017; Lan; Li; Zhang, 2024). Esse cenário evidencia a necessidade contínua de novas abordagens terapêuticas, bem como do desenvolvimento de plataformas farmacêuticas capazes de viabilizar a aplicação de moléculas bioativas promissoras.

Nos últimos anos, o foco da pesquisa tem se voltado tanto à identificação de novas moléculas bioativas quanto ao desenvolvimento de estratégias tecnológicas que permitam sua administração por vias alternativas (American Cancer Society, 2022; Siegel et al., 2021). Uma das alternativas de tratamento é o uso de vias de administração alternativas como a via nasal (Michels et al., 2023) e a busca de vetorização de moléculas bioativas para o local de ação contornando a barreira hematoencefálica (Jenke et al., 2021; Xie; Chen; Fang, 2020). Paralelamente, os flavonoides têm sido amplamente investigados por seu amplo espectro de atividades biológicas, incluindo propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antimutagênicas e

anticâncer, o que os torna candidatos de elevado interesse farmacológico (Bianchi et al., 2020; Doneda et al., 2021; Panche; Diwan; Chandra, 2016; Ullah et al., 2020). Estudos sobre a sua administração pela via nasal são apresentados e discutidos no capítulo 1 desta tese, na forma de um artigo de revisão.

A 3*O*MQ (5,7,3',4'-tetrahidroxi-3-metoxiflavona) é um flavonoide que difere da quercetina pela *O*-metilação, e apresenta diversas propriedades biológicas tais como anti-inflamatória, antioxidante, neuroprotetora e antitumoral (Carini; Klamt; Bassani, 2014; Dok-Go et al., 2003; Ko et al., 2002; Sadhu et al., 2006). Estudos *in vitro* têm demonstrado sua atividade em GB, nas linhagens celulares U87MG, U251MG e C6, a 3*O*MQ reduziu a proliferação celular, apresentando valores de IC_{50} entre 1-10 μM, além de um efeito pró-apoptótico comprovado pelo aumento da atividade da caspase 3/7 (Souza et al., 2018). Esses resultados reforçam o potencial farmacológico da 3*O*MQ como molécula bioativa de interesse.

Por outro lado, a via nasal destaca-se como uma alternativa não invasiva para a administração de fármacos, caracterizada por baixa atividade enzimática, alta permeabilidade e ausência do metabolismo de primeira passagem hepática. Além disso, o epitélio nasal apresenta ampla área de superfície e elevada vascularização, favorecendo a absorção sistêmica de fármacos (Ghori et al., 2015; Ulusoy et al., 2022). Dessa forma, a via nasal é considerada uma plataforma farmacêutica promissora para o desenvolvimento de sistemas de liberação de moléculas bioativas, com potencial para aplicações futuras em diferentes contextos terapêuticos.

A utilização de ciclodextrinas como carreadores de moléculas bioativas em formulações destinadas à via nasal é de grande interesse, pois a formação de complexos com CDs melhora a absorção dos fármacos pela mucosa nasal e aumenta sua solubilidade e biodisponibilidade (Vikas et al., 2018). Neste sentido, complexos de moléculas bioativas com derivados de βCD, têm mostrado efeitos neuroprotetores significativos e aumento da permeação na mucosa nasal (Jacob; Nair, 2018). Esses carreadores podem ser utilizados em diferentes sistemas de liberação (Jambhekar; Breen, 2016; Todkar et al., 2024).

Um dos principais fatores a considerar durante o desenvolvimento de formulações nasais é a sua capacidade mucoadesiva, a qual está diretamente relacionada ao aumento do tempo de permanência na mucosa e, consequentemente,

à eficácia terapêutica. Nesse contexto, polímeros mucoadesivos e bioadesivos são frequentemente incorporados às formulações na forma de dispersões coloidais hidrofílicas. A quitosana destaca-se como um biopolímero catiônico com elevada mucoadesão; entretanto, suas dispersões podem apresentar limitações sensoriais e potenciais incompatibilidades associadas ao seu caráter catiônico (Lall et al., 2020; Martins; Morgado; Assi, 2016). Por outro lado, o poloxâmero 407 é um copolímero tribloco não tóxico, com propriedades termorreversíveis que favorecem a administração nasal e a permanência do sistema na cavidade nasal, além de apresentar elevada biocompatibilidade (Cho et al., 2011; Ghasemiyeh; Mohammadi-Samani, 2019). Adicionalmente, a hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), um polímero não iônico amplamente utilizado em formulações farmacêuticas, destaca-se por sua boa biocompatibilidade, capacidade mucoadesiva moderada e contribuição para a estabilidade e controle reológico das formulações, Adicionalmente, a sua capacidade de intumescimento em ambientes com elevada umidade favorece o aumento da viscosidade das formulações, contribuindo para a maior permanência na mucosa nasal e consolidando a HPMC como uma alternativa promissora para sistemas de liberação nasais (Botan; Da Silva; Bruschi, 2024; Imsuwansri et al., 2023).

Neste panorama, a presente tese tem como objetivo o desenvolvimento e a caracterização de formulações nasais contendo complexos de 3*O*MQ/HPβCD incorporados em dispersões coloidais poliméricas hidrofílicas, visando superar as limitações fisicoquímicas da 3*O*MQ. O trabalho compreende uma revisão sobre a administração nasal de flavonoides, a extração e purificação da 3*O*MQ, a preparação dos complexos com ciclodextrina e sua incorporação em matrizes poliméricas, estudos *in vitro* de liberação e permeação/retenção em mucosa nasal suína, bem como a análise da citotoxicidade seletiva das formulações em linhagem de GB (células C6). Assim, a tese estabelece bases tecnológicas para o desenvolvimento de sistemas nasais contendo 3*O*MQ, contribuindo para futuras investigações farmacológicas e pré-clínicas.

OBJETIVOS

Objetivo geral.

A presente tese tem por objetivo geral desenvolver e caracterizar formulações de administração nasais contendo complexos 3*O*MQ/HPβCD, com foco na melhoria das propriedades biofarmacêuticas da 3*O*MQ e na avaliação de seu potencial para aplicações na terapêutica do GB.

Objetivos Específicos.

- Extrair e purificar o composto 3*O*MQ a partir de inflorescências da espécie *Achyrocline satureioides* (marcela).
- Preparar e caracterizar complexos entre 3*O*MQ e HPβCD (3*O*MQ/HPβCD).
- Desenvolver formulações coloidais hidrofílicas incorporando complexos 3*O*MQ/HPβCD em diferentes matrizes poliméricas.
- Caracterizar os complexos 3*O*MQ/HPβCD e as formulações quanto as suas propriedades químicas, físicas e físico-químicas.
- Avaliar o perfil de liberação da 3*O*MQ *in vitro* e a sua permeação/retenção a partir das formulações (dispersões coloidais poliméricas hidrofílicas), em mucosa nasal suína, utilizando célula de difusão de Franz.
- Avaliar a citotoxicidade seletiva *in vitro* da formulação nasal selecionada a partir dos estudos de desempenho biofarmacêutico em cultura de GB e de queratinócitos, modelo de célula não-tumoral.

REVISÃO DA LITERATURA

Glioblastoma

O glioblastoma (GB) é o tumor cerebral primário maligno mais frequente em adultos, representando cerca de 50% dos casos em indivíduos acima de 40 anos e entre 29 e 35% em adolescentes e adultos jovens, sendo caracterizado por elevada agressividade, heterogeneidade tumoral e comportamento altamente infiltrativo (Abuawad et al., 2024; Lan; Li; Zhang, 2024; Lucke-Wold et al., 2024; Sahoo; Mitra; Nagaiah, 2024; Sharifian et al., 2024). Sua incidência anual é estimada entre 3 e 5 casos por 100.000 habitantes, e a sobrevida média permanece em torno de 15 meses após o diagnóstico, mesmo com a adoção das terapias padrão atualmente disponíveis (Kaptein et al., 2022; Trivedi; Belgamwar, 2024). Esse prognóstico desfavorável decorre não apenas da rápida proliferação tumoral e da intensa angiogênese, mas também da capacidade do GB de invadir extensivamente o tecido cerebral saudável, dificultando a ressecção cirúrgica completa e favorecendo altas taxas de recorrência (Lucke-Wold et al., 2024; Sharifian et al., 2024; Trivedi; Belgamwar, 2024). Além disso, fatores como idade, sexo masculino, histórico familiar, exposição à radiação ionizante, contato com compostos tóxicos (pesticidas e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos) e possíveis associações com infecções virais, como HIV e citomegalovírus humano, têm sido associados ao desenvolvimento da doença (McFaline-Figueroa; Wen, 2017; Sharifian et al., 2024; Veiga et al., 2024).

Este tipo de câncer infiltrante do sistema nervoso central (SNC) origina-se principalmente nas células gliais e apresenta uma evolução clínica e prognóstico que variam conforme suas características histológicas e moleculares (Calin et al., 2024; Guo et al., 2024; Wang et al., 2024). O GB pode causar sintomas como dores de cabeça, convulsões, distúrbios da fala, deterioração cognitiva e das habilidades motoras. Além disso, aumenta o risco de tromboembolia venosa (TEV) e hemorragias maiores, o que torna os pacientes com esse glioma maligno suscetíveis a eventos trombóticos recorrentes (Kaptein et al., 2022; Veiga et al., 2024; Wang et al., 2024).

O GB foi inicialmente descrito como um 'sarcoma medular' após sua descoberta por Burns (1800) e Abernethy (1804). Posteriormente, foi denominado 'fungo medular', mas foi apenas em 1863, quando o patologista alemão Virchow, por meio de técnicas histomorfológicas, determinou que se tratava de um tumor de origem glial. Essa descoberta levou à classificação do GB como glioma, um termo que foi estabelecido na literatura científica (Sharma et al., 2020). Atualmente, de acordo com as diretrizes da Organização Mundial da Saúde (OMS 2021), o GB é um glioma difuso e maligno de grau IV que esta caracterizado pela ausência de mutações em IDH. Esse tumor apresenta características fenotípicas e expressão molecular similar às células gliais. Além disso, podem ocorrer variantes histológicas pouco comuns, como o GB de células gigantes, caracterizado por células multinucleadas grandes com citoplasma eosinofílico abundante, e o GB de células pequenas, que está associado à amplificação do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) (Bin Abdulrahman et al., 2019; Lan; Li; Zhang, 2024).

Do ponto de vista molecular, o GB apresenta um perfil genético complexo, incluindo metilação do promotor de MGMT, mutações no promotor de TERT, deleção do gene supressor PTEN, amplificação do proto-oncogene EGFR e alterações em ATRX e TP53, as quais influenciam o prognóstico, a resposta terapêutica e a evolução clínica da doença (Lan; Li; Zhang, 2024; Liu et al., 2020; Romani; Pistillo; Banelli, 2018). A presença e/ou ausência dessas alterações genéticas desempenha um papel crucial na resposta ao tratamento, no tempo de surgimento dos sintomas, nos atrasos no início do tratamento pós-cirúrgico e nas complicações após a cirurgia (Liu et al., 2020). Entretanto, apesar dos avanços no entendimento desses mecanismos moleculares, tais descobertas ainda não se traduziram em estratégias terapêuticas curativas eficazes, mantendo o GB como uma neoplasia de difícil manejo clínico.

Por outro lado, o tratamento dos tumores malignos localizados no SNC configura-se um desafio, devido a sua heterogeneidade, a sua elevada capacidade invasiva e caráter assintomático nas fases iniciais, o que leva a um crescimento tumoral significativo e extensão em áreas eloquentes. Os tratamentos de câncer do SNC, na maioria dos casos, requerem remoção cirúrgica que pode comprometer áreas sensíveis do cérebro (Instituto Nacional de Câncer (INCA), 2022; Mohammadi et al., 2021). O tratamento padrão baseia-se na ressecção cirúrgica máxima segura,

seguida de radioterapia (RT) e quimioterapia com temozolomida (TMZ), estratégia que, embora aumente modestamente a sobrevida, não impede a recorrência tumoral na maioria dos casos (Feldheim et al., 2023; Shi et al., 2024; Wen et al., 2024). Além da limitada eficácia, esses métodos são onerosos e frequentemente associados a efeitos adversos significativos, reforçando a necessidade urgente de abordagens terapêuticas inovadoras (Wang et al., 2024).

Além disso, os pesquisadores estão cada vez mais interessados em descobrir novas moléculas e desenvolver tecnologias inovadoras de administração de medicamentos para combater o GB, uma vez que barreiras fisiológicas como a barreira hematoencefálica (BHE) e a barreira hematoencefálica do sistema de fluido cerebroespinhal (BCSFB) continuam a representar desafios significativos para a terapêutica do GB. Apesar dos avanços obtidos, tais obstáculos ainda não foram plenamente superados, mesmo com abordagens terapêuticas complexas, o que reforça a relevância de estratégias complementares baseadas no desenvolvimento racional de fármacos e sistemas de liberação em estágios iniciais de investigação (Trivedi; Belgamwar, 2024; Wang et al., 2024). Dessa forma, mesmo compostos que apresentam elevada citotoxicidade *in vitro* contra células tumorais frequentemente falham em modelos *in vivo*, em razão da baixa concentração alcançada no tecido cerebral tumoral. Este cenário evidencia a necessidade de estratégias complementares que integrem o desenvolvimento racional de moléculas bioativas e de sistemas avançados de liberação capazes de superar essas barreiras fisiológicas.

Entre as diversas classes de compostos bioativos investigados como potenciais agentes anticâncer, os flavonoides se destacam pelo amplo espectro de atividades biológicas, incluindo propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antimicrobianas, antivirais e antitumorais (Singla et al., 2019). Um exemplo representativo é a 3*O*MQ. A 3*O*MQ é um flavonol naturalmente encontrado em diversas espécies vegetais, como *Rhamnus nakaharai Hayata* (família Rhamnaceae), *Achyrocline satureioides*, *Ophioglossum pedunculosum*, *Helenium atacamense* e *Gochnatia polymorpha*, *Nicotiana tabacum*, entre outras, e tem se destacado por suas propriedades biológicas e potencial farmacêutico (De Souza; Schapoval; Bassani, 2002; Ko et al., 2003, 2002; Morales et al., 2006; Moreira et al., 2000; Schwingel et al., 2014; Wan et al., 2012). A estrutura desta molécula é apresentada na **figura 1.**

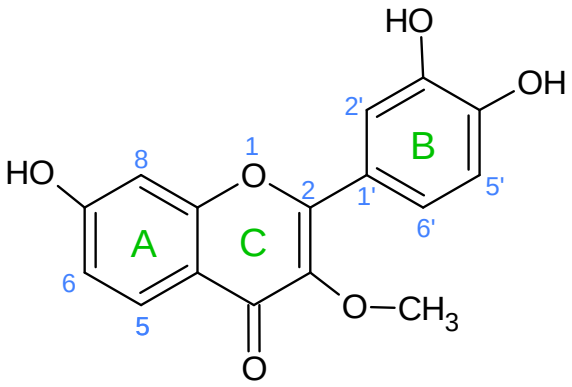


Figura 1. Estrutura química da 3-*O*-metilquercetina (5,7,3',4'-tetrahidroxi-3-metoxiflavona; 3*O*MQ).

Assim como outros flavonoides, a 3*O*MQ tem demonstrado diversas propriedades biológicas. Um exemplo disso é o estudo de Luo e colaboradores (2015), que demonstraram sua potente atividade antioxidante, medida por meio do ensaio de descoloração de β-caroteno-ácido linoleico, com um IC50 de 10,26 µg/mL. Esse efeito pode ser atribuído à presença de dois grupos hidroxila no anel B, que, em conjunto, atuam como o radical alvo, com propriedades de doação de elétrons significativamente fortes (Luo et al., 2015). Da mesma forma, foi demonstrado que este flavonol possui a capacidade de eliminar radicais livres em modelos *in vitro*, como o 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH) e o nitroazul de tetrazólio (NBT). Além disso, inibe significativamente a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) induzidas por radiação UVB em fibroblastos dérmicos humanos (HDF), o que reforça a evidência de sua potente atividade antioxidante (Zhang et al., 2020, 2012).

Além disso, observou-se que a 3*O*MQ pode atuar como um anti-inflamatório, inibindo e reduzindo a inflamação no modelo de edema da pata induzido por carragenina em camundongos, sem induzir nenhuma toxicidade aguda aparente nem dano gástrico (Küpeli; Yesilada, 2007; Zhang et al., 2012). A 3*O*MQ tem a capacidade de prevenir a superprodução de óxido nítrico (NO) e eliminar o peroxinitrito na microglia ativada por LPS. Esse efeito é alcançado por meio da inibição da expressão de proteínas e mRNA do óxido nítrico sintase induzível (iNOS), além da atenuação da secreção das citocinas pró-inflamatórias como TNF-α, IL-4 e IL-5 (Jiang et al., 2006; Kim; Lim; Ryu, 2008; Ko et al., 2004).

A 3*O*MQ demonstrou notável atividade antibacteriana e antifúngica contra uma ampla variedade de microrganismos. Entre eles, incluem-se *Staphylococcus aureus* (MIC 0.125 mg/mL), *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (>250 µg/mL), *Escherichia coli* (>4 mg/mL), *Helicobacter pylo*ri (3,9 µg/mL), *Bacillus cereus* (125 µg/mL), *Salmonella typhimurium* (125 µg/mL), *Agrobacterium tumefaciens* (75 µg/mL), *Bacillus subtilis* (50 µg/mL), *Pseudomonas lachrymans* (50 µg/mL), *Ralstonia solanacearum* (25 µg/mL), *Xanthomonas vesicatoria* (75 µg/mL*), Magnaporthe oryzae* (150 µg/mL), *Escherichia coli* (>250 µg/mL) e *Candida albicans* (250 µg/mL), destacando-se pela sua grande versatilidade como agente antimicrobiano (Joray; Palacios; Carpinella, 2013; Luo et al., 2015; Talib; Abu Zarga; Mahasneh, 2012; Ustün et al., 2006).

Um efeito importante da 3*O*MQ é a capacidade de inibir a atividade da α-glucosidase e da α-amilase, que são potenciais alvos terapêuticos para o tratamento da diabetes, com IC_{50} de 9,24 e 230,66 µM, respectivamente (Jadalla et al., 2022), esse efeito também foi confirmado em outras investigações (Thuy Le et al., 2023). Ganblod e colaboradores demonstraram que a 3*O*MQ apresenta um efeito dose-dependente significativo contra a fibrose hepática em um modelo de células estreladas hepáticas de rato (HSC-T6). Esse efeito é atribuído a sua capacidade de inibir a proliferação dessas células hepáticas e reduzir os níveis de mRNA de αSMA, o que sugere seu potencial terapêutico para o tratamento da fibrose hepática (Ganbold et al., 2019). Foi demonstrado que este flavonoide é capaz de inibir a atividade da xantina oxidase e eliminar ânions superóxido em concentrações inferiores a 30 µM, sugerindo efeitos benéficos no tratamento da hiperuricemia e da gota (Cimanga et al., 2010).

Além disso, a 3*O*MQ tem mostrado potencial antiviral ao inibir estágios iniciais da replicação viral, reduzindo a síntese de mRNA e proteínas virais (Vrijsen et al., 1987). Esse efeito também foi observado contra o coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV-2), devido à capacidade do composto de interferir na interação da proteína S com a neuropilina-1 (NRP1), uma proteína que facilita a infecção viral ao agir como um ponto de entrada adicional para o SARS-CoV-2 (Alshawaf et al., 2022).

Quanto à sua atividade anticâncer, a 3*O*MQ demonstrou uma notável capacidade antiproliferativa sobre as linhas celulares MCF-7 (adenocarcinoma

mamário epitelial, IC50 de 11,23 µg/mL) e Hep-2 (carcinoma de laringe, IC50 de 26,12 µg/mL), efeito que pode ser atribuído à sua capacidade de induzir apoptose (Talib; Abu Zarga; Mahasneh, 2012).

Da mesma forma, esse flavonoide apresenta atividade citotóxica e antiproliferativa sobre outras linhagens celulares tumorais, incluindo mama (MDA-MB-231, IC50 de 28,34 µM a 48 h), pulmão (A549, IC50 de 68,8 µM), ovário resistente à cisplatina (A2780cis, IC50 de 27,4 µM), colorretal humano (HCT116 e HT29 com IC50 de 32 µg/mL e >100 µM, respectivamente), colo do útero humano (HeLa, IC50 de 35 µM), osteossarcoma humano (HOS, IC50 de 90,4 µM), leucemia mieloide humana (HL-60, IC50 de 14,3 µM), ovário (SK-OV-3, IC50 de 44,6 µM) e carcinoma espinocelular (A431, IC50 de 26,8 µM) (Bianchi et al., 2020; Li; Henry; Seeram, 2009; Mohammed et al., 2022; Rubio et al., 2006; Silva et al., 2023).

Além dos efeitos citotoxicos, a 3*O*MQ induz uma potente atividade antimigratoria. Em células de melanoma B16F10, observou-se uma potente inibição da migração celular, atribuída à presença do grupo 3-metoxila, que desempenha um papel fundamental em esta atividade, contribuindo para a capacidade do composto de inibir a metaloproteinase da matriz-1 (MMP-1), enzima frequentemente superexpressa em células tumorais e associada aos processos de migração e invasão celular (Tsuchiya et al., 2022; Yamauchi et al., 2017).

Igualmente, foi demonstrado que a 3*O*MQ reduz a viabilidade celular de clones de células de melanoma humano A375 com diferentes fenótipos e níveis de agressividade, alcançando uma diminuição do crescimento celular de 50% em concentrações de 32-49 µM e 16-27 µM, após 24 e 48 horas de tratamento, respectivamente (Doneda et al., 2021).

Entre as diversas atividades biológicas descritas para a 3*O*MQ, destaca-se ainda sua capacidade de reduzir a proliferação de linhagens celulares de GB (U87MG, U251MG e C6) com valores de IC50 entre 1-10 µM. Além disso, foi observado um efeito pró-apoptótico associado ao aumento da atividade das caspases 3/7 quando o composto foi testado na concentração de 10 µM. Tais propriedades servem de base para o aprofundamento de pesquisas visando a avaliação de seu potencial para o tratamento do GB (Souza et al., 2018).

Apesar desse amplo e consistente conjunto de evidências farmacológicas, a aplicação clínica da 3*O*MQ, assim como de outros flavonoides, é fortemente limitada por suas propriedades biofarmacêuticas desfavoráveis, especialmente a baixa solubilidade aquosa, a reduzida estabilidade e a consequente baixa biodisponibilidade, principalmente na forma aglicona (Pittol et al., 2022). Essas características dificultam sua absorção e comprometem o alcance de concentrações terapêuticas adequadas no sítio de ação, tornando indispensável o desenvolvimento de estratégias farmacotécnicas capazes de contornar essas limitações.

Nesse contexto, a complexação com ciclodextrinas (CDs) emerge como uma abordagem racional e amplamente consolidada para aumentar a solubilidade e a estabilidade de compostos hidrofóbicos. As ciclodextrinas são oligômeros cíclicos formados por unidades variáveis de glucopiranose unidas por ligações α-(1,4), resultando numa estrutura de cone truncado, cuja cavidade central é lipofílica e uma superfície externa hidrofílica. Desta característica decorre sua capacidade de formar complexos de inclusão de moléculas hidrofóbicas (ou parte destas), aumentando a sua hidrossolubilidade aparente. Esta tem sido a principal motivação para o emprego das ciclodextrina como adjuvantes farmacêuticos há mais de 20 anos. As ciclodextrinas naturais são obtidas pela hidrólise do amido por enzimas como a ciclodextrina glicosiltransferase (CGT). Formam-se com seis, sete ou oito unidades de glucopiranose, conhecidas como α-ciclodextrina, β-ciclodextrina e γ-ciclodextrina, respectivamente, como mostra a **figura 2** (Jambhekar; Breen, 2016; Schwingel et al., 2008, 2019).

A ciclodextrina mais amplamente utilizada devido ao seu baixo custo e tamanho de cavidade adequado é a β-ciclodextrina (βCD) (Schwingel et al., 2008). Não obstante, a βCD apresenta limitações quanto à sua solubilidade em água (18,5 mg/mL) e toxicidade quando administrada pela via parenteral. Quando administrada pela via oral, a massa molecular desses oligômeros (1000 a mais de 2000 Da) impede que sejam absorvidos em sua forma intacta no trato gastrointestinal. Além disso, não são hidrolisados nem pela saliva humana nem pela amilase pancreática. Isso foi evidenciado em diversas pesquisas que avaliaram o perfil toxicológico das ciclodextrinas (Gould; Scott, 2005; Jambhekar; Breen, 2016).

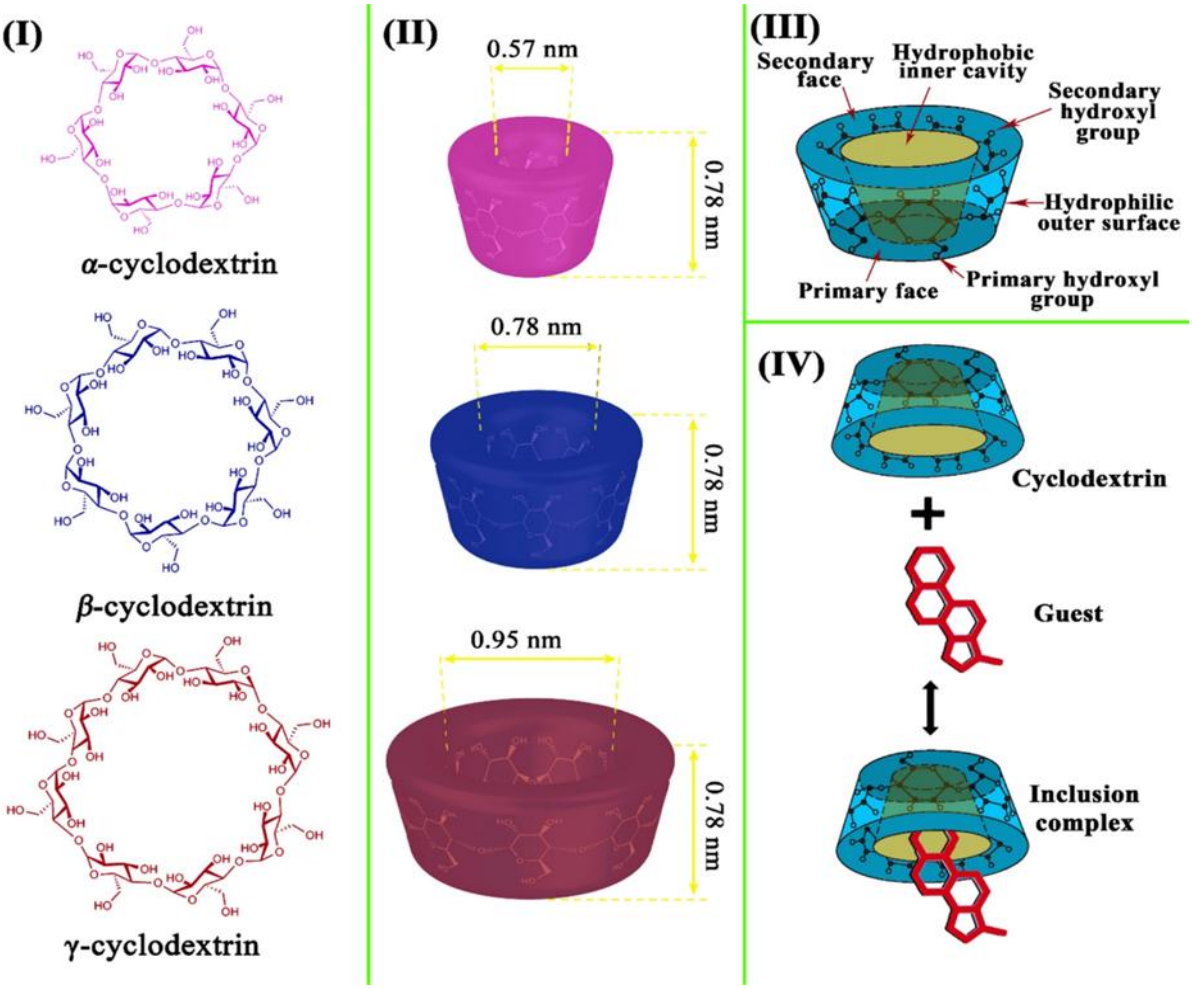


Figura 2. Estrutura das ciclodextrinas naturais e a formação de complexo de inclusão. Adaptado de (Xu et al., 2023).

A substituição de grupos hidroxila das ciclodextrinas naturais, por meio de reações químicas e enzimáticas com introdução de substituintes como o grupo hidroxipropila, representa uma importante estratégia de sobrepujar as duas principais limitações da β-ciclodextrina. Esses derivados apresentam melhor solubilidade em água e demonstraram ser praticamente atóxicos, mesmo pela via parenteral, como é o caso da hidroxipropil β-ciclodextrina (HPβCD) (Bhargav; Sheeba, 2021; Ianiski et al., 2023; Jambhekar; Breen, 2016).

Outras vantagens da HPβCD em comparação com a βCD incluem maior versatilidade em sua administração, pois pode ser usada por diversas vias de administração, como a via oral, ocular, parenteral e outras. Além disso, é eliminada rapidamente e quase completamente da circulação sistêmica pelos rins após injeção intravenosa. Quando administrada por meio de aerosol, é eliminada do pulmão ao ser

absorvida na circulação sistêmica (D'Aria; Pagano; Giancola, 2022; Williams Iii; Mahaguna; Sriwongjanya, 1998). Adicionalmente, a HPβCD foi incluída nas farmacopeias europeia e americana (PhEur e USP, respectivamente) e recebeu a designação de medicamento órfão para o tratamento da doença de Niemann-Pick tipo C (Alzheimer infantil) (Kalydi et al., 2024).

Os benefícios que a HPβCD oferece na formação de complexos de inclusão podem ser de grande importância para sua aplicação em rotas alternativas de administração de fármacos, como a via nasal. Uma das vantagens da via nasal, quando usada para obtenção de efeito sistêmico, é evitar o metabolismo de primeira passagem de fármacos. Além disso, essa via permite uma rápida absorção de fármacos através da mucosa nasal, sem apresentar caráter invasivo como a via parenteral. Dependendo da formulação, esta via também pode propiciar a liberação sustentada e prolongada de fármacos. (Laffleur; Bauer, 2021). Dessa forma, a associação entre a HPβCD e a via nasal configura-se como uma abordagem particularmente atrativa para o carreamento e a administração de compostos bioativos como a 3*O*MQ, potencializando seu desempenho terapêutico e ampliando suas possibilidades de aplicação clínica.

Além disso, a via nasal destaca-se como uma rota promissora para a administração de fármacos destinados ao tratamento de doenças do SNC, pois permite evitar o metabolismo de primeira passagem hepática, possibilita rápida absorção sistêmica e, adicionalmente, oferece a possibilidade de transporte direto de fármacos para o cérebro por meio da via nose-to-brain (Laffleur; Bauer, 2021; Mura et al., 2018; Shaikh et al., 2011). Essas características são especialmente relevantes no contexto do GB, em que a superação da BHE representa um dos maiores desafios terapêuticos. No entanto, a aplicação da via nasal é limitada por fatores fisiológicos, como o aclaramento mucociliar e o reduzido tempo de residência das formulações na mucosa nasal, o que exige a utilização de estratégias farmacotécnicas adicionais, como sistemas mucoadesivos e formulações capazes de formar géis *in situ* (Laffleur; Bauer, 2021; Mura et al., 2018; Shaikh et al., 2011).

Nesse sentido, o uso de dispersões coloidais poliméricas baseadas em polímeros mucoadesivos e termossensíveis constitui uma abordagem particularmente promissora. A quitosana (CS) é um polissacarídeo catiônico obtido a partir da N-

desacetilação da quitina, um polímero natural não tóxico presente nas cascas de crustáceos como caranguejos e camarões. Sua estrutura (**figura 3**) carregada positivamente lhe confere excelentes propriedades bioadesivas além de boa biodegradabilidade (Laquintana et al., 2024; Prabaharan; Mano, 2005). A CS na forma de base apresenta baixa capacidade de solvatação e gelificação (Prabaharan; Mano, 2005), razão pela qual é utilizada em pH ácido que promove sua ionização e gelificação. A CS é amplamente utilizada em aplicações de administração controlada de medicamentos, como um componente de formas farmacêuticas mucoadesivas, formas farmacêuticas de liberação rápida e administração melhorada de peptídeos, sendo incorporada em uma ampla variedade de formas farmacêuticas, incluindo géis, filmes, esferas, microesferas, comprimidos e revestimentos para lipossomas (Rowe; Sheskey; Owen, 2006).

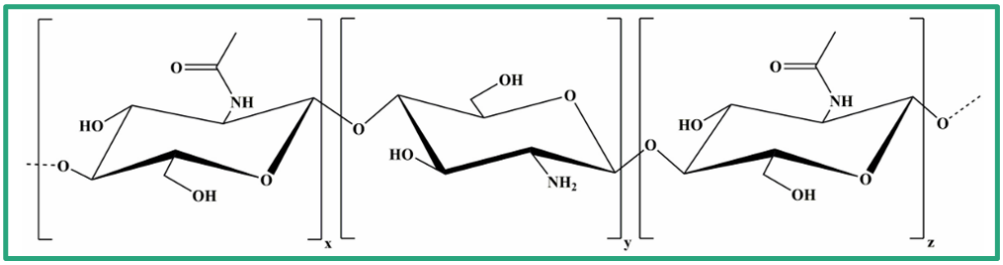


Figura 3. Quitosana composta por unidade desacetilada distribuída aleatoriamente (y, z) e unidade acetilada (x). Adaptado de (Marques et al., 2020).

O poloxamer 407 (P407), um copolímero tribloco constituído por um bloco central de polipropilenoglicol hidrofóbico ladeado por dois blocos de polietilenoglicol hidrofílico (PEO–PPO–PEO) como se mostra na **figura 4**, pode ser utilizado para o desenvolvimento de sistemas de gelificação in situ (Balakrishnan et al., 2015). Este polímero com uma massa molecular aproximado de 1200 kDa e altamente solúvel em água, recebeu aprovação para aplicação farmacêutica pela Food and Drug Administration dos EUA, o que levou à sua ampla utilização em produtos farmacêuticos como solubilizante, modificador de libertação e agente de suspensão em formulações tópicas, retais e oculares (Balakrishnan et al., 2015; Changsan et al., 2023; Saitani et al., 2024). O P407 pode melhorar a biodisponibilidade dos fármacos devido ao seu caráter anfifílico e capacidade de auto-organização para formar micelas com um interior hidrofóbico composto por blocos de óxido de polipropileno e um exterior hidrofílico composto por blocos de óxido de polietileno (Changsan et al.,

2023). Esta propriedade é o que permite o desenvolvimento do fenómeno da termogelificação de forma reversível, caracterizado pela passagem do estado líquido em baixa temperatura a um gel quando a temperatura aumenta, resultante da dessolvatação do polímero e posterior fidelização (Cho et al., 2011; Chu et al., 2013).

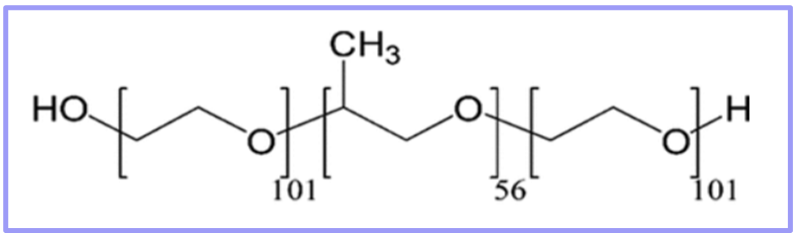


Figura 4. Estrutura química do poloxâmero 407. Adaptado de (Sakuma et al., 2024).

A hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) é um polímero semissintético não iônico amplamente utilizado em formulações farmacêuticas devido à sua elevada biocompatibilidade, baixa toxicidade, capacidade de intumescimento em meios aquosos e excelente propriedade formadora de filmes e matrizes hidrofílicas, com a estrutura química apresentada na **figura 5** (Laffleur; Bauer, 2021; Rowe; Sheskey; Owen, 2006). No contexto de sistemas de administração nasal, a HPMC destaca-se por sua habilidade de aumentar a viscosidade das formulações, promover a retenção na mucosa nasal e contribuir para o prolongamento do tempo de residência do fármaco no sítio de absorção, reduzindo o impacto do aclaramento mucociliar (Mura et al., 2018; Shaikh et al., 2011). Além disso, seu caráter hidrofílico favorece a hidratação local e a formação de uma matriz polimérica que pode atuar como barreira difusional, permitindo a liberação controlada de fármacos e a estabilização de sistemas coloidais (Laffleur; Bauer, 2021).

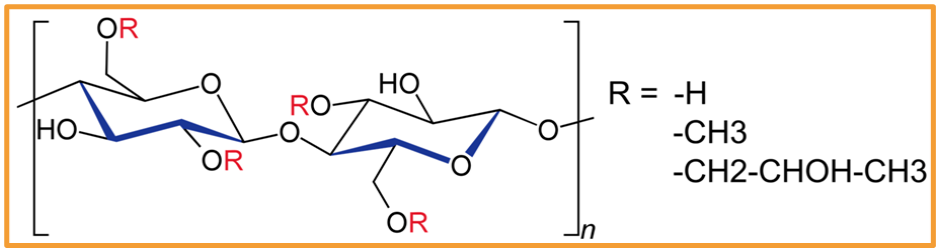


Figura 5. Estrutura química da hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) (Vlad et al., 2025).

Assim, a incorporação de complexos de inclusão 3*O*MQ/HPβCD em dispersões coloidais poliméricas hidrofílicas representa uma estratégia integrada e racional, capaz de abordar simultaneamente as principais limitações associadas ao uso terapêutico da 3*O*MQ. Essa abordagem permite aumentar sua solubilidade e estabilidade, prolongar o tempo de residência na mucosa nasal, favorecer a absorção sistêmica e potencialmente o transporte direto para o cérebro, oferecendo, portanto, uma plataforma tecnológica promissora para possibilitar a aplicação da 3*O*MQ no tratamento do GB em pesquisas futuras. Os resultados obtidos com o uso desses polímeros estão apresentados nos capítulos 2 e 3.

RESUMO CAPÍTULO 2

O segundo capítulo é um artigo que contempla a validação de um método bioanalítico por HPLC-UV, previamente desenvolvido por Bidone et al., 2014, para a quantificação de 3-*O*-metilquercetina (3*O*MQ). Esta validação incorpora modificações na fase móvel e na matriz biológica para adaptar o método a estudos intranasais. A validação foi conduzida com foco em um uso específico, seguindo as recomendações das diretrizes ICH M10 e as regulamentações vigentes da ANVISA. Parâmetros críticos como seletividade e especificidade, linearidade na faixa de 1–25 µg/mL, sensibilidade, precisão, exatidão, robustez, efeito de matriz e recuperação foram avaliados.

O método adaptado demonstrou desempenho analítico adequado e reprodutível na nova matriz, mucosa nasal suína, sem interferência significativa dos componentes biológicos ou da formulação. Além disso, a consistência dos resultados obtidos confirmou a adequação do procedimento analítico para a quantificação de 3*O*MQ em estudos *in vitro* e *ex vivo*. A aplicabilidade do método foi corroborada por sua utilização em ensaios de liberação, permeação e retenção de 3*O*MQ a partir de uma formulação intranasal à base de quitosana incorporando o complexo 3*O*MQ/HPβCD. Em conjunto, os resultados confirmam que a adaptação e revalidação do método originalmente proposto por Bidone e cols (Bidone et al., 2014). constituem uma ferramenta confiável para a avaliação biofarmacêutica de sistemas de administração nasal de 3*O*MQ.

Capítulo 2 – Artigo de validação: Validation and application of an HPLC–UV method for the quantification of 3-*O*-methylquercetin in nasal mucosa

Validation and application of an HPLC–UV method for the quantification of 3-*O*-methylquercetin in nasal mucosa

Jeniffer Viviana Ramirez Hernández[a], Laura da Silva Machado[a], Flávia Nathiely Silveira Fachel[a], Sara Elis Bianchi[a], Elizandra Braganhol[b], Sheila Porto de Matos[a], and Valquíria Linck Bassani[a]

[a]Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 2752, 90600-00 Porto Alegre, RS, Brazil.

[b] Programa de Pós-Graduação em Biociências, Universidade de Ciências da Saúde de Porto Alegre, R. Sarmento Leite, 245, 90.050-170, Porto Alegre, RS, Brazil.

Correspondence: Valquiria Linck Bassani Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas Universidade Federal do Rio Grande do Sul 90610-000 – Porto Alegre, RS, Brazil Phone: + 55 51 999620162 valquiria.bassani@ufrgs.br

Abstract

3-*O*-methylquercetin (3*O*MQ) is a methylated flavonoid with relevant biological activity whose reliable quantification in complex biological matrices remains analytically challenging due to its low aqueous solubility and matrix-related interferences. In the present study, a previously reported HPLC-UV method was adapted and revalidated for quantifying 3*O*MQ in porcine nasal mucosa for use in in vitro permeation and retention studies. Chromatographic separation was achieved under isocratic conditions using a phenyl stationary phase, providing adequate selectivity and reproducibility in the new biological matrix. The method demonstrated excellent linearity over the concentration range of 1–25 µg/mL ($r^2 > 0.99$). Accuracy and precision met international regulatory acceptance criteria, with relative standard deviations below 5% for both intra-day and inter-day evaluations. It also demonstrated excellent robustness under deliberate variations in flow rate, temperature, and detection wavelength (RSD < 2.00%). Matrix effect (86.94 -110.28%) and recovery (85.21 - 106.47%) results confirmed the reproducibility and the efficiency of the method. The applicability of the revalidated method was demonstrated through in vitro release, permeation, and retention experiments using Franz diffusion cells and porcine nasal mucosa. These findings demonstrate that the method is precise, sensitive, and robust, making it suitable for nasal permeation and retention studies of 3*O*MQ. Moreover, this analytical approach represents a reliable tool for in vitro and ex vivo pharmaceutical research, supporting the development and evaluation of nasal drug delivery systems for poorly soluble bioactive compounds, particularly flavonoid aglycones.

Keywords

Bioanalytical method validation, HPLC, 3-*O*-methylquercetin, nasal mucosa.

1. INTRODUCTION

The reliable quantification of bioactive flavonoids in complex biological matrices remains a significant analytical challenge, particularly for compounds with low aqueous solubility and strong interactions with endogenous matrix components. In this context, the validation of fit-for-purpose bioanalytical methods is essential to ensure reliable and reproducible quantification, as well as to confirm the suitability of the analytical approach for reliable analyte identification and quantification in the presence of matrix-related interferences, thereby minimizing systematic errors in in vitro and ex vivo studies [1]. Furthermore, the assessment of critical parameters, such as the limit of quantification, robustness, accuracy, precision, and matrix effect, is essential for the proper interpretation of bioanalytical results in complex systems [2].

3-*O*-methylquercetin (3*O*MQ) is a methylated flavonoid structurally derived from quercetin and has been identified in several plant species, including *Nicotiana tabacum*, *Solanum rostratum*, and *Achyrocline satureioides* [3–5]. This compound has been associated with a broad spectrum of biological activities, notably antioxidant, anti-inflammatory, antitumor, and neuroprotective, highlighting its potential therapeutic value for various pathological conditions [6–9]. However, 3*O*MQ exhibits limited solubility in aqueous media due to its aglycone nature and the increased hydrophobicity resulting from methylation of the hydroxyl group. This characteristic limit its incorporation into hydrophilic formulations, its bioavailability, and, consequently, its therapeutic potential, despite its significant pharmacological properties [10]. The molecular structure of 3*O*MQ is shown in **Figure 1**.

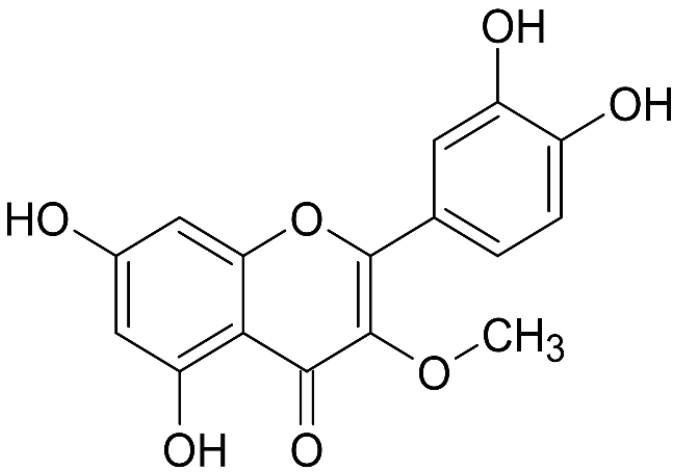


Figure 1. Chemical structure of 3-*O*-methylquercetin (5,7,3',4'-tetrahydroxy-3-methoxyflavone; 3*O*MQ).

Inclusion complexes of 3-*O*-methylquercetin (3*O*MQ) with cyclodextrins (CDs) have been investigated as an effective strategy to improve the apparent aqueous solubility, stability, and handling of this hydrophobic flavonoid, taking advantage of the characteristic CD architecture, which comprises a lipophilic internal cavity capable of hosting hydrophobic molecules and a hydrophilic outer surface that favors interaction with aqueous media [11]. In parallel, the incorporation of biocompatible polymers such as chitosan has been explored as a means to modulate drug diffusion and enhance interactions with biological membranes, particularly in mucosal systems [12]. In this context, previous studies by our research group demonstrated that the complexation of 3*O*MQ, present in a flavonoid-rich fraction of Achyrocline satureioides, with β-cyclodextrin (βCD) improved its physicochemical properties [13]. However, the practical application of natural βCD is limited by its low aqueous solubility and toxicity concerns associated with certain administration routes. Therefore, hydroxypropyl-β-cyclodextrin (HPβCD) was selected in the present study due to its high water solubility, favorable safety profile, and broad applicability in pharmaceutical systems, including nasal administration [11,14–16]. The incorporation of the 3*O*MQ/HPβCD complex into a chitosan matrix thus provides a suitable experimental system to support analytical method evaluation in a biologically relevant and matrix-challenging context.

From an analytical perspective, the quantification of 3*O*MQ has been previously addressed by Bidone et al. (2014), who developed and validated a bioanalytical method for quantifying 3*O*MQ in porcine skin after application of *Achyrocline satureioides* extracts. Their study focused on a nanoemulsion containing a dry extract from the species designed for cutaneous delivery. The analytical method was intended to assess the in vitro performance of this formulation as a cutaneous drug delivery system [4]. However, to date, no bioanalytical method validation studies of 3*O*MQ in porcine nasal mucosa have been reported, as the applicability of the method reported by Bidone et al. (2014) was restricted to skin tissue and to the experimental and regulatory context in place at the time of its development.

In addition, current regulatory expectations for bioanalytical method validation have evolved, with updated international and national guidelines emphasizing the need for

validation strategies tailored to the intended application of the method. The implementation of the ICH M10 guideline and the recent ANVISA Resolution RDC nº 941/2024 reinforce the importance of systematically evaluating critical validation parameters when established methods are applied to new matrices or experimental purposes [17,18].

Within this context, the main objective of the present study was to validate a bioanalytical method, based on the method reported by Bidone et al., for quantifying 3*O*MQ in porcine nasal mucosa, using a pharmaceutical formulation for intranasal administration, composed of cyclodextrin as a solubilizing agent and chitosan to promote nasal retention. A specific validation approach was employed to ensure the method's suitability for in vitro and ex vivo permeation and retention studies. By extending the applicability of the validated method to a new biological matrix and regulatory framework, this work provides a robust and reliable bioanalytical tool for the quantification of 3*O*MQ in complex nasal mucosa matrices.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Chemicals and reagents

The 3*O*MQ compound (>97% purity) was previously obtained by extraction from the inflorescences of *Achyrocline satureioides*. This raw material was provided by the Multidisciplinary Center for Chemical, Biological, and Agricultural Research at the State University of Campinas (CPQBA-UNICAMP, São Paulo, Brazil). A reference specimen (No. 308) was deposited in the CPQBA/UNICAMP herbarium and access to genetic heritage in Brazil was registered in the SisGen system (Sistema Nacional de Gestão do Patrimonio Genético e Conhecimento Associado) under No. A732800. Water (H_2O) was purified using a Milli-Q system (TGI Pure Water Systems, Brea, CA, USA). Methanol (MeOH), acetonitrile (ACN), and trifluoroacetic acid were of HPLC grade (Tedia, Fairfield, OH, USA). Sigma-Aldrich Co. supplied 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin (HPβCD) with DS≈ 0.80 (São Paulo, Brazil), as well as low-molecular-weight chitosan.

2.2 Preparation of the stock and work solutions

Stock solutions of 3*O*MQ were prepared by accurately weighing 10 mg of the compound into a 10 mL volumetric flask, dissolving it, and making up the volume with methanol. For simultaneous quantitative analysis, appropriate aliquots of the stock solution were transferred to prepare a standard mixture solution at 100 µg/mL (1 µg/mL= 1 mg/L). Subsequently, a series of standard solutions with final concentrations ranging from 1 to 25 µg/mL was prepared by diluting with methanol to establish a calibration curve. Working standard solutions were prepared to facilitate quantitative analysis and to evaluate various validation parameters. Both stock and working solutions were maintained refrigerated at approximately 4 °C throughout the experimental procedures.

2.3 Preparation of the biological matrix

The porcine nasal mucosa was extracted with 30 mL of methanol, with the biological samples immersed in the solvent for at least 24 hours at 4 °C prior to selectivity and matrix effect testing. The extended extraction period was used to promote the efficient transfer of endogenous matrix components into the solvent, generating a representative biological matrix for subsequent bioanalytical validation experiments. The low temperature was maintained to minimize potential degradation of matrix constituents.

The extracts were filtered through a 0.45 µm PTFE syringe filter (Captiva) and the supernatants were stored at 4 °C until further analysis. This extraction procedure produces a simplified matrix extract suitable for bioanalytical validation in in vitro and ex vivo permeation and retention studies while ensuring adequate matrix consistency for method evaluation.

2.4 Preparation of the chitosan-based formulation

The 3*O*MQ/HPβCD complex was prepared by an organoaqueous method using a mixture of ethanol:water (40:60) as solvent. A 0.1% (w/v) chitosan dispersionwas then

prepared in distilled water, and the complex was subsequently incorporated into the polymeric matrix [19–21].

2.5 Chromatographic system and conditions

The liquid chromatography system used was a Shimadzu LC-20AT, equipped with an LC-20AT pump, a CBM-20A system controller, an SIL-20A autosampler, and an SPD-20AV UV/VIS detector (at 362 nm). The column employed was a ZORBAX Eclipse XDB-Phenyl (Agilent Technologies) measuring 150 × 4.6 mm i.d., 3.5 µm, protected by a C18 guard column (20 × 3.9 mm, 10 mm i.d.) (Waters, USA) [4]. The mobile phase consisted of acetonitrile, methanol, and water containing 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid (10:44:46, v/v/v). The injection volume was 20 µL, and elution was carried out under isocratic conditions at a flow rate of 0.8 mL/min. The system temperature was maintained at 30 ± 1 °C, and detection was performed at 362 nm. These conditions were based on those reported by Bidone et al. (2014).

2.6 Method validation

The validation experiment was conducted following applicable recommendations of the ICH M10 guideline on bioanalytical method validation (ICH M10 - Bioanalytical Method Validation, European Medicines Agency, 2022) and the recommendations of the Brazilian Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), as defined in Resolution RDC nº 941/2024, using a fit-for-purpose approach for in vitro and ex vivo permeation and retention studies [17,18].

2.6.1 Selectivity and specificity

The ability of an analytical method to differentiate and quantify the analyte in the presence of potentially interfering substances, either from the biological matrix or the blank formulation, was evaluated based on the retention time of 3*O*MQ. Spectra, peak areas, and retention times of the analyte were compared between samples of the biological matrix and the formulation. The method is considered selective and specific when no interferences are observed near the analyte's retention time.

2.6.2 Calibration curve and linearity

A calibration curve was constructed using six concentration levels (1, 5, 10, 15, 20, and 25 µg/mL), covering a ranging from 1 to 25 µg/mL, with each concentration analyzed in quintuplicate over three different days. Peak areas obtained from the chromatograms were plotted against theoretical concentrations and analyzed by least-squares linear regression to determine the slope, y-intercept, and correlation coefficient. Calibration curves were constructed using unweighted linear regression, as this model provided adequate accuracy and precision across the validated concentration range, within the method's fit-for-purpose context.

2.6.3 Limits of detection and and lower limit of quantification (LLOQ)

The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were calculated from the parameters of the regression equation, in accordance with the guideline ICH M10 (2022). LOD and LOQ were estimated based on the calibration curve parameters. The lower limit of quantification (LLOQ), defined as the lowest concentration level of the calibration curve (1 µg/mL), was experimentally verified through accuracy and precision assessments and met the predefined acceptance criteria. Therefore, the LLOQ was considered the relevant sensitivity parameter for the intended in vitro and ex vivo applications of the method, in accordance with the acceptance criteria established by ANVISA and ICH M10 guidelines [17,18].

2.6.4 Precision and accuracy

Precision was evaluated using six replicates at each concentration quality control (QC) level namely the lower limit of quantification (LLOQ), low (LQC), medium (MQC), high (HQC), and upper limit of quantification (ULOQ), analyzed on the same day (intra-day) and across three different days (inter-day). Results were expressed as relative standard deviation (RSD). Similarly, accuracy was evaluated using six replicates on the same day and on consecutive days by comparing the measured concentrations with their corresponding nominal concentrations and expressing the results as percentage of the nominal concentration. According to ANVISA and ICH M10, precision was considered acceptable when the relative standard deviation did not exceed 15% for QC levels and 20% for the LLOQ, while accuracy was considered acceptable when values were within 85–115% of the nominal concentration and 80–120% for LLOQ [17,18].

2.6.5 Robustness

The robustness was assessed by varying critical parameters such as temperature (±1 °C), wavelength (±1 nm), and flow rate (±0.01 mL/min), with each condition analyzed in triplicate. During each experiment, all other parameters were kept constant at their optimal values. Robustness was evaluated by comparing accuracy, bias, and precision across the different conditions to assess the ability of the method to remain unaffected by minor changes in experimental parameters.

Robustness was assessed at the ULOQ level, as this concentration is representative of the working range of the method and represents the worst-case scenario for detecting the impact of deliberate chromatographic variations within the appropriate context for the purpose of the study.

2.6.6 Matrix effect

The matrix effect, defined as the influence of sample components on the analyte signal, was evaluated by comparing peak areas in each study matrix spiked with standard solutions at LLOQ, MQC, and ULOQ levels, along with solutions prepared at the same concentrations without matrix. According to ICH M10 criteria, results are considered acceptable when accuracy is within ±15% of the nominal concentration, and precision is ≤15% [17]. The matrix effect was evaluated using extracted porcine nasal mucosa, as this represents the actual matrix subjected to chromatographic analysis within the appropriate context of the method.

2.6.7 Recovery

The analyte solutions at LLOQ, MQC, and ULOQ levels were spiked into the specified matrices, namely porcine nasal mucosa extract and chitosan–cyclodextrin–based formulation, which were subsequently analyzed. Recovery was expressed as a percentage, calculated by comparing the results obtained in the presence of the matrix with those obtained at the same concentrations in the absence of the matrix. According to ANVISA Resolution RDC 941/2024 and ICH M10 (2022), recovery values within ≤15% are considered acceptable [17,18]. Recovery values were considered acceptable based on their consistency and reproducibility across all concentration levels, rather than absolute recovery, in accordance with the purpose of validation.

2.7 Method application

2.7.1. In vitro release of 3OMQ from the formulations

The in vitro release of 3*O*MQ at 1 mg/mL was evaluated from a 3*O*MQ solution in propylene glycol (PS) and from the 0.1% chitosan-based formulation containing the 3*O*MQ/HPβCD complex (FC). The in vitro release study was performed following the method described by Fachel et al. (2018), using a Franz diffusion cell with an approximate diffusion area of 1.80 cm² and synthetic cellulose ester membranes with a pore size of 50 nm (Millipore®). The receptor compartment was filled with 12 mL of a PBS/ethanol mixture (70:30, v/v), and the solution was maintained at 35 ± 1 °C. A 500 µL sample was placed in the donor compartment, with the temperature maintained constant throughout the assay. To estimate the amount of 3*O*MQ released from the formulation over 8 hours, 1.0 mL samples were withdrawn from the receptor fluid at 30, 60, 120, 180, 240, 300, 360, 420, and 480 minutes, and the same volume was replaced with fresh medium to maintain a constant receptor volume. All aliquots were filtered through a 0.45 µm PTFE syringe filter (Captiva) and analyzed by the previously validated HPLC-UV method. The area under the curve (AUC) for PS and FC was calculated and compared using GraphPad Prism 5 software [22].

2.7.2. Permeation/retention of 3OMQ in porcine nasal mucosa

The permeation and retention of 3*O*MQ in propylene glycol (PS) and the chitosan-based formulation containing 3*O*MQ/HPβCD complex (FC) were evaluated using a Franz diffusion cell across porcine nasal mucosa membranes. The nasal mucosa was obtained from a local slaughterhouse (Harmonia, Brazil) and prepared according to the method described by Fachel et al. (2018). Prior to the experiment, the mucosa was immersed in phosphate-buffered saline (PBS) at pH 7.4 for 30 minutes. Subsequently, the membrane was placed between the donor and receptor compartments, with the receptor compartment filled with 12 mL of a PBS/ethanol mixture (70:30). The receptor solution was maintained at a controlled temperature of 35 ± 1 °C. In the donor compartment, 500 µL of each sample was added, maintaining constant immersion conditions. Samples of 1.0 mL were withdrawn from the receptor fluid at hourly intervals, and the same volume was replaced with fresh medium to maintain a constant receptor volume. After 8 hours, the mucosa was cleaned with a cotton swab, rinsed with Milli-Q water to remove any excess, removed from the diffusion cell, and cut into small pieces. The retained 3*O*MQ was extracted from the mucosa using methanol in

an ultrasonic bath for 30 minutes. All aliquots were subsequently filtered and analyzed by the previously validated HPLC-UV method [22].

2.7.3. Statistical analysis

Data from in vitro release, permeation, and retention studies were obtained using six independent Franz diffusion cells (n = 6) per experimental condition and are presented as mean ± standard deviation (SD). Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software 8.0.1.

Inferential statistical analysis was applied only when comparisons between formulations were required. In this case, retention data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's post hoc test to identify statistically significant differences between groups. A p value < 0.05 was considered statistically significant.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Validation of the 3*O*MQ analytical method

The analytical method for quantifying 3*O*MQ was validated to evaluate the release, permeation, and retention of the formulation intended for nasal application. The procedure was carried out in accordance with ANVISA Resolution RDC No. 941/2024 and the international guideline ICH M10 (2022) on bioanalytical method validation [17,18]. Key parameters assessed included selectivity, specificity, matrix effect, recovery, response function (calibration curve within the LLOQ–ULOQ range), accuracy, precision, and robustness.

3.1.1 Selectivity and specificity

The selectivity of the method was confirmed by the absence of interference from matrix components at the retention times of the analyte peak. This parameter was assessed by comparing chromatograms of the formulation and biological matrix with those of samples containing 3*O*MQ, confirming the high selectivity of the method (**Figure 2**). Furthermore, the method proved to be specific for this flavonoid, as no interferences

were observed. This may be attributed to the lack of absorbance from the formulation and porcine nasal mucosa extract at the set wavelength, which shows only a weak signal around 2 minutes, without affecting the retention time or peak area of 3*O*MQ, consistent with findings reported by Bidone et al. in 2014 [4].

In addition, system suitability was verified prior to analysis by assessing retention time repeatability and peak area precision, with relative standard deviations consistently below 2%. Adequate chromatographic separation was confirmed by the absence of interfering peaks near the retention time of 3*O*MQ in blank matrices and formulations.

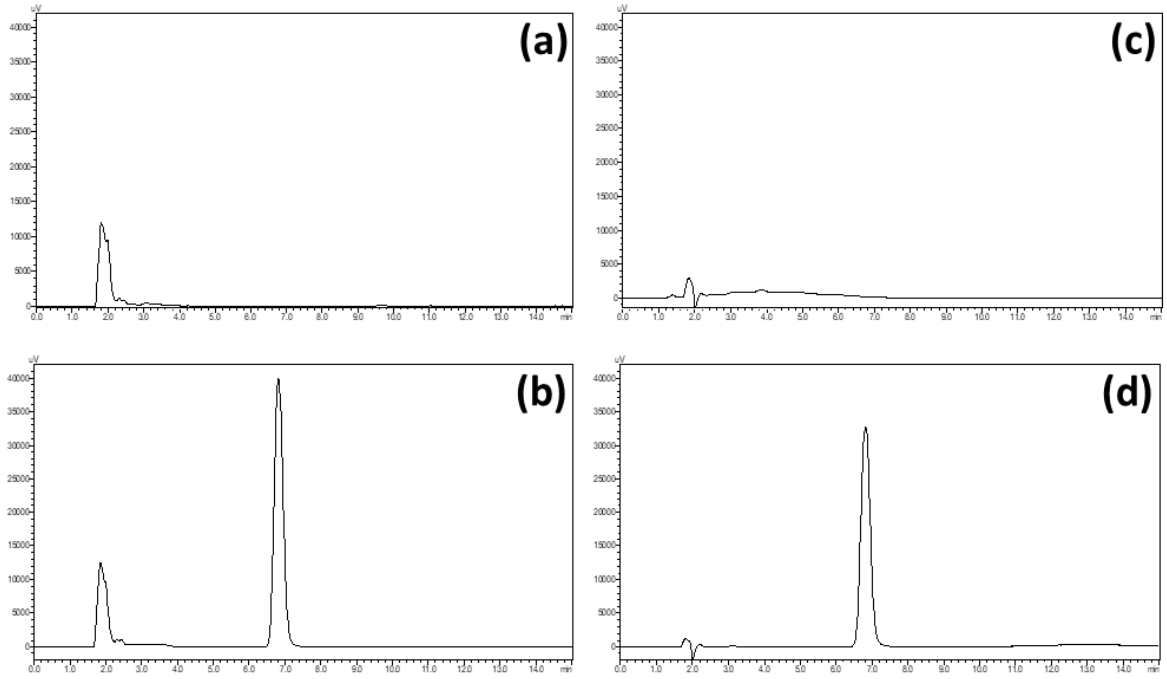


Figure 2. Liquid chromatography profile at 362 nm: (a) Chromatogram of porcine nasal mucosa extract; (b) Chromatogram of the biological matrix with 3*O*MQ at 10 µg/mL; (c) Chromatogram of the blank formulation; (d) Chromatogram of the 0.1 % chitosan formulation with 3*O*MQ at 10 µg/mL. Analytical conditions: Column ZORBAX Eclipse XDB-Phenyl, 150 × 4.6 mm, 3.5 µm; ACN:MeOH:H_2O + 0.1 % TFA, 10:44:46 v/v/v; isocratic, 0.8 mL/min; 20 µL; 30 °C.

3.1.2 Linearity curve and limits of detection and quantification

The linearity of the method was assessed using linear regression of the calibration curve (**Table 1**). The determination coefficient (r^2) was calculated over a concentration

range of 1 to 25 µg/mL, achieving values above 0.99, indicating a strong correlation. The slope and Y-intercept were used to calculate the limits of detection (LOD) and quantification (LOQ), which were 0.346 µg/mL and 1.049 µg/mL, respectively. The calibration curves demonstrated adequate linearity across the validated concentration range when fitted using unweighted linear regression, with residuals evenly distributed around zero and no systematic deviation observed at the lower concentration levels.

Table 1. Linearity curve of the HPLC analysis of 3*O*MQ

Parameters	Results
Equation	Y = 129165x - 20833
r^2	0.9975
LOD (µg/mL)	0.346
LLOQ (µg/mL)	1.0
LOQ (µg/mL)	1.049
Intercept (confidence interval)	(-48011.9; 6346.8)

3.1.3 Sensitivity

The LLOQ is a critical parameter for validation, as it enables the quantification of low drug concentrations in biological matrices, as in the present study [23]. The sensitivity of the method was assessed at the LLOQ based on accuracy and precision results. Accuracy deviations were below 104%, and relative standard deviations below 5 % for both intra-day and inter-day measurements. These values are well within the acceptance criteria established by ANVISA Resolution RDC No. 941/2024 and ICH M10 (2022) [17,18], confirming the adequate sensitivity of the method.

3.1.4 Precision and accuracy

The precision and accuracy (**Table 2**) were evaluated at four QC levels: 1 µg/mL (LLOQ), 10 µg/mL (LQC), 15 µg/mL (MQC), and 25 µg/mL (ULQC), through five replicates, performed both on the same day (intra-day) and over three different days (inter-day). Intra-day and inter-day precision were ≤0.39 % and ≤5.17 %, respectively. Accuracy ranged from 98.73 % to 103.31 % for intra-day determinations and from

101.93 % to 103.61 % for inter-day determinations. These values fall within the criteria established by ANVISA and ICH for bioanalytical method validation, confirming that the employed method is suitable for the identification and quantification of compounds in porcine nasal mucosa samples with adequate precision and accuracy.

Table 2. Precision and accuracy data of the method

3*O*MQ Level (µg/mL)	Inter-day†		Intra-day†	
	Precision (RSD)	**Accuracy (%)**	**Precision (RSD)**	**Accuracy (%)**
1.0	4.79	103.61	3.74	101.99
10.0	4.88	101.99	0.85	98.73
15.0	5.17	101.93	0.39	98.27
25.0	3.24	103.56	1.19	103.31

†Precision was expressed as relative standard deviation (RSD) of replicate measurements and accuracy was expressed as percentage of the nominal concentration.

3.1.5 Robustness

During the robustness study, small deliberate variations were made in key analytical parameters to evaluate the robustness of the method and its ability to maintain consistent analytical performance under minor variations in method conditions. A single 3*O*MQ concentration of 25.0 µg/mL was used, and three different eluent flow rates (±0.01 mL/min) were tested, yielding an RSD of 1.79 %. This demonstrated the robustness of the method against minor flow variations. Similarly, slight adjustments to the column temperature and detection wavelength resulted in RSDs of 1.47 % and 1.36 %, respectively, confirming that the method performance remained unaffected by these variations. These robustness studies demonstrate that the method can tolerate minor deliberate variations in the evaluated parameters while maintaining reliable results, with relative standard deviations remaining well within the acceptable range (RSD ≤ 3 %) as recommended by ANVISA Resolution RDC No. 941/2024 and ICH M10 (2022) [17,18]. The results are presented in **Table 3**.

Table 3. Robustness results of 3*O*MQ.

Changes in parameters		3*O*MQ Level (µg/mL)	Mean Peak area	SD	RSD†
Flow rate	±0.01 (mL/min)		3301684	59103.42	1.79
Column temperature	±1(°C)	25	3339636	49020.13	1.47
Detection wavelength	±1 (nm)		3320575	45111.93	1.36

†RSD, relative standard deviation.

3.1.6 Matrix effect and recovery

The normalized matrix factor percentage is within acceptable limits (the concentrations measured at all three levels are within 15% of the nominal value). These values were within the range of 86.94% to 110.28%. Although most concentrations showed slightly lower responses than the nominal values, this tendency was within the expected method variability and does not reflect a real decrease in the analytical response. In contrast, a slight increase in response was observed at the LLOQ level in the formulation, which also remained within acceptable limits. Additionally, the relative standard deviation (RSD) of the matrix factor in the two matrices ranged from 1.77% to 5.07%, as shown in **Table 4**.

Table 4. Matrix effect and extraction recovery for 3*O*MQ

Matrix	3*O*MQ Level (µg/mL)	Matrix effect		Recovery	
		Mean %	RSD	Mean %	RSD
Formulation	1	110.28	5.07	106.47	4.79
	10	92.90	4.43	91.20	5.17
	25	93.08	3.00	90.59	3.67
Porcine nasal mucosa extract	1	93.12	4.68	89.96	5.68
	10	87.80	1.77	86.27	5.27
	25	86.94	2.02	85.21	2.16

Analyte recovery after extraction ranged from 85.21% to 106.47%, with precision (RSD) between 2.16% and 5.27%, as detailed in **Table 4**. Recovery was consistent across QC levels, and precision well met the FDA Bioanalytical Method Validation guideline acceptance criterion of ≤15 %. These results indicate that the analytical method provides consistent and reproducible responses across the evaluated matrices, meeting the applicable validation criteria established in current regulatory guidelines.

The results indicate that a method based on the approach proposed by Bidone et al. can also be applied to other types of biological samples, such as porcine nasal mucosa [4]. The results are highly representative and indicate that the developed method allows rapid and accurate quantification of 3*O*MQ in the nasal mucosa. The low relative standard deviation (RSD % < 15 %) supports this observation and aligns with previous studies on the presence of this flavonoid. This information is particularly relevant for permeation studies of nasal formulations containing the 3*O*MQ/HPβCD complex.

3.2 Method application

3.2.1 In vitro release of 3OMQ from the formulation

To demonstrate the applicability of the validated HPLC-UV method under experimental conditions involving drug release and diffusion, in vitro release experiments were performed through cellulose ester membranes using Franz diffusion cells. An amount of 500 µg of 3*O*MQ was applied to each diffusion cell.

Figure 3 shows the release of 3*O*MQ through synthetic cellulose ester membranes from the 3*O*MQ dispersion in propylene glycol (PS) and the chitosan-based formulation (FC). After 8 hours, the release reached 90.9 µg/cm² for PS and 94.9 µg/cm² for FC. Both systems produced comparable release profiles, enabling consistent quantification of 3*O*MQ throughout the experimental time course and demonstrating the suitability of the method for monitoring analyte concentrations under time-dependent experimental conditions.

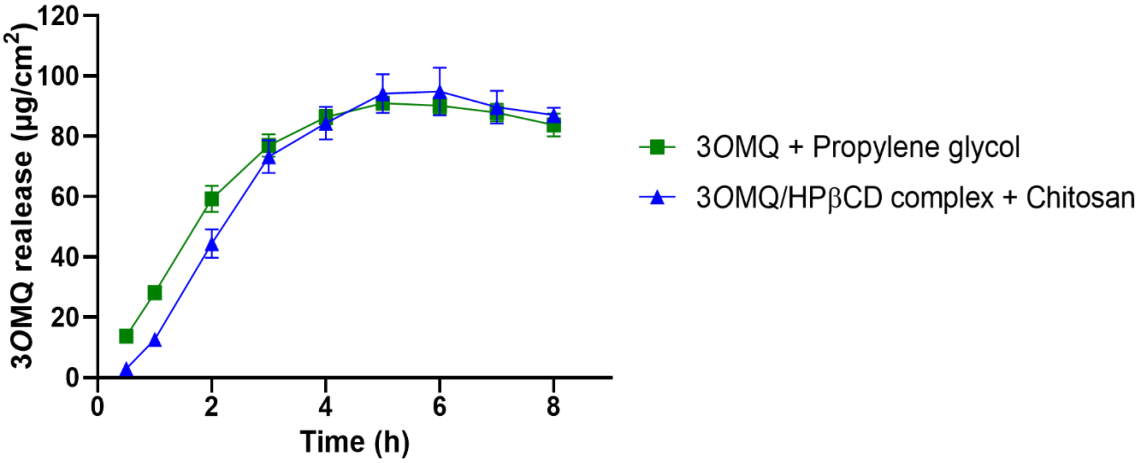


Figure 3. In vitro release profile through a synthetic cellulose membrane with a pore size of 50 nm (Millipore®) of 3*O*MQ. Data represent mean ± SD (standard deviation).

3.2.2 Permeation and retention of 3OMQ from the formulation

Additionally, ex vivo permeation and retention experiments of 3*O*MQ from PS and FC across porcine nasal mucosa were conducted to further evaluate the performance of the validated method in a biological tissue matrix, with the same dose applied to enable comparison between the formulation profiles and a reference 3*O*MQ solution. This model was chosen to evaluate the intranasal permeation/retention potential of the drug in a matrix with morphological similarities to human nasal mucosa, while considering ethical aspects [24,25]. To date, the permeation and retention of 3*O*MQ across the nasal mucosa using animal models have not been previously reported.

The permeation profile of 3*O*MQ across porcine nasal mucosa for PS and FC is shown in **Figure 4 (a)**. After 8 hours of kinetic study, only the chitosan-based formulation enabled analyte permeation, reaching approximately 22.12 µg/cm². A summary of permeation and retention values obtained after 8 h, including the corresponding RSD%, is presented in **Table 5**. In contrast, permeation from the propylene glycol control solution remained below the LLOQ throughout the experiment, despite its previously observed faster and sustained release profile and the well-documented permeability-enhancing properties of propylene glycol [26]. Although the absolute permeation values were modest, they clearly demonstrated a differential permeation behavior between the formulation and the reference solution, with the chitosan-based system enabling measurable permeation of 3*O*MQ across the nasal mucosa.

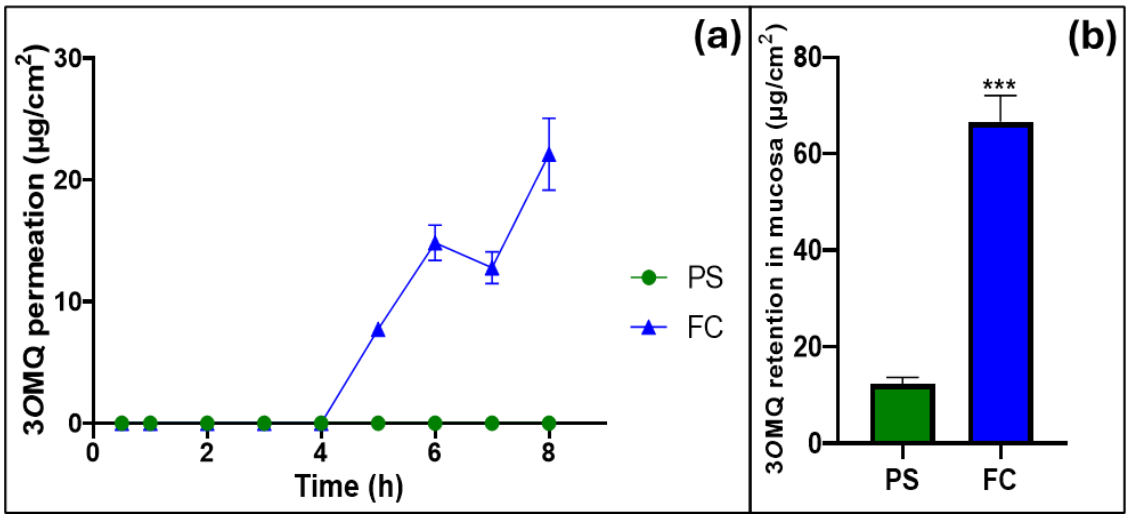


Figure 4. (a) Permeation and (b) retention profiles of 3*O*MQ through porcine nasal mucosa of (a). PS: 3*O*MQ in propylene glycol; FC: chitosan-based formulation containing 3*O*MQ/HPβCD complex. Data are expressed as mean ± SD (standard deviation) (n = 6). Statistical analysis for retention data was performed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post hoc test. ***p < 0.001 compared to PS.

Table 5. Summary of permeation and retention through porcine nasal mucosa after 8 h.

Method application	Formulation	Mean ± SD (RSD)†
Permeation (µg/cm²)	PS	< LLOQ
	FC	22.12 ± 2.97 (13.41)
Retention (µg/cm²)	PS	12.31 ± 1.42 (11.49)
	FC	66.68 ± 5.41 (8.11)

†SD, standard deviation; RSD, relative standard deviation; LLOQ, lower limit of quantification; PS, 3*O*MQ dispersion in propylene glycol; FC, chitosan-based formulation. Values are expressed as mean ± SD (n = 5).

The observed permeation profiles primarily served to confirm the capability of the validated method to reliably quantify low analyte levels in porcine nasal mucosa under ex vivo experimental conditions. Although a detailed mechanistic interpretation of

permeation was beyond the scope of the present analytical study, it is worth noting that β-cyclodextrin derivatives such as HPβCD have been reported to enhance the aqueous solubility of hydrophobic compounds, favoring their availability for permeation. In addition, the presence of positively charged chitosan in the slightly acidic nasal environment has been described as a factor that may further facilitate analyte diffusion across mucosal barriers [27,28].

Regarding the amount of 3*O*MQ retained in porcine nasal mucosa after 8 h, FC showed significantly higher retention ($p < 0.001$) compared to the propylene glycol solution, reaching 66.7 μg/cm², as illustrated in **Figure 4 (b)**. PS showed significant lower retention of 12.3 μg/cm², suggesting that the chitosan-based system favored greater drug interaction with the nasal mucosa. These findings highlight the measurable permeation and the markedly higher retention of 3*O*MQ within the nasal mucosa are likely due to interactions between cationic chitosan particles and the negatively charged sialic acid residues in mucus and cell membranes. These electrostatic interactions help maintain the flavonoid at the nasal mucosa site and extend its local residence time [27,28].

It should be emphasized that these experiments were not intended to fully characterize formulation performance or to establish a complete mass balance, but rather to demonstrate the applicability of the revalidated bioanalytical method for the reliable quantification of 3*O*MQ in complex biological matrices under conditions relevant to in vitro and ex vivo permeation and retention studies.

4. CONCLUSION

In this study, a bioanalytical HPLC–UV method originally reported by Bidone et al for porcine skin formulation was successfully revalidated for the quantification of 3*O*MQ in porcine nasal mucosa. The validation strategy followed a purposeful approach, addressing current regulatory expectations and demonstrating adequate selectivity, linearity, sensitivity, precision, accuracy, robustness, and control of matrix effects in a complex biological matrix.

The applicability of the revalidated method was further demonstrated through in vitro and ex vivo experiments designed to challenge its performance under conditions relevant to permeation and retention studies, confirming its suitability for reliable quantification of low analyte levels over the experimental time course.

In this context, the present study provides a robust and reproducible bioanalytical tool for the quantification of 3*O*MQ in nasal mucosa, supporting future in vitro and ex vivo investigations by applying an established analytical method to a new biological matrix relevant for nasal drug delivery.

Author contributions

Jeniffer Viviana Ramirez Hernández: conceptualization; writing– original draft. Laura da Silva Machado: Investigation; methodology. Sara Elis Bianchi: Project administration; writing– review and editing. Elizandra Braganhol: conceptualization and writing– review and editing. Flavia Nathiely Silveira Fachel: Project administration, writing– review and editing. Sheila Porto de Matos: Project administration; writing– review and editing. Valquíria Linck Bassani: conceptualization; funding acquisition; project administration; writing– review and editing.

Acknowledgements

The authors are grateful to the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Finance Code 001 and Conselho Nacional de Ciencia e Tecnologia – CNPq (grant 406218/2025-0) for the financial support and scholarships. The authors used an AI-assisted language tool to support translation and improvement of English clarity during manuscript preparation. The authors reviewed, edited, and approved the final manuscript and take full responsibility for its scientific content.

Conflict of interest statement

The authors declare that they have no competing interests.

Data Availability Statement

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

REFERENCES

1. Food and Drug Administration. *Bioanalytical Method Validation: Guidance for Industry*. 2018. http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htmand/orhttp://www.fda.gov/AnimalVeterinary/GuidanceComplianceEnforcement/GuidanceforIndustry/default.htm
2. González O, Blanco ME, Iriarte G, Bartolomé L, Maguregui MI, Alonso RM. Bioanalytical chromatographic method validation according to current regulations, with a special focus on the non-well defined parameters limit of quantification, robustness and matrix effect. *J Chromatogr A*. 2014;1353:10-27. doi:10.1016/j.chroma.2014.03.077
3. Schwingel LC, Schwingel GO, Storch N, Barreto F, Bassani VL. 3-O-Methylquercetin from organic Nicotiana tabacum L. trichomes: Influence of the variety, cultivation and extraction parameters. *Ind Crops Prod*. 2014;55:56-62. doi:10.1016/j.indcrop.2014.01.054
4. Bidone J, Bica VC, Petrovick PR, et al. Simultaneous quantification of flavonoids from Achyrocline satureioides by a polar-reversed phase lc method -application to skin permeation/retention studies. *Pharmazie*. 2014;69(1):5-9. doi:10.1691/ph.2014.3049
5. Shao Q, Chang L, Wei Z, Wei Y. Separation of four flavonol glycosides from solanum rostratum dunal using solvent sublation followed by HSCCC and low column temperature preparative HPLC. *J Chromatogr Sci*. 2018;56(8):695-701. doi:10.1093/chromsci/bmy044
6. Carini JP, Klamt F, Bassani VL. Flavonoids from Achyrocline satureioides: Promising biomolecules for anticancer therapy. *RSC Adv*. 2014;4(7):3131-3144. doi:10.1039/c3ra43627f
7. Ko W, Wang H, Lei C, Shih C, Chung M, Lin C. Mechanisms of Relaxant Action of 3-O-Methylquercetin in Isolated Guinea Pig Trachea. *Planta Med*. 2002;68:30-35.
8. Sadhu SK, Okuyama E, Fujimoto H, Ishibashi M, Yesilada E. Prostaglandin inhibitory and antioxidant components of Cistus laurifolius, a Turkish medicinal plant. *J Ethnopharmacol*. 2006;108(3):371-378. doi:10.1016/j.jep.2006.05.024
9. Dok-Go H, Lee KH, Kim HJ, et al. Neuroprotective effects of antioxidative flavonoids, quercetin, (+)-dihydroquercetin and quercetin 3-methyl ether, isolated from Opuntia ficus-indica var. saboten. *Brain Res*. 2003;965(1-2):130-136. doi:10.1016/S0006-8993(02)04150-1

10. Wen L, Jiang Y, Yang J, Zhao Y, Tian M, Yang B. Structure, bioactivity, and synthesis of methylated flavonoids. *Ann N Y Acad Sci*. 2017;1398(1):120-129. doi:10.1111/nyas.13350

11. Jambhekar SS, Breen P. Cyclodextrins in pharmaceutical formulations I: Structure and physicochemical properties, formation of complexes, and types of complex. *Drug Discov Today*. 2016;21(2):356-362. doi:10.1016/j.drudis.2015.11.017

12. Laquintana V, Lopedota AA, Ivone M, et al. Celecoxib-hydroxypropyl-β-cyclodextrin inclusion complex in a chitosan/PEO-PPO-PEO block copolymer matrix: Structural effect and drug release. *J Colloid Interface Sci*. 2024;660:1030-1038. doi:10.1016/j.jcis.2024.01.019

13. Pittol V, Veras KS, Doneda E, et al. The challenge of flavonoid/cyclodextrin complexation in a complex matrix of the quercetin, luteolin, and 3-O-methylquercetin. *Pharm Dev Technol*. 2022;27(6):625-634. doi:10.1080/10837450.2022.2098326

14. D'Aria F, Pagano B, Giancola C. Thermodynamic properties of hydroxypropyl-β-cyclodextrin/guest interaction: a survey of recent studies. *J Therm Anal Calorim*. 2022;147(8):4889-4897. doi:10.1007/s10973-021-10958-1

15. Bhargav A, Sheeba FR. Beta-Cyclodextrin As An Excipient In Drug Formulation. *Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development*. 2021;9(4):122-127. doi:10.22270/ajprd.v9i41002

16. Ianiski FR, DE OLIVEIRA AL, Mezzomo NJ, et al. β-Cyclodextrins alter the energy metabolism-related enzyme activities in rats. *An Acad Bras Cienc*. 2023;95(2):1-13. doi:10.1590/0001-3765202320201783

17. International Council for Harmonisation (ICH). *ICH Harmonised Guideline M10: Bioanalytical Method Validation and Study Sample Analysis*. 2022:1-59.

18. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). *Resolução Da Diretoria Colegiada – RDC No. 941, de 18 de Novembro de 2024*. 2024.

19. Yatsu FKJ, Koester LS, Lula I, Passos JJ, Sinisterr R, Bassani VL. Multiple complexation of cyclodextrin with soy isoflavones present in an enriched fraction. *Carbohydr Polym*. 2013;98(1):726-735. doi:10.1016/j.carbpol.2013.06.062

20. Bianchi SE, Machado BEK, da Silva MGC, et al. Coumestrol/hydroxypropyl-β-cyclodextrin association incorporated in hydroxypropyl methylcellulose hydrogel exhibits wound healing effect: in vitro and in vivo study. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2018;119:179-188. doi:10.1016/j.ejps.2018.04.019

21. Waszczuk M, Bianchi SE, Pittol V, et al. The challenge of improving pterostilbene (PTS) solubility for solid and semi-solid dosage forms: The obtention of binary and ternary systems. *Int J Pharm*. 2023;635. doi:10.1016/j.ijpharm.2023.122736

22. Fachel FNS, Medeiros-Neves B, Dal Prá M, et al. Box-Behnken design optimization of mucoadhesive chitosan-coated nanoemulsions for rosmarinic acid nasal delivery—In vitro studies. *Carbohydr Polym*. 2018;199:572-582. doi:10.1016/j.carbpol.2018.07.054

23. Bansal S, DeStefano A. Key Elements of Bioanalytical Method Validation for Small Molecules. *AAPS J*. 2007;9(1):E109-E114. http://www.aapsj.org

24. Wadell C, Bjork E, Camber O. Permeability of porcine nasal mucosa correlated with human nasal absorption. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2003;18:47-53. www.elsevier.com/locate/ejps

25. Wadell C, Bjork E, Camber O. Nasal drug delivery-evaluation of an in vitro model using porcine nasal mucosa. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1999;7:197-206.

26. Argenta DF, Bidone J, Misturini FD, et al. In vitro evaluation of mucosa permeation/retention and antiherpes activity of genistein from cationic nanoemulsions. *J Nanosci Nanotechnol*. 2016;16(2):1282-1290. doi:10.1166/jnn.2016.11676

27. Annu, Baboota S, Ali J. In vitro appraisals and ex vivo permeation prospect of chitosan nanoparticles designed for schizophrenia to intensify nasal delivery. *Polymer Bulletin*. 2022;79(4):2263-2285. doi:10.1007/s00289-021-03598-w

28. Salatin S, Barar J, Barzegar-Jalali M, Adibkia K, Milani MA, Jelvehgari M. Hydrogel nanoparticles and nanocomposites for nasal drug/vaccine delivery. *Arch Pharm Res*. 2016;39(9):1181-1192. doi:10.1007/s12272-016-0782-0

DISCUSSÃO GERAL

Os flavonoides constituem uma ampla família de compostos bioativos que, além de estarem presentes em diversos alimentos, destacam-se pelo seu significativo valor farmacológico e potencial terapêutico (Xu et al., 2024). Como esses polifenois estão presentes em uma ampla variedade de alimentos e bebidas de origem vegetal, não é surpreendente que a via oral seja sua principal forma de administração (Hasnat et al., 2024). Por outro lado, bancos de dados tem registrado mais de 400.000 flavonoides, dos quais cerca de 10.000 foram registrados como biologicamente ativos, evidenciando a notável diversidade estrutural desse grupo de compostos heteroaromáticos (Safe et al., 2021; Turatbekova et al., 2023; Xu et al., 2024).

A investigação de suas potencialidades farmacológicas tem sido realizada predominantemente por meio de produtos administrados por via oral, os quais são disponibilizados principalmente na forma de fitoterápicos ou suplementos alimentares. Poucos compostos foram explorados por vias alternativas de administração, como a via nasal. Essa via não invasiva oferece múltiplos benefícios, permitindo a entrega de diversos compostos terapêuticos para efeito tópico (ou local), sistêmico ou mesmo direcionado ao sistema nervoso central, utilizando a via *nose to brain* (Dey et al., 2011). Por isso, o uso dessa via apresenta-se como uma alternativa viável para o tratamento do glioblastoma. Como demonstrado em estudos pré-clínicos e clínicos, a administração nasal de medicamentos anticâncer, como a temozolomida (TMZ), representa um avanço promissor para direcionar o fármaco da mucosa nasal diretamente ao cérebro. Essa estratégia oferece várias vantagens potenciais em relação às vias oral e parenteral, incluindo maior precisão na entrega ao sistema nervoso central e redução de efeitos adversos (Bruinsmann et al., 2019; Michels et al., 2023; Spencer et al., 2019).

Por outro lado, a informação disponível sobre a aglicona flavonoídica 3-O-metilquercetina (3*O*MQ) é limitada em comparação com a quercetina, um composto análogo amplamente estudado e presente em diversos produtos nutracêuticos, conhecido por sua gama de atividades biológicas e relevância para a saúde humana (Baqer; Al-Shawi; Al-Younis, 2024; Vollmannová et al., 2024). No entanto, é de grande interesse expandir o conhecimento sobre os derivados metilados da quercetina,

devido ao seu potencial biológico e às aplicações terapêuticas ainda pouco exploradas.

Não obstante, a solubilidade da 3*O*MQ é limitada, o que torna necessário recorrer a estratégias para aumentar sua solubilidade aparente como a complexação com ciclodextrinas como a hidroxipropil-β-ciclodextrina (HPβCD), tanto para viabilizar a sua incorporação em formulações hidrofílicas para a via nasal, como para promover sua permeação na mucosa. Esta pesquisa não só complementa e amplia o conhecimento sobre este 3-O-metil flavonol, mas também fornece novas informações sobre a formação de complexo 3*O*MQ/HPβCD, uma abordagem relativamente recente. Embora existam numerosos estudos sobre ciclodextrinas na literatura, a informação sobre sua aplicação específica à 3*O*MQ emerge de nosso grupo de pesquisa e encontra-se principalmente relacionada à β-ciclodextrina (βCD) (Schwingel et al., 2008, 2019) e mais recentemente à HPβCD (Doneda et al., 2021; Pittol et al., 2022).

Um aspecto de destaque neste estudo é que a metodologia utilizada para a formação do complexo se mostra simples, *eco-friendly* e eficiente. Esta metodologia, previamente aplicada com sucesso na formação de outros complexos com substâncias fenólicas de origem vegetal, como o coumestrol/HPβCD e isoflavonas da soja (Bianchi et al., 2018; Yatsu et al., 2013), mostra-se como uma abordagem promissora e única para formar complexo 3*O*MQ/HPβCD. As interações entre 3*O*MQ e HPβCD foram previamente relatadas na formação de complexos com constituintes de origem vegetal utilizando ciclodextrinas, ou na incorporação de 3*O*MQ em hidrogeis de hipromelose com HPβCD. Esses antecedentes reforçam a validade e a relevância desta pesquisa dentro da literatura existente (Doneda et al., 2021; Pittol et al., 2022).

Além disso, os resultados obtidos a partir da validação bioanalítica da 3*O*MQ foram consistentes e sugerem que o método proposto originalmente por Bidone et al., 2014 é eficaz, oferecendo uma boa base para investigações sobre a interação da 3*O*MQ com amostras de mucosa nasal. Este método permitiu claramente a quantificação de 3*O*MQ na mucosa nasal de maneira rápida e precisa, uma vez que a variação percentual da RSD das análises foi baixa e consistente com os parâmetros estabelecidos pela ANVISA. Esses resultados coincidem com estudos anteriores sobre a presença deste flavonoide, reforçando sua relevância para investigações

futuras sobre os processos de retenção e permeação para as formulações nasais a serem desenvolvidas.

Outro aspecto importante a destacar é a preparação das formulações pela incorporação do complexo 3*O*MQ/HPβCD em dois tipos de dispersões coloidais poliméricas. Uma delas é constituída por hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), um polímero conhecido por suas propriedades mucoadesivas, e um polímero termossensível, o poloxamer 407 (Szalai et al., 2024; Tatavarti; Hoag, 2006). Cada uma dessas formulações apresentou características específicas, como o pH. Embora ambas sejam soluções ácidas, a maior acidez na dispersão de HPMC está associada ao microambiente criado pela formulação e influencia o estado de ionização do fármaco em meio aquoso (Tatavarti; Hoag, 2006).

A viscosidade das formulações é um dos fatores-chave a serem considerados para a administração nasal, pois está relacionado com o tempo de depuração mucosa e a conveniência da dosagem. Esta pesquisa mostrou que a presença dos polímeros aumenta a viscosidade. Portanto, elas poderiam aumentar o tempo de permanência na cavidade nasal, reduzindo a taxa de depuração mucociliar. As formulações com maior viscosidade tendem a permanecer mais tempo na mucosa e aumentar o tempo de residência na cavidade nasal; no entanto, uma viscosidade maior também pode retardar a liberação do fármaco da formulação para a superfície mucosa. Esse fenômeno é consistente ao comparar as viscosidades com os dados de liberação das formulações (Colombo et al., 2018). Por outro lado, cabe ressaltar que a dispersão coloidal de poloxamer 407 é termo-dependente, assumindo valores mais elevados em temperaturas mais altas do que em temperaturas mais baixas. Tal característica favorece a dispersão da preparação em temperaturas mais baixas, e a permanência na mucosa em temperatura corporal.

Os resultados de liberação *in vitro* mostram que duas das preparações testadas, complexo 3*O*MQ/HPβCD e a formulação 3*O*MQ/HPβCD com HPMC (F1) liberaram, respectivamente 98.7% e 96.7%, do conteúdo de 3*O*MQ no final de 8 horas de experimento. Em contraste, a formulação 3*O*MQ/HPβCD com poloxamer 407 mostrou liberação de 3*O*MQ limitada a 24.7% ao final de 8 horas de experimento, exibindo uma cinética de liberação excessivamente lenta, pouco adequada ao requerido pela via de administração nasal. Considerando que o tempo normal de depuração mucociliar

nasal é de 20 a 60 minutos (Dumortier et al., 2006; Koparal et al., 2021) é possível que ocorra sua remoção sem que tenha ocorrido liberação adequada da 3*O*MQ. A ausência de caráter mucoadesivo do polímero corrobora esta hipótese.

Em relação à permeação da 3*O*MQ avaliada em mucosa nasal suína, a partir das três preparações, os resultados demonstram que o complexo 3OMQ/HPβCD apresentou a melhor permeação (cerca de 82 μg/cm^2 em 6 horas), enquanto que as formulações com HPMC (F1) e com poloxamer 407 (F2) a permeação alcançou 33.6 μg/cm^2 e 14.3 μg/cm^2 respectivamente, em 8 h, característica desejável para direcionamento do flavonoide diretamente para o cérebro.

Os resultados da avaliação da retenção revelaram que a formulação dos complexos incorporados na dispersão coloidal de HPMC (F1) reteve mais de 25% da quantidade de 3*O*MQ na mucosa nasal porcina (38,6 μg/cm^2), em comparação com os resultados observados nas demais preparações avaliadas. Esta capacidade de retenção de 3*O*MQ na mucosa nasal observada na formulação contendo HPMC (F1) estão provavelmente relacionadas com suas propriedades mucoadesivas (Miranda et al., 2024; Pathan; More, 2017; Prego et al., 2005).

A **tabela 1** sumariza de forma comparativa e semiquantitativa os resultados obtidos nos ensaios de liberação, permeação e retenção da 3*O*MQ, expressos em uma escala qualitativa de intensidade representada por sinais de "+". Quanto maior o número de sinais, maior a intensidade relativa do fenômeno avaliado dentro do conjunto de preparações testadas. De modo geral, a Formulação 1 apresenta boas características de liberação da 3*O*MQ, boa retenção e média permeação em mucosa suína. A Formulação F2 apresenta baixa liberação e permeação e retenção media em mucosa suína. Por sua vez os complexos 3OMQ/HPβCD alta liberação *in vitro*, alta permeação e média retenção em mucosa suína.

Tabela 1. Comparação entre as características de liberação, permeação e retenção da 3*O*MQ incorporada em diversas formulações ou preparações.

	Preparações testadas		
Teste	**Complexos 3OMQ/HPβCD**	**F1**	**F2**

Liberação in vitro*	+++++	++++	++
Permeação**	+++++	+++	++
Retenção**	+++	++++	+++

*Teste de liberação *in vitro*: realizada em membrana de acetato de celulose; fluido aceptor, mistura hidroetanólica contendo etanol 30 %(v/v). **Teste de permeação e retenção em mucosa nasal suína, *in vitro*. F1-complexos 3*O*MQ/HPβCD incorporados em dispersão coloidal de HPMC; F2-complexos 3*O*MQ/HPβCD incorporados em dispersão coloidal de poloxamer 407. A classificação em sinais de "+" representa uma avaliação semiquantitativa e comparativa da intensidade de liberação, permeação e retenção da 3*O*MQ entre as diferentes preparações testadas, sendo "++" baixa, "+++" moderada, "++++" alta e "+++++" muito alta.

Os complexos 3*O*MQ/HPβCD em solução, muito embora tenham apresentado perfil de liberação satisfatório, devido ao curto tempo de residência na mucosa nasal, eles foram utilizados apenas como parâmetro de comparação. Por outro lado, a formulação F2 apresentou características que não correspondem aos quesitos necessários para a uma formulação destinada à via nasal. Ao contrário, a formulação F1 apresenta boa liberação, média permeação e a melhor retenção entre as formulações. Portanto, esta formulação foi selecionada para os subsequentes estudos biológicos *in vitro*.

Por fim, os resultados dos estudos de citotoxicidade *in vitro* na linhagem celular C6 demonstraram as características de biocompatibilidade e tolerabilidade da HPβCD, uma vez que foi observada uma viabilidade celular em torno de 95%. Em contraste, a 3*O*MQ livre, o complexo 3*O*MQ/HPβCD e a formulação F1 promoveram uma redução significativa da viabilidade desta linhagem tumoral, apresentando valores de IC_{50} de 11.29, 0.395 e 5.07 µg/mL, respectivamente.

Por outro lado, na linhagem não tumoral HaCaT, as mesmas amostras avaliadas apresentaram valores de CC_{50} de 33.84; 29.18 e 34.09 µg/mL, respectivamente. Esses resultados demonstram que a complexação do 3*O*MQ com HPβCD e sua incorporação em uma formulação polimérica à base de HPMC modificam de maneira significativa o perfil citotóxico do flavonoide, provavelmente pela modificação do perfil de liberação da molécula ativa com subsequente modulação de vias de sinalização relacionadas à morte e sobrevivência celular. No entanto, estudos mecanísticos são necessários para validar essa hipótese.

A complexação com ciclodextrinas mostrou não apenas um aumento da eficácia citotóxica frente às células tumorais, mas também uma atenuação da toxicidade sobre células saudáveis, ampliando assim a janela terapêutica do flavonoide. Adicionalmente, a formulação baseada em HPMC também apresentou uma melhora no perfil de seletividade em comparação com o 3*O*MQ livre, combinando maior atividade antitumoral com menor citotoxicidade em células HaCaT, embora em menor magnitude quando comparada ao complexo de inclusão.

Em conjunto, esses resultados evidenciam que as estratégias de complexação e formulação polimérica permitem modular favoravelmente a atividade biológica do 3*O*MQ, reforçando seu potencial como uma plataforma mais segura e seletiva para o desenvolvimento de sistemas terapêuticos direcionados ao tratamento de tumores do sistema nervoso central, como o glioblastoma.

CONCLUSÕES

- A via nasal tem atraído grande interesse, especialmente devido ao seu enfoque mais recente para direcionar medicamentos da cavidade nasal ao cérebro. Essa possibilidade tem sido explorada por meio do desenvolvimento de diversas formulações que têm alcançado melhor administração e entrega mais direcionada e precisa dos fármacos ao sistema nervoso central.
- Pela primeira vez é relatada a produção de uma quantidade expressiva de 3*O*MQ (cerca de 600 mg), a partir de inflorescências de *Achyrocline satureioides*, originando um material de partida altamente qualificado e suficiente para a realização dos ensaios físico-químicos e in vitro da presente tese.
- A pureza da 3*O*MQ isolada da planta *Achyrocline satureioides* foi superior a 97%, denotando ser notavelmente mais pura do que padrões analíticos disponíveis no mercado e espectros registrados na literatura.
- A formação de complexos de inclusão entre 3*O*MQ e HPβCD foi confirmada por técnicas como DSC, ESI-MS e RMN, cujo conjunto de resultados demonstraram a estrutura química do complexo formado.
- O método analítico desenvolvido utilizando CLAE permitiu a quantificação da 3*O*MQ em mucosa nasal porcina, de maneira rápida e precisa, atendendo aos parâmetros estabelecidos pela ANVISA, qualificando o método para estudos de permeação e retenção em aplicações nasais.
- A preparação de formulações com pH ácido permite uma adequada dispersão dos polímeros presentes nas formulações. Considerando que o pH na cavidade nasal é naturalmente ácido, as condições de pH observadas são apropriadas para garantir a estabilidade das formulações na administração nasal.
- Os ensaios de liberação, permeação e retenção de F1 e F2 demonstram que a primeira (3*O*MQ/HPβCD em dispersão coloidal de HPMC) apresentou os melhores resultados de liberação, permeação e retenção da 3*O*MQ.

- De modo geral, os resultados biológicos in vitro demonstram que a formulação à base de HPMC (F1) melhora significativamente o desempenho antitumoral da 3*O*MQ frente às células de glioma C6, ao mesmo tempo em que reduz sua citotoxicidade em células não tumorais HaCaT. O aumento do índice de seletividade observado para a F1 indica uma maior preferência pelas células tumorais e um perfil de segurança aprimorado em comparação com o composto livre.
- Esses achados confirmam que a complexação da 3*O*MQ com HPβCD e posterior incorporação do complexo na matriz polimérica de HPMC amplia sua janela terapêutica, sustentando a F1 como uma plataforma promissora e mais segura para o desenvolvimento de tratamentos mais seletivos para tumores do sistema nervoso central.

PERSPECTIVAS

Com base nos resultados obtidos, as perspectivas deste trabalho incluem a realização de estudos mais específicos voltados para estudos de estabilidade e produção em maior escala da formulação. Apesar da necessidade desses ajustes, a formulação F1 já demonstra resultados consistentes que a respaldam como uma alternativa promissora para aplicação pela via nasal, apresentando propriedades adequadas em termos de desempenho, segurança e potencial terapêutico.

Além disso, a formulação F1 se estabelece como uma boa candidata para ser considerada em futuros estudos *in vivo*, com foco na aplicação nasal para o tratamento de doenças cerebrais, como o glioblastoma. Dessa forma, abre-se a perspectiva para que investigações subsequentes avaliem sua eficácia terapêutica, biodistribuição e segurança em modelos biológicos apropriados, contribuindo para o avanço do desenvolvimento de estratégias inovadoras para a entrega de fármacos ao sistema nervoso central.

REFERÊNCIAS

ABUAWAD, Mohammad et al. Epidemiology of primary brain tumor among adolescents and adults in Palestine: a retrospective study from 2018 to 2023. **BMC Neurology**, v. 24, n. 1, p. 1–12, 1 dez. 2024.

ALSHAWAF, Eman et al. Discovery of natural products to block SARS-CoV-2 S-protein interaction with Neuropilin-1 receptor: A molecular dynamics simulation approach. **Microbial Pathogenesis**, v. 170, p. 1–9, 1 set. 2022.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer Facts & Figures 2022. In: Atlanta: American Cancer Society, 2022.

BALAKRISHNAN, Prabagar *et al.* Carbopol-Incorporated thermoreversible gel for intranasal drug delivery. **Molecules**, v. 20, n. 3, p. 4124–4135, 1 mar. 2015.

BHARGAV, A.; SHEEBA, F. R. Beta-Cyclodextrin As An Excipient In Drug Formulation. **Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development**, v. 9, n. 4, p. 122–127, 2021.

BAQER, Safa Hussein; AL-SHAWI, Sarmad Ghazi; AL-YOUNIS, Zena Kadhim. Quercetin, the Potential Powerful Flavonoid for Human and Food: A Review. **Frontiers in bioscience (Elite edition)**, v. 16, n. 3, p. 1–17, 1 set. 2024.

BIANCHI, Sara E. *et al.* Coumestrol/hydroxypropyl-β-cyclodextrin association incorporated in hydroxypropyl methylcellulose hydrogel exhibits wound healing effect: in vitro and in vivo study. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 119, p. 179–188, 1 jul. 2018.

BIANCHI, Sara E. *et al.* Achyrocline satureioides compounds, achyrobichalcone and 3-O-methylquercetin, induce mitochondrial dysfunction and apoptosis in human breast cancer cell lines. **IUBMB Life**, v. 72, n. 10, p. 2133–2145, 1 out. 2020.

BIDONE, J. *et al.* Simultaneous quantification of flavonoids from achyrocline satureioides by a polar-reversed phase lc method -application to skin permeation/retention studies. **Pharmazie**, v. 69, n. 1, p. 5–9, jan. 2014.

BIN ABDULRAHMAN, Amro K. *et al.* Association between giant cell glioblastoma and glioblastoma multiforme in the United States: A retrospective cohort study. **Brain and Behavior**, v. 9, n. 10, p. 1–7, 1 out. 2019.

BOTAN, Maria Vitoria Gouveia; DA SILVA, Jéssica Bassi; BRUSCHI, Marcos Luciano. Development of nanostructured environmentally responsive system containing hydroxypropyl methylcellulose for nose-to-brain administration of meloxicam. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 262, n. 1, p. 1–12, 1 mar. 2024.

BRAY, Freddie *et al.* Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 74, n. 3, p. 229–263, maio 2024.

BRUINSMANN, Franciele Aline *et al.* Nasal drug delivery of anticancer drugs for the treatment of glioblastoma: Preclinical and clinical trials. **Molecules**, v. 24, n. 23, p. 1–32, 26 nov. 2019.

CALIN, Violeta L. *et al.* Grading of glioma tumors using digital holographic microscopy. **Heliyon**, v. 10, n. 9, p. 1–12, 15 maio 2024.

CARINI, Juliana Poglia; KLAMT, Fábio; BASSANI, Valquiria Linck. Flavonoids from Achyrocline satureioides: Promising biomolecules for anticancer therapy. **RSC Advances**, v. 4, n. 7, p. 3131–3144, 2014.

CHANGSAN, Narumon *et al.* Aqueous cannabidiol β-cyclodextrin complexed polymeric micelle nasal spray to attenuate in vitro and ex vivo SARS-CoV-2-induced cytokine storms. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 640, p. 1–15, 10 jun. 2023.

CHO, Hyun Jong *et al.* Poloxamer/cyclodextrin/chitosan-based thermoreversible gel for intranasal delivery of fexofenadine hydrochloride. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, n. 2, p. 681–691, 27 ago. 2011.

CHU, Kedan *et al.* Preparation of a paeonol-containing temperature-sensitive in situ gel and its preliminary efficacy on allergic rhinitis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 3, p. 6499–6515, mar. 2013.

CIMANGA, K. *et al.* Radical scavenging and xanthine oxidase inhibitory activity of phenolic compounds from Bridelia ferruginea stem bark. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 53, n. 5, p. 757–761, 1 maio 2010.

COLOMBO, Mariana *et al.* Kaempferol-loaded mucoadhesive nanoemulsion for intranasal administration reduces glioma growth in vitro. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 543, n. 1–2, p. 214–223, 30 maio 2018.

D'ARIA, Federica; PAGANO, Bruno; GIANCOLA, Concetta. Thermodynamic properties of hydroxypropyl-β-cyclodextrin/guest interaction: a survey of recent studies. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 147, n. 8, p. 4889–4897, 1 abr. 2022.

DE SOUZA, K. C. B.; SCHAPOVAL, E. E. S.; BASSANI, V. L. LC determination of flavonoids: separation of quercetin, luteolin and 3-O-methylquercetin in Achyrocline satureioides preparations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 28, n. 3–4, p. 771–777, 2002.

DEY, Sanjay *et al.* Nasal drug delivery: An approach of drug delivery through nasal route. **Der Pharmacia Sinica**, v. 2, n. 3, p. 94–106, 30 jan. 2011.

DOK-GO, Hyang *et al.* Neuroprotective effects of antioxidative flavonoids, quercetin, (+)-dihydroquercetin and quercetin 3-methyl ether, isolated from Opuntia ficus-indica var. saboten. **Brain Research**, v. 965, n. 1–2, p. 130–136, 7 mar. 2003.

DONEDA, Eduarda *et al.* 3-O-Methylquercetin from Achyrocline satureioides—cytotoxic activity against A375-derived human melanoma cell lines and its incorporation into cyclodextrins-hydrogels for topical administration. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 11, n. 5, p. 2151–2168, 1 out. 2021.

DUMORTIER, Gilles *et al.* A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. **Pharmaceutical Research**, v. 23, n. 12, p. 2709–2728, 2006.

FELDHEIM, Jonas *et al.* BRMS1 in Gliomas—An Expression Analysis. **Cancers**, v. 15, n. 11, p. 1–13, 1 jun. 2023.

GANBOLD, Munkhzul *et al.* Antifibrotic effect of methylated quercetin derivatives on TGFβ-induced hepatic stellate cells. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 20, p. 1–7, 1 dez. 2019.

GHASEMIYEH, Parisa; MOHAMMADI-SAMANI, Soliman. Hydrogels as Drug Delivery Systems; Pros and Cons. **Trends in Pharmaceutical Sciences**, v. 2019, n. 1, p. 7–24, 2019.

GHORI, Muhammad U. *et al.* Nasal Drug Delivery Systems: An Overview. **American Journal of Pharmacological Sciences**, v. 3, n. 5, p. 110–119, 2015.

GOULD, Sarah; SCOTT, Robert C. 2-Hydroxypropyl-β-cyclodextrin (HP-β-CD): A toxicology review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, n. 10, p. 1451–1459, out. 2005.

GUO, Hongliang *et al.* Exploring a novel HE image segmentation technique for glioblastoma: A hybrid slime mould and differential evolution approach. **Computers in Biology and Medicine**, v. 168, p. 1–27, 1 jan. 2024.

HANIF, Farina *et al.* Glioblastoma multiforme: A review of its epidemiology and pathogenesis through clinical presentation and treatment. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 18, n. 1, p. 3–9, 2017.

HASNAT, Hasin *et al.* Flavonoids: A treasure house of prospective pharmacological potentials. **Heliyon**, v. 10, n. 6, p. 1–28, 30 mar. 2024.

IANISKI, Francine R. *et al.* β-Cyclodextrins alter the energy metabolism-related enzyme activities in rats. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 95, n. 2, p. 1–13, 2023.

IMSUWANSRI, Thanarath *et al.* Assessment of safety and intranasal neutralizing antibodies of HPMC-based human anti-SARS-CoV-2 IgG1 nasal spray in healthy volunteers. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 1–12, 1 dez. 2023.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). **Estimativa 2023: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer (INCA), 2022.

JACOB, Shery; NAIR, Anroop B. Cyclodextrin complexes: Perspective from drug delivery and formulation. **Drug Development Research**, v. 79, n. 5, p. 201–217, 1 ago. 2018.

JADALLA, Baraa M. I. S. *et al.* In Vitro Alpha-Glucosidase and Alpha-Amylase Inhibitory Activities and Antioxidant Capacity of Helichrysum cymosum and Helichrysum pandurifolium Schrank Constituents. **Separations**, v. 9, n. 8, p. 1–16, 1 ago. 2022.

JAMBHEKAR, Sunil S.; BREEN, Philip. Cyclodextrins in pharmaceutical formulations I: Structure and physicochemical properties, formation of complexes, and types of complex. **Drug Discovery Today**, v. 21, n. 2, p. 356–362, 2016.

JENKE, Robert *et al.* Anticancer Therapy with HDAC Inhibitors: Mechanism-Based Combination Strategies and Future Perspectives. **Cancers**, v. 13, n. 4, p. 2–43, 2021.

JIANG, Jiunn Song *et al.* Mechanisms of suppression of nitric oxide production by 3-O-methylquercetin in RAW 264.7 cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, n. 2, p. 281–287, 16 jan. 2006.

JORAY, Mariana Belén; PALACIOS, Sara María; CARPINELLA, María Cecilia. Understanding the interactions between metabolites isolated from Achyrocline satureioides in relation to its antibacterial activity. **Phytomedicine**, v. 20, n. 3–4, p. 258–261, 15 fev. 2013.

KALYDI, Eszter *et al.* Solving the puzzle of 2-hydroxypropyl β-cyclodextrin: Detailed assignment of the substituent distribution by NMR spectroscopy. **Carbohydrate Polymers**, v. 338, p. 1–11, 15 ago. 2024.

KAPTEIN, Fleur H. J. *et al.* Incidence and determinants of thrombotic and bleeding complications in patients with glioblastoma. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 20, n. 7, p. 1665–1673, 1 jul. 2022.

KIM, Jae Yeon; LIM, Hyo Jin; RYU, Jae Ha. In vitro anti-inflammatory activity of 3-O-methyl-flavones isolated from Siegesbeckia glabrescens. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, n. 4, p. 1511–1514, 15 fev. 2008.

KO, W. C. *et al.* 3-O-Methylquercetin More Selectively Inhibits Phosphodiesterase Subtype 3. **Planta Medica**, v. 69, n. 4, p. 310–315, 2003.

KO, Wun Chang *et al.* Suppressive effects of 3-O-methylquercetin on ovalbumin-induced airway hyperresponsiveness. **Planta Medica**, v. 70, n. 12, p. 1123–1127, dez. 2004.

KO, Wun-Chang *et al.* Mechanisms of Relaxant Action of 3-O-Methylquercetin in Isolated Guinea Pig Trachea. **Planta medica**, v. 68, n. 1, p. 30–35, jan. 2002.

KOPARAL, Mehtap *et al.* Assessment of mucociliary clearance as an indicator of nasal function in patients with COVID-19: a cross-sectional study. **European Archives of Oto-Rhino-Laryngology**, v. 278, n. 6, p. 1863–1868, 1 jun. 2021.

KÜPELI, Esra; YESILADA, Erdem. Flavonoids with anti-inflammatory and antinociceptive activity from Cistus laurifolius L. leaves through bioassay-guided procedures. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, n. 3, p. 524–530, 25 jul. 2007.

LAFFLEUR, Flavia; BAUER, Bettina. Progress in nasal drug delivery systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 607, p. 1–17, 25 set. 2021.

LALL, Aastha *et al.* Nanoparticles and colloidal hydrogels of chitosan–caseinate polyelectrolyte complexes for drug-controlled release applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 16, p. 1–25, 2020.

LAN, Zhong; LI, Xin; ZHANG, Xiaoqin. Glioblastoma: An Update in Pathology, Molecular Mechanisms and Biomarkers. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 5, p. 1–14, 1 mar. 2024.

LAQUINTANA, Valentino *et al.* Celecoxib-hydroxypropyl-β-cyclodextrin inclusion complex in a chitosan/PEO-PPO-PEO block copolymer matrix: Structural effect and drug release. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 660, p. 1030–1038, 15 abr. 2024.

LI, Liya; HENRY, Geneive E.; SEERAM, Navindra P. Identification and bioactivities of resveratrol oligomers and flavonoids from carex folliculata Seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 16, p. 7282–7287, 2009.

LIU, Elisa K. *et al.* Racial and socioeconomic disparities differentially affect overall and cause-specific survival in glioblastoma. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 149, n. 1, p. 55–64, 1 ago. 2020.

LUCKE-WOLD, Brandon *et al.* Focus on current and emerging treatment options for glioma: A comprehensive review. **World Journal of Clinical Oncology**, v. 15, n. 4, p. 482–495, 24 abr. 2024.

LUO, Chao *et al.* A new proline-containing flavonol glycoside from Caragana leucophloea Pojark. **Natural Product Research**, v. 29, n. 19, p. 1811–1819, 2 out. 2015.

MARQUES, Cíntia *et al.* How the Lack of Chitosan Characterization Precludes Implementation of the Safe-by-Design Concept. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, p. 1–12, 10 mar. 2020.

MARTINS, Carla Silva; MORGADO, Daniella Lury; ASSI, Odilio Benedito Garrido. Cashew gum-chitosan blended films: Spectral, mechanical and surface wetting evaluations. **Macromolecular Research**, v. 24, n. 8, p. 691–697, 1 ago. 2016.

MCFALINE-FIGUEROA, J. Ricardo; WEN, Patrick Y. The Viral Connection to Glioblastoma. **Current Infectious Disease Reports**, v. 19, n. 5, p. 1–5, 1 fev. 2017.

MICHELS, Luana Roberta *et al.* Nasal administration of a temozolomide-loaded thermoresponsive nanoemulsion reduces tumor growth in a preclinical glioblastoma model. **Journal of Controlled Release**, v. 355, p. 343–357, 1 mar. 2023.

MIRANDA, Pablo *et al.* Novel Thermosensitive and Mucoadhesive Nasal Hydrogel Containing 5-MeO-DMT Optimized Using Box-Behnken. **Polymers**, v. 16, n. 2148, p. 1–14, 2024.

MOHAMMADI, Esmaeil *et al.* A global, regional, and national survey on burden and Quality of Care Index (QCI) of brain and other central nervous system cancers; global burden of disease systematic analysis 1990-2017. **PLoS ONE**, v. 16, n. 2, p. 1–13, 1 fev. 2021.

MOHAMMED, Hamdoon A. *et al.* Comparative Anticancer Potentials of Taxifolin and Quercetin Methylated Derivatives against HCT-116 Cell Lines: Effects of O-

Methylation on Taxifolin and Quercetin as Preliminary Natural Leads. **ACS Omega**, v. 7, n. 50, p. 46629–46639, 20 dez. 2022.

MORALES, Glauco *et al.* Constituents of Helenium atacamense Cabr. **Journal of the Chilean Chemical Society**, v. 51, n. 1, p. 769–772, 2006.

MOREIRA, A. S. *et al.* Antiinflammatory activity of extracts and fractions from the leaves of Gochnatia polymorpha. **Phytotherapy Research**, v. 14, n. 8, p. 638–640, 2000.

MURA, Paola *et al.* In situ mucoadhesive-thermosensitive liposomal gel as a novel vehicle for nasal extended delivery of opiorphin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 122, p. 54–61, 1 jan. 2018.

PANCHE, A. N.; DIWAN, A. D.; CHANDRA, S. R. Flavonoids: An overview. **Journal of Nutritional Science**, v. 5, n. e47, p. 1–15, 8 jan. 2016.

PATHAN, Inayat Bashir; MORE, Baban. Formulation and characterization of intra nasal delivery of nortriptyline hydrochloride thermoreversible gelling system in treatment of depression. **Acta Pharmaceutica Sciencia**, v. 55, n. 2, p. 35–44, 2017.

PITTOL, Vanessa *et al.* The challenge of flavonoid/cyclodextrin complexation in a complex matrix of the quercetin, luteolin, and 3-O-methylquercetin. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 27, n. 6, p. 625–634, 2022.

PRABAHARAN, Mani; MANO, João F. Hydroxypropyl chitosan bearing β-cyclodextrin cavities: Synthesis and slow release of its inclusion complex with a model hydrophobic drug. **Macromolecular Bioscience**, v. 5, n. 10, p. 965–973, 20 out. 2005.

PREGO, C. *et al.* Transmucosal macromolecular drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 101, n. 1- 3 SPEC. ISS., p. 151–162, 3 jan. 2005.

ROMANI, Massimo; PISTILLO, Maria Pia; BANELLI, Barbara. Epigenetic targeting of glioblastoma. **Frontiers in Oncology**, v. 8, n. 10, p. 1–9, 16 out. 2018.

ROWE, Raymond C.; SHESKEY, Paul J.; OWEN, Siân C. **Handbook of Pharmaceutical Excipients.** 5th Edition ed. London: Pharmaceutical Press, 2006.

RUBIO, Sara *et al.* Phenylbenzopyrones structure-activity studies identify betuletol derivatives as potential antitumoral agents. **European Journal of Pharmacology**, v. 548, n. 1–3, p. 9–20, 24 out. 2006.

SADHU, Samir Kumar *et al.* Prostaglandin inhibitory and antioxidant components of Cistus laurifolius, a Turkish medicinal plant. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 108, n. 3, p. 371–378, 6 dez. 2006.

SAFE, Stephen *et al.* Flavonoids: structure–function and mechanisms of action and opportunities for drug development. **Toxicological Research**, v. 37, n. 2, p. 147–162, 1 abr. 2021.

SAHOO, Om S.; MITRA, Rhiti; NAGAIAH, Naveen K. H. The hidden architects of glioblastoma multiforme: Glioma stem cells. **MedComm – Oncology**, v. 3, n. e66, p. 1–27, mar. 2024.

SAITANI, Elmina Marina *et al.* Fabricating Polymer/Surfactant/Cyclodextrin Hybrid Particles for Possible Nose-to-Brain Delivery of Ropinirole Hydrochloride: In Vitro and Ex Vivo Evaluation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 2, p. 1–32, 1 jan. 2024.

SAKUMA, Fumie *et al.* Effect of Acetaminophen on Poloxamer 407 Micelles and Hydrogels: The Relationship between Structural and Physical Properties. **Langmuir**, v. 40, p. 15610–15620, 2024.

SCHWINGEL, Liege *et al.* Association of 3-O-methylquercetin with β-cyclodextrin: Complex preparation, characterization and ex vivo skin permeation studies. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 62, n. 1–2, p. 149–159, out. 2008.

SCHWINGEL, Liege C. *et al.* 3-O-Methylquercetin from organic Nicotiana tabacum L. trichomes: Influence of the variety, cultivation and extraction parameters. **Industrial Crops and Products**, v. 55, p. 56–62, abr. 2014.

SCHWINGEL, Liege C. *et al.* Quercetin and 3-O-methylquercetin in vitro skin layers permeation/retention from hydrogels: why only a methoxy group difference determines different behaviors? **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 71, n. 5, p. 733–745, 1 maio 2019.

SHAIKH, Rahamatullah *et al.* Mucoadhesive drug delivery systems. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v. 3, n. 1, p. 89–100, jan. 2011.

SHARIFIAN, Mohammad Jalil *et al.* Incidence trends of adult glioma in Norway and its association with occupation and education: A registry-based cohort study. **Cancer Epidemiology**, v. 89, p. 1–7, 1 abr. 2024.

SHARMA, Hari Shanker *et al.* Pathophysiology of blood-brain barrier in brain tumor. Novel therapeutic advances using nanomedicine. **International Review of Neurobiology**, v. 151, p. 1–66, 1 jan. 2020.

SHI, Weiyan *et al.* A multivariate retrospective analysis of high-grade gliomas: Survival and prognostic factors. **Cancer Medicine**, v. 13, n. 15, p. 1–13, 1 ago. 2024.

SIEGEL, Rebecca L. *et al.* Cancer Statistics, 2021. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 1, p. 7–33, jan. 2021.

SILVA, Marianna C. *et al.* Structural and Anticancer Studies of Methoxyflavone Derivative from Strychnos pseudoquina A.St.-Hil. (Loganiaceae) from Brazilian Cerrado. **ACS Omega**, v. 8, n. 43, p. 40764–40774, 31 out. 2023.

SINGLA, Rajeev K. *et al.* Natural polyphenols: Chemical classification, definition of classes, subcategories, and structures. **Journal of AOAC International**, v. 102, n. 5, p. 1397–1400, 2019.

SOUZA, Priscila Oliveira de *et al.* Anticancer activity of flavonoids isolated from Achyrocline satureioides in gliomas cell lines. **Toxicology in Vitro**, v. 51, p. 23–33, 1 set. 2018.

SPENCER, Drew *et al.* Pharmacologic modulation of nasal epithelium augments neural stem cell targeting of glioblastoma. **Theranostics**, v. 9, n. 7, p. 2071–2083, 2019.

SZALAI, Boglárka *et al.* The effect of mucoadhesive polymers on ocular permeation of thermoresponsive in situ gel containing dexamethasone–cyclodextrin complex. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 667, p. 1–13, 25 dez. 2024.

TALIB, Wamidh H.; ABU ZARGA, Musa H.; MAHASNEH, Adel M. Antiproliferative, antimicrobial and apoptosis inducing effects of compounds isolated from Inula viscosa. **Molecules**, v. 17, n. 3, p. 3291–3303, mar. 2012.

TATAVARTI, Aditya S.; HOAG, Stephen W. Microenvironmental pH modulation based release enhancement of a weakly basic drug from hydrophilic matrices. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 95, n. 7, p. 1459–1468, 2006.

THUY LE, Huong *et al.* A New Carvotacetone Derivative from the Aerial Part of Sphaeranthus africanus. **Chemistry and Biodiversity**, v. 20, n. 6, p. 1–10, 1 jun. 2023.

TODKAR, Shraddha *et al.* Cyclodextrin in novel formulations and solubility enhancement techniques: a review. **International Journal of Current Pharmaceutical Research**, v. 16, n. 2, p. 9–18, 15 mar. 2024.

TRIVEDI, Sagar; BELGAMWAR, Veena. Fabrication and optimization of chitosan-g-m-PEG-NH2 copolymer for advanced glioblastoma therapy using surface engineered lentinan loaded nanovesicles for nasal delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 273, p. 1–17, 1 jul. 2024.

TSUCHIYA, Ayaka *et al.* Development of flavonoid probes and the binding mode of the target protein and quercetin derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 68, p. 1–10, 15 ago. 2022.

TURATBEKOVA, Aidai *et al.* A brief overview on the methods for extraction and identification of flavonoids. **E3S Web of Conferences**, v. 434, p. 1–8, 12 out. 2023.

ULLAH, Asad *et al.* Important flavonoids and their role as a therapeutic agent. **Molecules**, v. 25, n. 22, p. 1–39, 1 nov. 2020.

ULUSOY, S. *et al.* Mechanisms and solutions for nasal drug delivery – a narrative review. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 26, n. 2, p. 72–81, 2022.

USTÜN, Osman *et al.* Flavonoids with anti-Helicobacter pylori activity from Cistus laurifolius leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 108, n. 3, p. 457–461, 6 dez. 2006.

VEIGA, Viviane Cordeiro *et al.* Incidence of venous thromboembolism and bleeding in patients with malignant central nervous system neoplasm: Systematic review and meta-analysis. **PLoS ONE**, v. 19, n. 6, p. 1–22, 1 jun. 2024.

VIKAS, Yadav *et al.* Cyclodextrin Complexes: An Approach to Improve the Physicochemical Properties of Drugs and Applications of Cyclodextrin Complexes. **Asian Journal of Pharmaceutics**, v. 12, n. 2, p. S394–S409, 2018.

VLAD, Robert Alexandru *et al.* Hydroxypropyl Methylcellulose—A Key Excipient in Pharmaceutical Drug Delivery Systems. **Pharmaceutics**, v. 17, n. 6, p. 784, 1 jun. 2025.

VOLLMANNOVÁ, Alena *et al.* Quercetin as one of the most abundant represented biological valuable plant components with remarkable chemoprotective effects - A review. **Heliyon**, v. 10, n. 12, p. 1–11, 30 jun. 2024.

VRIJSEN, R. *et al.* The poliovirus-induced shut-off of cellular protein synthesis persists in the presence of 3-methylquercetin, a flavonoid which blocks viral protein and RNA synthesis. **Antiviral Research**, v. 7, p. 35–42, 1987.

WAN, Chuan-Xing *et al.* 3-O-Methylquercetin Glucosides from Ophioglossum pedunculosum and Inhibition of Lipopolysaccharide-Induced Nitric Oxide Production in RAW 264.7 Macrophages. **Helvetica Chimica Acta**, v. 95, n. 9, p. 1586–1592, 2012.

WANG, Yichen *et al.* Host-defence caerin 1.1 and 1.9 peptides suppress glioblastoma U87 and U118 cell proliferation through the modulation of mitochondrial respiration and induce the downregulation of CHI3L1. **PLoS ONE**, v. 19, n. 6, p. 1–25, 1 jun. 2024.

WEN, Jiayi *et al.* Microenvironmental regulation of tumor-associated neutrophils in malignant glioma: from mechanism to therapy. **Journal of Neuroinflammation** , v. 21, n. 226, p. 1–19, 1 dez. 2024.

WILLIAMS III, Robert O.; MAHAGUNA, Vorapann; SRIWONGJANYA, Mongkol. Characterization of an inclusion complex of cholesterol and hydroxypropyl-β-cyclodextrin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 46, n. 3, p. 355–360, 1998.

XIE, Yuan Hong; CHEN, Ying Xuan; FANG, Jing Yuan. Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 5, n. 1, p. 1–30, 1 dez. 2020.

XU, Yang *et al.* Synthesis and potential applications of cyclodextrin-based metal–organic frameworks: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 21, n. 1, p. 447–477, 1 fev. 2023.

XU, Kuo *et al.* Clinical development and informatics analysis of natural and semi-synthetic flavonoid drugs: A critical review. **Journal of Advanced Research**, v. 63, p. 269–284, 1 set. 2024.

YAMAUCHI, Kosei *et al.* Structure-activity relationships of methylquercetin on anti-migration and anti-proliferation activity in B16 melanoma cells. **Anticancer Research**, v. 37, n. 4, p. 1575–1579, 1 abr. 2017.

YATSU, Francini K. J. *et al.* Multiple complexation of cyclodextrin with soy isoflavones present in an enriched fraction. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, n. 1, p. 726–735, 2013.

ZHANG, Qiang *et al.* Identification of Six Flavonoids as Novel Cellular Antioxidants and Their Structure-Activity Relationship. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2020, p. 1–12, 2020.

ZHANG, Xue Qiong *et al.* In vitro antioxidant and in vivo anti-inflammatory activities of Ophioglossum thermale. **American Journal of Chinese Medicine**, v. 40, n. 2, p. 279–293, 2012.