

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

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA NANOESTRUTURADO CONTENDO
OS FÁRMACOS PIRAZINAMIDA E RIFAMPICINA PARA O
TRATAMENTO DA TUBERCULOSE PEDIÁTRICA**

MORGANA SOUZA MARQUES

Porto Alegre, 2022

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

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA NANOESTRUTURADO CONTENDO
OS FÁRMACOS PIRAZINAMIDA E RIFAMPICINA PARA O
TRATAMENTO DA TUBERCULOSE PEDIÁTRICA**

Tese apresentada por **Morgana Souza
Marques** para a obtenção do título de
doutor em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Irene Cledes Kulkamp Guerreiro

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Fernanda Poletto

Porto Alegre, 2022

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 25 de julho de 2022 pela Banca Examinadora constituída por:

Profª Drª Rosane Soares

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof Dr Ruy Carlos Ruver Beck

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profª Drª Tanira Alessandra Silveira Aguirre

Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

CIP - Catalogação na Publicação

Souza Marques, Morgana
Desenvolvimento de sistema nanoestruturado
contendoos fármacos pirazinamida e rifampicina para o
tratamento da tuberculose pediátrica / Morgana Souza
Marques. -- 2022.
148 f.
Orientadora: Irene Clemes Kulkamp Guerreiro.

Coorientadora: Fernanda Poletto.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre,
BR-RS, 2022.

1. Nanotecnologia. 2. pirazinamida. 3. rifampicina.
4. tuberculose. 5. pediatria. I. Clemes Kulkamp
Guerreiro, Irene, orient. II. Poletto, Fernanda,
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 Tecnologia Farmacêutica e Cosmética Aplicada do Departamento de Produção de Matéria-Prima da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A autora recebeu bolsa de estudos do CNPq.

Aos meus pais pelo apoio incondicional neste
e em todos os momentos de minha vida

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

Ao meu companheiro Ricardo Ávila Souza que pacientemente esteve ao meu lado no decorrer desse projeto e que me deu o maior amor da minha vida.

Agradeço aos meus pais, Regina Souza Marques e Adenicio João Marques, por estarem sempre presentes contribuindo com amor, carinho, apoio e confiança.

Á minha orientadora Prof.^a Dr.^a Irene Clemes Kulkamp Guerreiro pela orientação, dedicação, apoio e confiança em mim depositadas. Suas palavras de motivação nos momentos mais difíceis me fizeram querer seguir em frente. Agradeço também minha coorientadora, Prof.^a Dr.^a Fernanda Poletto, pelos preciosos ensinamentos.

Aos meus colegas do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica e Cosmética aplicada pelo incentivo e motivação durante essa jornada. Em especial à Francielli Lima, Helissara Diefenthaeler, Marina Delanni Vitória Guedes, Renata Vidor Contri, Samuel Davies, e Simone Jacobus Berlitz pelos ensinamentos oportunos e conversas leves.

Á Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Universidade FEEVALE, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Parque Científico e Tecnológico da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (TECNOPUC), Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI) pela estrutura, apoio financeiro e fornecimento de equipamentos úteis para o desenvolvimento desse trabalho.

Obrigada!

RESUMO

A tuberculose é uma doença crônica altamente infecciosa causada pela inalação do bacilo *Mycobacterium tuberculosis*. O tratamento da tuberculose consiste na associação de medicamentos tuberculostáticos a fim de prevenir o surgimento de resistência bacteriana. Embora exista uma padronização para o tratamento da tuberculose, poucos medicamentos pediátricos estão disponíveis comercialmente. Novas estratégias têm sido propostas para o desenvolvimento de medicamentos pediátricos, sendo bastante atrativo o emprego da nanotecnologia para a veiculação de fármacos devido às propriedades de mascaramento de sabor e aumento da biodisponibilidade de fármacos, diminuição dos efeitos colaterais e redução de doses. Esta tese de doutorado teve como objetivo inicial buscar relatos na literatura sobre os tipos de nanoestruturas descritas para o tratamento de doenças pediátricas. Objetivou-se ainda desenvolver um método de espectrofotometria de derivadas para a quantificação simultânea dos fármacos tuberculostáticos pirazinamida e rifampicina. Ainda, incorporar os fármacos pirazinamida e rifampicina em uma nanoestrutura e avaliar o efeito tuberculostático da formulação contra *Mycobacterium tuberculosis*. Através de uma revisão de literatura realizada até setembro de 2021, foi possível observar que entre os 51 artigos selecionados as principais motivações para o uso da nanotecnologia no desenvolvimento de formulações pediátricas foram: aumento da eficácia terapêutica, melhora do sabor do medicamento e terapia direcionada. A classe terapêutica mais encontrada foi anticancerígena, seguida de antivirais. Nanopartículas poliméricas, nanocarreadores à base de lipídios e micelas poliméricas foram as nanoestruturas mais citadas nesses estudos. Um método espectrofotométrico de primeira derivada foi desenvolvido e validado para a determinação simultânea de pirazinamida e rifampicina em formulação nanotecnológica. Além disso, obteve-se um nanoveículo contendo fármacos tuberculostáticos originando uma formulação líquida isenta de etanol, propilenoglicol, adoçantes ou aromatizantes. A formulação apresentou características nanotecnológicas com resultados de pH, potencial zeta e teor de fármacos adequados para sua potencial aplicação pretendida. O resultado do ensaio de inibição de *Mycobacterium tuberculosis* mostrou que o nanossistema contendo pirazinamida e rifampicina foi eficaz contra a

cepa H37Rv *Mycobacterium tuberculosis*. O conjunto de resultados obtidos no decorrer deste trabalho de tese aponta que o nanossistema proposto é bastante promissor para o tratamento da tuberculose na faixa etária pediátrica.

Palavras-chave: Pirazinamida; Rifampicina; Tuberculose; Pediatria.

ABSTRACT

Tuberculosis is a highly infectious chronic disease caused by inhaling the bacillus *Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis treatment consists of the association of tuberculostatic drugs in order to prevent the emergence of bacterial resistance. Although there is a standard for the treatment of tuberculosis, few paediatric drugs are commercially available. New strategies have been proposed for the development of paediatric drugs and the use of nanotechnology for the delivery of drugs is attractive due to the taste masking properties of drugs, improvement of drug bioavailability, reduction of side effects and dose reduction. The initial objective of this doctoral thesis was to search for reports in the literature on the types of nanostructures described for the treatment of paediatric diseases. The aim was also to develop a derivative spectrophotometry method for the simultaneous quantification of the tuberculostatic drugs pyrazinamide and rifampicin. Also, incorporate the drugs pyrazinamide and rifampicin in a nanovehicle and evaluate the tuberculostatic effect of the formulation against *Mycobacterium tuberculosis*. Through a literature review carried out until September 2021, it was possible to observe that among the 51 articles selected the main motivations for the use of nanotechnology in the development of paediatric formulations were: increased therapeutic efficacy, improved drug taste and targeted therapy. The most common therapeutic class was anticancer, followed by antivirals. Polymeric nanoparticles, lipid-based nanocarriers and polymeric micelles were the most cited nanostructures in these studies. First derivative spectrometric method was developed and validated for the simultaneous determination of pyrazinamide and rifampicin in nanotechnology formulation. Nanovehicle containing tuberculostatic drugs was synthesized resulting in a liquid formulation free of ethanol, propylene glycol, sweeteners or flavors. The formulation presented nanotechnological characteristics with satisfactory pH, zeta potential and drug content results. The result of the *Mycobacterium tuberculosis* inhibition assay showed that the nanosystem containing pyrazinamide and rifampicin was effective against the H37Rv *Mycobacterium tuberculosis* strain. This nanosystem could be a reasonable strategy to obtain a promising paediatric drug for tuberculosis therapy.

Keywords: Pyrazinamide; Rifampicin; Tuberculosis; Paediatrics.

SUMÁRIO

<i>INTRODUÇÃO</i>	17
<i>OBJETIVOS</i>	21
<i>REVISÃO DA LITERATURA</i>	25
<i>CAPÍTULO 1</i>	35
<i>CAPÍTULO 2</i>	89
<i>CAPÍTULO 3</i>	107
<i>CONCLUSÕES GERAIS</i>	138
<i>PERSPECTIVAS</i>	141
<i>REFERÊNCIAS</i>	143

A tuberculose, doença infectocontagiosa causada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, representa um grande desafio à saúde pública em virtude dos seus elevados números de incidência. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que em 2019 houve aproximadamente 10 milhões de casos de tuberculose em todo mundo (WHO, 2020). Já no Brasil, segundo o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), em 2020 foram registrados 83.678 casos de tuberculose, dos quais 2.137 ocorreram em menores de 14 anos de idade (DATASUS, 2021).

Segundo o Ministério da Saúde, recém-nascidos expostos a tuberculose necessitam de tratamento profilático com o uso de isoniazida (INH) (10 mg/kg/dia) por 3 meses podendo ser prorrogado para mais 3 meses (BRASIL, 2011). Crianças menores de 10 anos de idade com diagnóstico positivo para tuberculose devem iniciar tratamento através da administração de pirazinamida (PYZ), rifampicina (RIF) e INH nos primeiros 2 meses, seguido da administração de RIF e INH por mais 4 meses (BRASIL, 2011).

Apesar do tratamento da tuberculose infantil ser prioridade no programa de doenças negligenciadas no Brasil (BRASIL, 2010), alguns agravantes acerca da doença devem ser levados em consideração como: o alto risco do desenvolvimento da doença quando a infecção primária ocorre particularmente entre 0 e 4 anos de idade (WHO, 2014), a baixa adesão ao tratamento farmacológico devido ao longo período de tratamento, a grande carga diária de comprimidos (TANEJA *et al.*, 2015) e a escassez de formulações pediátricas.

As formulações destinadas a pacientes pediátricos devem ser desenvolvidas de forma que apresentem um sensorial adequado. O sabor é o parâmetro mais determinante na adesão à terapia medicamentosa, porém características como textura, consistência e cor também são relevantes. Outro fator que deve ser levado em consideração no preparo de formulações pediátricas é a facilidade no ajuste de dose. As preparações líquidas orais (tais como soluções, suspensões ou emulsões) possuem a vantagem de poder ser administradas em volumes (doses) variados com ajustes sendo realizados de acordo com a fase do tratamento, faixa etária e peso da criança (IVANOVSKA *et al.*, 2014; LOPEZ *et al.*, 2015).

Partindo-se do pressuposto de que a via de administração oral é a via mais adequada para pacientes pediátricos (CHANDRASEKARAN *et al.*, 2018), o

desenvolvimento de uma formulação pediátrica líquida de uso oral pode ser uma estratégia vantajosa para auxiliar na adesão ao tratamento da tuberculose infantil. Nesse sentido, vem sendo cada vez mais recorrente o interesse na literatura pelo desenvolvimento de formulações líquidas contendo fármacos incorporados em sistemas de liberação nanoestruturados. Estudos publicados utilizaram diferentes nanopartículas para a incorporação de fármacos tuberculostáticos, isolados ou em associação, como por exemplo: nanoemulsões (AHMED *et al.*, 2008), nanopartículas poliméricas (HORVÁTI *et al.*, 2014; PANDEY; KHULLER, 2004), nanopartículas lipídicas sólidas (PANDEY; SHARMA; KHULLER, 2005), nanocristais (MELO *et al.*, 2020), lipossomas (NIU *et al.*, 2020) e cubossomas (OLA; BELGAMWAR, 2017; TRAN *et al.*, 2018).

Nos últimos anos, os cubossomas vêm sendo utilizados como nanocarreadores devido a vantagens em relação a outros sistemas nanoparticulados lipídicos (HARTNETT; O'CONNOR; LADEWIG, 2015; MO; MILLERET; NAGARAJ, 2017). Cubossomas são dispersões nanométricas de fases cúbicas bicontínuas reversas constituídas de lipídio polar e água e geralmente estabilizadas por um composto anfifílico que impede sua aglomeração. Nessas fases cúbicas bicontínuas reversas, os lipídios polares estruturam-se em bicamadas retorcidas, com curvatura negativa, que conseqüentemente originam dois canais aquosos não-interconectados em seu interior. Sua elevada área de superfície permite altas taxas de incorporação de fármacos hidrofóbicos e anfifílicos, que permanecem intercalados em suas bicamadas. Fármacos hidrofílicos podem ser incorporados a partir da interação com o estabilizante. Uma característica adicional desses sistemas, que merece menção, é sua excelente bioadesividade. Além disso, dependendo da natureza química do lipídio e do estabilizante, é possível obter um sistema com certo grau de resistência ao ambiente gástrico, o que é relevante do ponto de vista da aplicação pela via oral.

Ainda que pesquisas tenham sido publicadas acerca da incorporação de PYZ (OLA; BELGAMWAR, 2017) ou RIF (TRAN *et al.*, 2018) em cubossomas, não existem estudos relatando o desenvolvimento de cubossomas contendo associação de fármacos tuberculostáticos, o que poderia levar em última instância a um maior controle da sua farmacocinética. Nessa perspectiva, desenvolver uma formulação pediátrica líquida com

características nanotecnológicas contendo PYZ e RIF para o tratamento da tuberculose é uma estratégia promissora.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

O objetivo geral desta tese consistiu em desenvolver e caracterizar uma formulação pediátrica líquida de uso oral composta de um sistema nanoestruturado contendo os fármacos PYZ e RIF, visando potencial tratamento da tuberculose pediátrica.

Para isto, foram propostos os objetivos específicos elencados a seguir, ordenados em capítulos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

CAPÍTULO 1

- Revisar, na literatura científica, os seguintes aspectos:
 - a finalidade do uso da nanotecnologia em formulações pediátricas;
 - os fármacos/classes terapêuticas incorporados em nanoestruturas para a administração pediátrica;
 - as nanoestruturas utilizadas visando ao desenvolvimento de medicamentos pediátricos;
 - como a toxicidade foi avaliada nesses estudos;
 - verificar a existência de estudos que tenham originado ou testado formulações nanotecnológicas patenteadas.

CAPÍTULO 2

- Desenvolver uma metodologia analítica por espectroscopia UV-Vis para a quantificação simultânea dos fármacos PYZ e RIF;
- Validar a metodologia analítica para a quantificação simultânea dos fármacos PYZ e RIF em formulação nanotecnológica através de método espectrofotométrico.

CAPÍTULO 3

- Desenvolver um sistema nanoestruturado (do tipo cubossoma) para a veiculação dos fármacos PYZ e RIF empregando-se o método de ultrassonicação;

- Caracterizar fisicoquimicamente o sistema nanoestruturado contendo os fármacos PYZ e RIF através de Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS do inglês: *Dynamic light scattering*), determinação do Potencial Zeta e pH.
- Determinar o teor de PYZ e RIF contido no sistema nanoestruturado;
- Determinar a eficiência de incorporação dos fármacos PYZ e RIF no sistema nanoestruturado por ultrafiltração-centrifugação;
- Inferir as características sensoriais do sistema nanoestruturado contendo PYZ e RIF através da língua eletrônica.
- Determinar a concentração inibitória mínima (MIC do inglês: *Minimum Inhibitory Concentration*) do sistema nanoestruturado contendo PYZ e RIF frente ao microrganismo *Mycobacterium tuberculosis*.

A tuberculose é uma doença crônica altamente infecciosa causada pela inalação de gotículas contendo bacilos *Mycobacterium tuberculosis* (KAUFMANN, 2001). Dentre as características mais marcantes da doença, destaca-se a habilidade do bacilo de permanecer por um longo período de latência entre a infecção primária e a apresentação clínica da doença, inclusive em pessoas imunocompetentes (GROTZ *et al.*, 2018). Além disso, apresenta preferência pelos pulmões, mas não permanece exclusivamente neste órgão. É possível ocorrerem casos de contaminação em outros órgãos como ossos, rins e meninges (KATIYAR; KATIYAR, 2019). Indivíduos com a forma pulmonar da doença são considerados a principal fonte de infecção, podendo contaminar até 15 outras pessoas em um período de um ano (KAUFMANN, 2000).

Segundo dados da OMS, em nível global, a tuberculose é uma das 10 principais causas de morte com um total de 1,4 milhão de óbitos em 2019 (WHO, 2020). Nesse mesmo ano, 1,2 milhão de crianças adoeceram com tuberculose (WHO, 2020). Já no cenário nacional, segundo o SINAN, em 2020 foram registrados no Brasil 83.678 casos de tuberculose, dos quais 2.137 ocorreram em menores de 14 anos de idade (DATASUS, 2021).

Embora haja uma previsão de redução de até 80% da incidência da doença para o ano de 2030 (WHO, 2019), nota-se ainda um elevado número de casos, inclusive quando associados ao HIV (MOORE *et al.*, 2015). Nessa circunstância, o risco de desenvolver tuberculose chega a ser cerca de 19 vezes maior do que quando comparado ao resto da população mundial (WHO, 2019).

Outro agravante acerca da tuberculose está relacionado ao contágio precoce. Crianças entre 0 e 4 anos de idade têm alto risco de progressão rápida da doença e podem desenvolver as formas graves desta doença (KHATAMI; BRITTON; MARAIS, 2019; WHO, 2014). Ainda, em casos de tuberculose infantil, os sintomas característicos da doença (como tosse por mais de 2 semanas) são menos perceptíveis, apresentando sinais e sintomas não-específicos, a exemplo de febre, perda de peso e fadiga (KHATAMI; BRITTON; MARAIS, 2019). Nesse cenário, a tuberculose infantil é frequentemente negligenciada em consequência da dificuldade de diagnóstico e, principalmente, de tratamento. Ainda, existem os desafios relacionados à adesão à terapia medicamentosa

devido ao tratamento prolongado, com grande carga diária de comprimidos, bem como à escassez de formulações pediátricas (TANEJA *et al.*, 2015).

Os fármacos utilizados para tratar a tuberculose são classificados em primeira e segunda linha. A primeira linha é composta pelos fármacos: PYZ, RIF, INH e etambutol (EMB). Já a segunda linha é composta por: ácido aminosalicílico, tioamidas, etionamida, protionamida, rifabutina, rifapentina, cicloserina, capreomicina e várias fluoroquinolonas (ZUMLA *et al.*, 2015). A segunda linha é escolhida quando há a necessidade de se tratar tuberculose resistente a múltiplos fármacos (MDR; do inglês: *multidrug-resistant*) e extensivamente resistente a fármacos (XDR; do inglês: *extensively drug-resistant*) (ZUMLA *et al.*, 2015).

De maneira geral, o esquema terapêutico para o tratamento da tuberculose consiste na associação dos fármacos de primeira linha com a finalidade de evitar o surgimento de linhagens de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes. O regime terapêutico é dividido em fase intensiva e fase de manutenção (BRASIL, 2011). A fase intensiva é a primeira fase do tratamento e é responsável por reduzir o número de bacilos o mais rapidamente possível a fim de diminuir os sintomas. Outro objetivo dessa fase é interromper a transmissão da doença e erradicar populações de bacilos dos quais possa surgir a resistência medicamentosa. Já na segunda fase, é realizada a eliminação de todos os bacilos da lesão e assim impedindo-se a recidiva após o tratamento, uma vez que o bacilo apresenta a característica de permanecer em estado de latência (KATIYAR; KATIYAR, 2019).

Segundo o Ministério da Saúde, neonatos expostos a tuberculose necessitam de tratamento profilático com o uso de INH por 3 meses, podendo ser prorrogado para mais 3 meses (BRASIL, 2011). Crianças menores de 10 anos de idade com diagnóstico positivo para tuberculose devem iniciar o tratamento composto pela associação dos medicamentos PYZ, RIF e INH nos primeiros 2 meses (fase intensiva), seguido da administração de RIF e INH por mais 4 meses (fase de manutenção) (BRASIL, 2011). Na Tabela 1 constam as principais informações referentes aos fármacos de primeira linha utilizados no tratamento da tuberculose infantil.

Tabela 1. Principais características dos medicamentos de primeira linha usados no tratamento da tuberculose infantil.

Fármaco	Dose recomendada (mg/kg/dia)	Efeitos adversos	Notas adicionais
PYZ	30 a 40 (max 2000 mg)	Artrite/artralgia, hepatite e erupção cutânea	Causa mais comum de hepatotoxicidade
RIF	10 a 20 (max 900 mg)	Hepatite, coloração alaranjada das secreções, erupção cutânea	Interações medicamentosas múltiplas
INH	5 a 10 para neonatos 7 a 15 (max 600 mg)	Hepatite, neuropatia periférica e erupção cutânea	-

Fonte: (BRASIL, 2011; KHATAMI; BRITTON; MARAIS, 2019).

O aparecimento de efeitos adversos, conforme listados na Tabela 1, assim como o longo período de tratamento podem fazer com que este seja interrompido, tornando-se irregular ou até mesmo abandonado, contribuindo para o surgimento de cepas resistentes (KHATAMI; BRITTON; MARAIS, 2019). Nesse sentido, programas governamentais têm sido implementados, em todos os níveis de assistência, com a finalidade de orientar o paciente e seus familiares quanto à importância de aderir ao tratamento. Dentre os programas implementados, cita-se a estratégia DOTS (do inglês: *Directly Observed Treatment Short-Course*), na qual o profissional da saúde observa, diariamente, a administração da medicação ao paciente diagnosticado com tuberculose (BRASIL, 2011).

Ademais, outros fatores também devem ser levados em consideração ao iniciar-se o tratamento da tuberculose. Embora haja uma padronização para o tratamento da tuberculose infantil (WHO, 2014), a escassez de uma formulação pediátrica contendo a associação de medicamentos tuberculostáticos contribui para uma ineficiência do tratamento dessa comorbidade. A Tabela 2 mostra as apresentações padronizadas pela OMS para o tratamento da tuberculose.

Tabela 2. Fármacos tuberculostáticos de primeira linha usados no tratamento da tuberculose infantil.

Fármaco	Composição	Apresentações
PYZ	500 mg	Comprimido
	30 mg/mL	Suspensão oral
RIF	150 mg	Cápsula
	300 mg	Cápsula
INH	20 mg/mL	Suspensão oral
	100 mg	Comprimido
RIF + INH	150 mg + 75 mg	Comprimido
RIF + INH + PYZ + EMB	150 mg + 75 mg + 400 mg + 275 mg	Comprimido

Fonte: (BRASIL, 2017).

Dentre os medicamentos atualmente preconizados para o tratamento da tuberculose infantil (BRASIL, 2017), os fármacos PYZ e RIF estão disponíveis na apresentação líquida (suspensão oral). Já as combinações de comprimidos em doses fixas, embora facilitem o tratamento de adultos, diminuindo a quantidade diária de comprimidos, são de difícil administração em crianças por se tratar de pacientes com dificuldades na deglutição de formas farmacêuticas sólidas (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2013).

Sabendo da importância de existir um tratamento adequado para o público infantil, o Ministério da Saúde anunciou que no ano de 2020 um novo tratamento para crianças com tuberculose estaria disponível para a população. O novo tratamento é composto por duas apresentações de dose fixas de comprimidos dispersíveis. A apresentação RIF + INH + PYZ (75 mg + 50 mg + 150 mg) deve ser administrada nos primeiros dois meses da doença (fase intensiva) e a apresentação RIF + INH (75 mg + 50 mg), nos quatro meses seguintes (fase de manutenção) (BRASIL, 2020).

O esforço do Ministério da Saúde em disponibilizar um tratamento adequado para o público pediátrico exemplifica a importância de estudos focados para o desenvolvimento de formulações pediátricas. Entretanto, por se tratar de um tratamento

composto de comprimidos dispersíveis, alguns fatores devem ser levados em consideração. Conforme orientação do Ministério da Saúde, o ajuste de dose deve ser realizado com base no peso da criança. Contudo, a nova apresentação só é recomendada para crianças com peso inferior a 25 kg (BRASIL, 2020). Ainda, a necessidade de dissolver os comprimidos em um volume de água potável, variando de 10 a 50 mL (sendo recomendada 30 mL), é uma desvantagem considerável devido ao grande volume que deve ser administrado. Essa desvantagem torna-se ainda mais relevante haja vista que os comprimidos dispersíveis contém o edulcorante aspartame e aromatizantes de morango ou amora. Esses insumos, quando presentes em formulações pediátricas, estão associados à promoção de cáries e alergias (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2006).

A precariedade de formulações pediátricas é um problema mundial que há alguns anos começou a ser enfrentado pelas autoridades sanitárias dos países desenvolvidos. Devido à necessidade de informações para promoção do uso racional de medicamentos em pediatria, o governo britânico publicou em 2006 o *British National Formulary for Children* com o objetivo de padronizar informações acerca da prescrição de medicamentos do recém-nascido ao adolescente (BRITISH NATIONAL FORMULARY FOR CHILDREN, 2006). Seguindo o mesmo caminho, em 2007, a *European Medicines Agency* (EMA) preconizou um conjunto de medidas para o registro de medicamentos de uso na infância e incentivos à pesquisa clínica e ao desenvolvimento de medicamentos de uso pediátrico (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2007).

Já no âmbito nacional, devido ao número reduzido de formulações pediátricas disponíveis, estudos relatam a prática do uso de “medicamentos não licenciados” para tratar crianças (FERREIRA *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2008). “Medicamentos não licenciados” são aqueles que não possuem registro junto ao órgão regulador ou que foram manufacturados ou modificados. Como exemplo de “medicamentos não licenciados” em pediatria, podemos citar o uso da INH, no qual a produção de uma formulação extemporânea é obtida a partir de uma forma farmacêutica oral sólida e assim, pode ser administrada facilmente em crianças (COSTA *et al.*, 2009). Embora as formulações extemporâneas apresentem a vantagem de serem de fácil administração, a

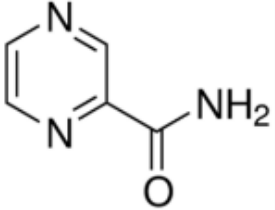
ausência de informações sobre biodisponibilidade, estabilidade física, química e microbiológica da formulação resultante é preocupante.

As formulações pediátricas são desenvolvidas com o objetivo de tornarem-nas mais atrativas e seguras ao público pediátrico, contribuindo para a adesão ao tratamento farmacológico. Para isso, as formulações pediátricas devem apresentar um sensorial adequado, com textura, consistência e cores atrativas (IVANOVSKA *et al.*, 2014; LOPEZ *et al.*, 2015). Partindo-se do pressuposto de que a via de administração oral é a via mais adequada para pacientes pediátricos (CHANDRASEKARAN *et al.*, 2018), várias formas farmacêuticas podem ser utilizadas para o desenvolvimento de uma formulação pediátrica, como por exemplo, preparações líquidas como as soluções e suspensões e as preparações sólidas como os comprimidos orodispersíveis, gomas mastigáveis, entre outros (LOPEZ *et al.*, 2015). Nesse caso, a forma farmacêutica ideal pode ser selecionada com base na faixa etária da criança, onde preparações líquidas são mais apropriadas para grupos etários mais jovens por possuírem certa dificuldade em deglutir. As preparações líquidas orais são vantajosas devido à variedade de volumes (doses) que podem ser administrados. Sendo assim, formulações pediátricas líquidas de uso oral podem ser desenvolvidas para auxiliar na adesão ao tratamento da tuberculose infantil. Nessa perspectiva, desenvolver uma formulação pediátrica contendo dois dos principais fármacos de primeira escolha para o tratamento da tuberculose é uma estratégia promissora.

Os fármacos PYZ e RIF, fármacos de primeira escolha para o tratamento da tuberculose, apresentam como principal desafio o fato de que são pouco solúveis em água (Quadros 1 e 2). Desta característica físico-química decorrem as dificuldades farmacotécnicas relacionadas ao desenvolvimento de formas farmacêuticas líquidas sem adjuvantes não-recomendados para crianças, tais como co-solventes (ex. etanol) ou surfactantes em altas concentrações. A adequada solubilização dos fármacos na forma farmacêutica líquida é condição necessária para garantir a reprodutibilidade de dose em cada administração. Sem esta garantia, não é possível assegurar a segurança e a eficácia do tratamento. A co-incorporação destes fármacos em nanopartículas lipídicas é a alternativa proposta neste estudo de tese para contornar tal desafio. Cabe salientar que esta estratégia também permite mascarar sabor, conforme já mencionado anteriormente

neste documento. As principais propriedades dos fármacos PYR e RIF estão apresentadas a seguir, nos Quadros 1 e 2:

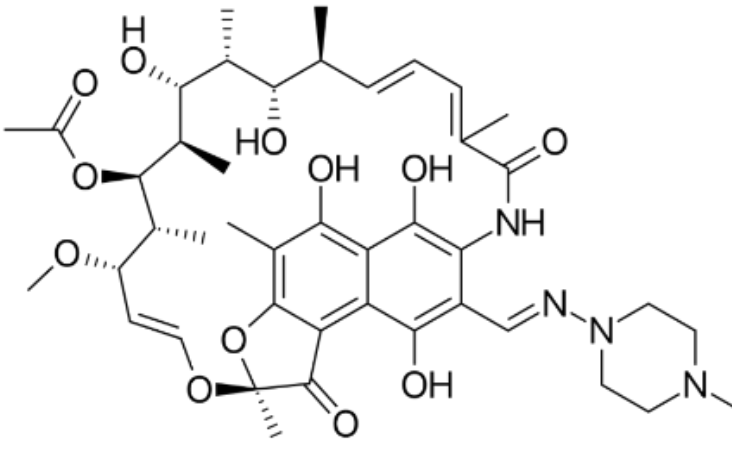
Quadro 1: Principais propriedades do fármaco pirazinamida.

Denominação Comum Internacional	Pyrazinamide
Sinônimos	Ácido amidopirazinóico e pirazinocarboxiamida
CAS	[98-96-4]
Fórmula química	C ₅ H ₅ N ₃ O
Fórmula estrutural	
Peso molecular	123,11 g mol ⁻¹
Solubilidade	Solúvel em clorofórmio e ligeiramente solúvel em água
Ponto de fusão	192 °C

Fonte: (Handbook of Anti-Tuberculosis Agents, 2008; KHAWAS *et al.*, 2020).

A PYZ é um fármaco derivado sintético da nicotinamida (ZHANG; MITCHISON, 2003). Sua forma ativa, o ácido pirazinóico, é obtida pela ação da enzima nicotinamidase/pirazinamidase do *Mycobacterium tuberculosis* (Zhang and Mitchison, 2003). Altas concentrações de ácido pirazinóico no citoplasma bacteriano diminuem o pH intracelular causando inativação de enzimas vitais, acarretando na morte do bacilo (ZHANG; MITCHISON, 2003; ZHANG *et al.*, 2013).

Quadro 2: Principais propriedades do fármaco rifampicina.

Denominação Comum Internacional	Rifamycin
CAS	[13292-46-1]
Fórmula química	C ₄₃ H ₅₈ N ₄ O ₁₂
Fórmula estrutural	
Peso molecular	822,94 g mol ⁻¹
Solubilidade	Solúvel em acetato de etila e pouco solúvel em água
Ponto de fusão	183 °C

Fonte: (Handbook of Anti-Tuberculosis Agents, 2008; KHAWAS *et al.*, 2020).

A RIF é um medicamento bactericida cujo mecanismo de ação está relacionado à inibição da RNA-polimerase DNA-dependente de micobactérias. Tal inibição ocorre através da formação de um complexo fármaco-enzima que acarreta a supressão da formação da cadeia de RNA (FLOSS; YU, 2005; WEHRLI, 1983).

A nanotecnologia é uma área da ciência que trabalha em escalas nanométricas, com sistemas tipicamente na faixa de 1 a 100 nm, podendo ser englobados também sistemas com dimensões maiores (ex. nanopartículas com diâmetro de até 1.000 nm) no caso de aplicações biológicas (BOISSEAU; LOUBATON, 2011). No âmbito biomédico, nanossistemas podem aumentar a estabilidade fisicoquímica de fármacos, aumentar sua biodisponibilidade, reduzir efeitos colaterais e toxicidade, além de reduzir a frequência de dosagem, o que aumenta a probabilidade de maior adesão do paciente ao tratamento (BARRATT, 2003; KUMARI; YADAV; YADAV, 2010).

Nos últimos anos, diversos tipos de nanoestruturas têm sido sintetizados e utilizados na área médica, como as nanopartículas lipídicas sólidas (PANDEY; SHARMA; KHULLER, 2005), poliméricas (HORVÁTI *et al.*, 2014), metálicas (HUSSAIN; SAMIR; AZZAZY, 2013), nanocristais (MELO *et al.*, 2020), lipossomas (NIU *et al.*, 2020) e cubossomas (OLA; BELGAMWAR, 2017).

Partindo-se do pressuposto de que a via de administração oral é a via mais adequada para pacientes pediátricos, o desenvolvimento de uma formulação pediátrica composta de uma nanoestrutura contendo os fármacos PYZ e RIF visando o tratamento da tuberculose infantil é uma hipótese a ser testada. Sabe-se, da literatura, que o lipídio polar fitantriol permite a obtenção de cubossomas gastrorresistentes (AVACHAT; PARPANI, 2015). Devido à alta capacidade de incorporação de fármacos em cubossomas (dado que apresentam elevada área superficial) e sua gastrorresistência, este foi o lipídio de escolha para o desenvolvimento das formulações.

CAPÍTULO 1
NANOTECHNOLOGY FOR THE TREATMENT OF PAEDIATRIC DISEASES: A
REVIEW

APRESENTAÇÃO DO CAPÍTULO

Novas estratégias têm sido propostas para o desenvolvimento de medicamentos para uso pediátrico sendo: novas formulações, formas farmacêuticas atrativas, insumos mais seguros, emprego da micro e nanotecnologia para a veiculação de fármacos, entre outras. Dentre essas novas abordagens, a nanotecnologia representa uma ampla gama de benefícios na área farmacêutica, tais como: (1) mascaramento de sabor de fármacos, (2) melhora da biodisponibilidade de fármacos, (3) diminuição dos efeitos colaterais e (4) redução de doses, fato que contribui para a adesão à terapia prescrita, evitando o abandono do tratamento, como nos casos da tuberculose (KHATAMI; BRITTON; MARAIS, 2019).

Com base nos benefícios relatados, o presente capítulo reúne os principais tipos de nanoestruturas já descritas na literatura científica para o desenvolvimento de formulações pediátricas. Esse artigo de revisão foi proposto como uma revisão sistematizada dos artigos publicados até setembro de 2021 que constam nas bases de dados Web of Science e Scopus utilizando-se a combinação de palavras-chave “nano* AND pediatric” e “nano* AND paediatric”. Este manuscrito foi publicado no periódico *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. Devido aos direitos de divulgação do periódico, o referido capítulo foi excluído da versão parcial da tese. No entanto, as principais considerações desse capítulo estão apresentados a seguir.

NANOTECHNOLOGY FOR THE TREATMENT OF PAEDIATRIC DISEASES: A REVIEW

Morgana Souza Marques¹, Lorena Almeida Lima¹, Fernanda Poletto², Renata Vidor Contri¹, Irene Cledes Kulkamp Guerreiro¹

¹Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

²Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

*Corresponding author: Tel.: +55 (51) 3308-5416. E-mail: morganasouzamarques@gmail.com (Morgana Souza Marques). ORCID number: 0000-0002-9879-9425.

NANOTECHNOLOGY FOR THE TREATMENT OF PAEDIATRIC DISEASES: A REVIEW

Abstract

In recent years, health authorities have encouraged the development of paediatric formulations. New technologies have been proposed for the development of paediatric products, including nanotechnology, which has a wide range of benefits in the pharmaceutical field, such as greater therapeutic efficiency, possibility of drug targeting, reduced toxicity and masking bitter drug taste. The aim of the present review has been to search for literature reports regarding the several different kinds of nanostructures described for treating paediatric diseases. A systematized review was performed up to September 2021 from searching in the Web of Science and Scopus databases using the combination of keywords “nano* AND pediatric” or “nano* AND paediatric”. A total of 51 peer-reviewed publications were selected, from which the following data were extracted: article title, year of publication, drug incorporated or encapsulated into the nanostructure, ATC drug class, type of nanostructure, specific tests performed for paediatric formulations and formulation studies that gave rise to a patent or product commercially available. The main motivations for the use of nanotechnology in the development of paediatric formulations were: increased therapeutic efficacy (22%), improved drug taste (18%) and targeted therapy (16%). The most encountered therapeutic drug class was anticancer (55%), followed by antivirals (24%). Polymeric nanoparticles (31%), lipid-based nanocarriers (25%) and polymeric micelles (12%) were the most commonly cited nanostructures in these studies. Some of the main tests designed for paediatric specific tests were efficacy and safety studies in animal model of paediatric disease, as well as palatability verification of developed formulations. This review article shows the viable possibilities for the use of nanotechnology as a useful tool for the development of paediatric formulations.

Keywords: Nanotechnology; Nanostructure; Paediatric.

CAPÍTULO 2

***DEVELOPMENT OF DERIVATIVE SPECTROPHOTOMETRIC METHOD FOR
SIMULTANEOUS DETERMINATION OF PYRAZINAMIDE AND RIFAMPICIN
IN CUBOSOME FORMULATION***

APRESENTAÇÃO DO CAPÍTULO

Crianças menores de 10 anos de idade, com diagnóstico positivo para tuberculose, devem iniciar o tratamento com associação de medicamentos tuberculostáticos. Visto que o principal objetivo desta tese consistiu em desenvolver uma formulação nanotecnológica contendo PYZ e RIF co-incorporados, inicialmente foi necessário desenvolver um método analítico para a quantificação simultânea destes fármacos.

Este capítulo aborda o desenvolvimento de método de espectrofotometria de derivadas para a determinação simultânea de PYZ e RIF em cubossomas. O método proposto foi validado de acordo com as diretrizes da Conferência Internacional de Harmonização (ICH) Q2 (R1) para a validação de métodos analíticos (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE (ICH);, 2005) e com base na RDC nº 166 de 24 de julho de 2017 (BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2017). Este manuscrito foi publicado no periódico Drug Analytical Research e, por esse motivo, foi excluído dessa versão parcial da tese respeitando os direitos de divulgação do periódico. Todavia, foram inseridas a seguir as principais considerações dos conteúdos retirados.

**DEVELOPMENT OF DERIVATIVE SPECTROPHOTOMETRIC METHOD
FOR SIMULTANEOUS DETERMINATION OF PYRAZINAMIDE AND
RIFAMPICIN IN CUBOSOME FORMULATION**

Morgana Souza Marques^a, Fernando Dal Pont Morisso^b, Fernanda Poletto^c, Irene Clemes Kulkamp Guerreiro^{a*}

^aPós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil;

^bPós-Graduação em Tecnologia de Materiais e Processos Industriais, Universidade Feevale, 93525-075, Novo Hamburgo, RS, Brazil;

^cDepartamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

*Corresponding Author: Irene Clemes Kulkamp Guerreiro

Departamento de Produção de Matéria-prima, Faculdade de Farmácia, UFRGS

Av. Ipiranga 2752, Bairro Santana

CEP 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil.

Phone: + 55 51 33085416

E-mail: irene@ufrgs.br

DEVELOPMENT OF DERIVATIVE SPECTROPHOTOMETRIC METHOD FOR SIMULTANEOUS DETERMINATION OF PYRAZINAMIDE AND RIFAMPICIN IN CUBOSOME FORMULATION

Abstract

The ultraviolet spectrophotometry analysis for quantitative assay of drugs is a method accurate, sensitive, selective and reproducible with the advantage of being a simple and less expensive method. In this study, a derivative ultraviolet spectrophotometric method was developed for simultaneous determination of pyrazinamide (PYZ) and rifampicin (RIF). The spectrophotometric method was evaluated according to validation guidelines for specificity, linearity, limits of detection and quantification, precision, accuracy and robustness. The first-derivative spectra were obtained and by the zero-crossing point, the wavelength 247 nm and 365 nm were selected for PYZ and RIF quantification, respectively. No interference from cubosome excipients was detected in the proposed method. The results demonstrated linearity in a range of 4.0 – 12.0 µg/mL with an adequate correlation coefficient for both drugs. The intra and inter-day precision results (RSD < 5%) indicated the reproducibility of the method. The accuracy data showed satisfactory results (RSD < 5%) from recovery test. In addition, the robustness results showed that the PYZ and RIF content were unaffected by the solvent alteration of methanol to methanol:water (99:1, v/v). The derivative ultraviolet spectrophotometric method proved to be an excellent strategy for simultaneous determination of PYZ and RIF.

Keywords: Pyrazinamide; Rifampicin; UV spectrophotometry; derivative spectrophotometry.

CAPÍTULO 3

***NANOVEHICLE FOR INCORPORATION OF TUBERCULOSTATIC DRUGS
FOR PAEDIATRIC TUBERCULOSIS THERAPY***

APRESENTAÇÃO DO CAPÍTULO

A tuberculose é um desafio à saúde pública devido às altas taxas de incidência (WHO, 2020). Embora exista uma padronização para o tratamento da tuberculose na infância com a administração de fármacos tuberculostáticos (WHO, 2014), ainda há certa carência de formulações que possam ser administradas ao público pediátrico. Na tentativa de atender a esta necessidade, uma hipótese a ser estudada seria a incorporação simultânea de PYZ e RIF em nanocarreadores visando desenvolver uma formulação líquida pediátrica.

O capítulo 3 contempla o desenvolvimento e caracterização de uma formulação líquida composta de um nanossistema contendo PYZ e RIF com foco no tratamento da tuberculose pediátrica. Esse manuscrito será submetido à publicação em periódico a ser definido. O conteúdo presente no capítulo 3 ainda não foi publicado, porém foi excluído desta versão parcial da tese. As principais considerações dos conteúdos retirados estão apresentadas a seguir.

NANOVEHICLE FOR INCORPORATION OF TUBERCULOSTATIC DRUGS FOR PAEDIATRIC TUBERCULOSIS THERAPY

Morgana Souza Marques¹, Fernando Dal Pont Morisso², Alexia de Matos Czczot³, Marcia Alberton Perelló⁴, Pablo Machado⁴, Murilo Henrique Facure⁵, Tamires Pereira⁵, Daniel Corrêa⁵, Renata Vidor Contri¹, Fernanda Poletto⁶, Irene Cledes Kulkamp Guerreiro¹

¹Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

²Pós-Graduação em Tecnologia de Materiais e Processos Industriais, Universidade Feevale, Novo Hamburgo, RS, Brazil

³Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, Pontifícia Universidade Católica Do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

⁴Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Em Tuberculose, Centro de Pesquisas Em Biologia Molecular e Funcional, Pontifícia Universidade Católica Do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

⁵Laboratório Nacional de Nanotecnologia para o Agronegócio, Embrapa Instrumentação, São Carlos, Brazil

⁶Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

*Corresponding author: Tel.: +55 (51) 3308-5416. E-mail: morganasouzamarques@gmail.com (Morgana Souza Marques). ORCID number: 0000-0002-9879-9425.

NANOVEHICLE FOR INCORPORATION OF TUBERCULOSTATIC DRUGS FOR PAEDIATRIC TUBERCULOSIS THERAPY

Abstract

Tuberculosis is one of the top 10 causes of death with a total of 1.4 million deaths in 2019. Tuberculosis treatment consists in an association of tuberculostatic drugs in order to prevent the emergence of bacterial resistance. However, few paediatric tuberculosis medicines are commercially available. In this perspective, the aim of this study is to develop a liquid formulation containing nanovehicle loaded with pyrazinamide and rifampicin for the treatment of paediatric tuberculosis. The synthesized nanovehicles were evaluated for their particle size, particle surface charge, drug content and drug incorporation efficiency. In addition, *Mycobacterium tuberculosis* inhibition *in vitro* assay and *in vitro* taste evaluation was also evaluated. A nanovehicle containing tuberculostatic drugs was developed free from ethanol, propylene glycol, sweeteners or flavors. The formulation showed nanotechnological features, with 220 nm. The pH, zeta potential and drug content results were satisfactory. Drug incorporation efficiency results support the evidence that the drugs were successfully incorporated into the nanovehicle. Based on MIC assay results, the nanosystem containing PYZ and RIF was effective against H37Rv *Mycobacterium tuberculosis* strain. These nanosystem can be a reasonable strategy to obtain a promising paediatric medicine for tuberculosis therapy.

Keywords: Nanovehicle, Pyrazinamide, Rifampicin, Tuberculostatic, Phytantriol.

O número restrito de formulações pediátricas comercialmente disponíveis pode ser justificado devido a questões econômicas, éticas e técnicas. Em relação as questões econômicas, a população infantil representa uma pequena parcela da população geral, não sendo atrativa para a indústria farmacêutica em investir no desenvolvimento de produtos pediátricos (TURNER *et al.*, 2014). Quanto as questões éticas, destaca-se a dificuldade em recrutar os voluntários para os ensaios clínicos devido à idade (THOMPSON *et al.*, 2015). Já as questões farmacotécnicas estão associadas ao desenvolvimento da formulação. Definir uma forma farmacêutica apropriada para a faixa etária e mascarar o sabor dos insumos farmacêuticos são dificuldades encontradas (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2006, 2013). Devido à heterogeneidade etária da população pediátrica, várias formas farmacêuticas podem ser utilizadas, no entanto, a via oral é a via de administração preferida. Nesse sentido, ao desenvolver medicamentos orais, a palatabilidade da formulação deve ser adequada. Algumas tecnologias são propostas para mascarar o sabor de medicamentos, como adoçantes e sistemas aromatizantes, bloqueadores de amargor e modificadores de sabor, modificação de ingredientes farmacêuticos ativos, solubilidade e nanotecnologia (WALSH *et al.*, 2014).

A nanotecnologia apresenta uma ampla gama de benefícios na área farmacêutica, como por exemplo: maior eficiência terapêutica, possibilidade de entrega de fármacos a alvos específicos, diminuição da toxicidade, dose e efeitos colaterais e mascaramento de sabor. Essas vantagens tornam as formulações contendo nanotecnologia uma boa estratégia para pacientes pediátricos (SAHU *et al.*, 2021).

Artigos de revisão que abordam a associação da nanotecnologia e o desenvolvimento e aplicação de formulações pediátricas têm sido pouco estudados. Sosnik e Carcaboso (2014) estudaram as diferentes tentativas de usar a nanotecnologia para tratar doenças na população pediátrica; entretanto, focaram no uso de nanoestruturas no tratamento de doenças específicas, como doenças infecciosas pediátricas e tumores sólidos pediátricos (SOSNIK; CARCABOSO, 2014).

Com o objetivo de não restringir doenças e explorar mais as nanoestruturas, inicialmente essa tese revisou na literatura os benefícios da nanotecnologia no desenvolvimento de produtos farmacêuticos para crianças. Essa revisão de literatura

originou um artigo científico publicado no periódico *Journal of drug delivery science and technology*, correspondente ao capítulo I desta tese. Com base nessa revisão de literatura foi possível verificar que as maiores motivações para o uso da nanotecnologia no desenvolvimento de formulações pediátricas foram: aumento da eficácia terapêutica (22%), melhora do sabor do medicamento (18%) e terapia direcionada (16%). Observou-se que a principal classe terapêutica incorporada nas nanopartículas foi a dos anticancerígenos, devido à necessidade urgente de terapias mais eficazes para o público pediátrico. Vários tipos de nanoestruturas foram utilizados no desenvolvimento de medicamentos pediátricos devido aos seus benefícios. A classe de nanoestruturas proposta para o tratamento de doenças pediátricas mais utilizada foi a nanopartícula polimérica, totalizando 31% dos artigos selecionados nesta revisão. Nanocarreadores à base de lipídios, micelas poliméricas, pontos de carbono, nanopartículas híbridas de polímeros, nanopartículas inorgânicas e nanoesponja também se mostraram promissores para doenças pediátricas. Os artigos selecionados nessa revisão de literatura demonstraram o uso promissor da nanotecnologia no desenvolvimento de formulações pediátricas (MARQUES *et al.*, 2022).

Devido aos benefícios da utilização de sistemas nanoestruturados no desenvolvimento de formulações pediátricas, foi-se idealizado o desenvolvimento de uma formulação nanotecnológica contendo três fármacos da primeira linha de escolha para o tratamento da tuberculose, como INH, PYZ e RIF. O objetivo inicial constava no desenvolvimento de uma formulação líquida contendo fármacos tuberculostáticos com a finalidade de ser utilizada na primeira etapa do tratamento da tuberculose pediátrica. Para isso, a incorporação simultânea dos fármacos INH, PYZ e RIF foi testada em três diferentes formulações variando a sua composição, utilizando os lipídios PHY e/ou monoleína (MO) e o surfactante F127.

Formulações de ftantriol (PHY:F127 (2:1)), ftantriol e monoleína (PHY:MO:F127 (1:1:1)) e monoleína (MO:F127 (2:1)) foram sintetizadas conforme método descrito anteriormente (RIBEIRO *et al.*, 2019) com algumas modificações. PHY e/ou MO (375 mg) foi aquecido a 40 °C e os fármacos INH (15 mg), PYZ (15 mg) e RIF (15 mg) foram então adicionados. A essa preparação, adicionou-se uma solução aquosa (30 mL) contendo F127 (187,5 mg). A mistura foi homogeneizada por

ultrassonicação (QR500W, Ecosonics) a 99% de amplitude durante 25 minutos utilizando uma sonda de 13 mm de diâmetro. Ao final do processo de homogeneização, o peso da formulação foi corrigido para 30 g com água desionizada.

Após a síntese das formulações, a quantificação dos fármacos INH, PYZ e RIF foi realizada por meio de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de UV (HPLC-UV; Agilent 1200) conforme monografia contida na Farmacopeia Americana (FARMACOPEIA AMERICANA, 2020). A separação dos fármacos foi realizada utilizando uma coluna C18 (Phenomenex, 4,6 mm x 250 mm, 5 µm, EUA) acoplada a uma pré-coluna C18 (Phenomenex, EUA) a 25 °C e no comprimento de onda de 238 nm. A fase móvel A consistiu em uma mistura de tampão fosfato de sódio monobásico 20 mM:acetonitrila (96:4, v/v) e a fase móvel B em acetonitrila. A separação dos fármacos ocorreu através de método de eluição por gradiente conforme apresentado abaixo:

Tabela 3. Gradiente de fase móvel para método de teor de isoniazida, pirazinamida e rifampicina por cromatografia líquida de alta eficiência.

Tempo (min)	Fase móvel A (%)	Fase móvel B (%)
0	100	0
5	100	0
7	48	52
12	48	52
12,01	100	0
17	100	0

Para a realização da quantificação dos fármacos, as formulações foram diluídas em metanol:água (7:3; v/v), agitadas em sonicador por 2 minutos e filtradas em membrana de 0,45 µm. A Tabela 4 contém os resultados de teor dos fármacos INH, PYZ e RIF em até 7 dias de armazenamento em temperatura ambiente.

Tabela 4. Teor dos fármacos isoniazida, pirazinamida e rifampicina incorporados em cubossomas.

Formulação	Fármaco	Teor tempo zero (%)	Teor tempo 7 dias (%)	Degradação em 7 dias (%)
Fármaco livre	INH	89,05	6,15	82,90
	PYZ	117,72	22,45	95,27
	RIF	104,16	60,62	43,54
PHY:F127 (2:1)	INH	98,36	90,59	7,77
	PYZ	107,46	108,48	-
	RIF	88,55	56,80	31,75
PHY:MO:F12 7 (1:1:1)	INH	98,55	115,95	-
	PYZ	105,72	115,41	-
	RIF	94,58	44,61	49,97
MO:F127 (2:1)	INH	96,43	86,72	9,71
	PYZ	101,90	116,72	-
	RIF	96,63	51,06	45,57

Os resultados de teor provenientes de uma amostra contendo os fármacos livres em associação mostram que após 7 dias de armazenamento ao abrigo da luz e em temperatura ambiente ocorre uma alta degradação de todos os fármacos. A degradação dos fármacos INH e RIF, quando em associação, já foi estabelecida em literatura. Estudos relatam a existência de incompatibilidade entre os fármacos INH e RIF em meio ácido (SHISHOO *et al.*, 1999, 2001). Devido a essa incompatibilidade, a decomposição do fármaco RIF é acelerada em aproximadamente três vezes mais na presença de INH, reduzindo a sua biodisponibilidade a partir de formulações combinadas (SINGH *et al.*, 2000). Esses achados corroboram com os resultados encontrados.

Ao incorporar os mesmos fármacos em uma formulação de PHY:F127, é possível observar uma melhora do parâmetro estabilidade de conteúdo, inclusive após 7 dias de armazenamento, muito embora a degradação de INH e RIF ainda ocorra. A incorporação dos fármacos em um sistema nanoparticulado pode ter suavizado a degradação dos fármacos. Uma vez que as lipofilicidades dos fármacos INH e RIF são diferentes, a INH

apresenta característica hidrofílica ao passo que a RIF é lipofílica, hipotenzou-se que a degradação dos fármacos pudesse ter sido amenizada se a incorporação desses ocorresse em locais distintos da partícula, como poderia ser realizado no cubossoma.

Alterar a composição da formulação de PHY:F127, para uma mistura de PHY:MO ou para MO não foi suficiente para melhorar os resultados de degradação dos fármacos INH e RIF. Devido aos resultados não favoráveis de teor, principalmente após 7 dias de armazenamento, a formulação que apresentou resultado mais favorável entre os testados, formulação PHY:F127 (2:1), foi utilizada com a finalidade de incorporar os fármacos INH, PYZ e RIF individualmente. Após a síntese das formulações de PHY:F127:INH; PHY:F127:PYZ e PHY:F127:RIF, uma mistura física dessas três amostras foi realizada e o teor dos fármacos foi analisado (Tabela 5).

Tabela 5. Estabilidade da formulação composta pela mistura física de cubossomas contendo isoniazida, pirazinamida e rifampicina.

Formulação	Fármaco	Teor tempo zero (%)	Teor tempo 7 dias (%)	Degradação em 7 dias (%)
PHY:F127 (2:1)	INH	98,36	90,59	7,77
	PYZ	107,46	108,48	-
	RIF	88,55	56,80	31,75
PHY:F127 (2:1) mistura física	INH	95,30	70,90	24,40
	PYZ	99,00	101,20	-
	RIF	83,80	43,60	40,20

É possível observar que a degradação dos fármacos INH e RIF provenientes da mistura física foi superior quando comparado com a formulação inicial. Esses resultados mostram que a incorporação dos fármacos em partículas sintetizadas separadamente não foi o suficiente para impedir a degradação dos fármacos.

Outra hipótese testada com a finalidade de impedir a degradação dos fármacos foi a liofilização da formulação PHY:F127 (2:1). Diferentes crioprotetores como aerosil[®], manitol, sacarose e xilitol na concentração de 5% (p/v) foram testados. Alíquotas da formulação foram adicionadas a cada crioprotetor, foram solubilizadas e

congeladas a -80 °C. E em seguida, as amostras congeladas foram liofilizadas (MicroModulyo, Thermo Savant) até total evaporação do solvente. Os resultados de teor das formulações liofilizadas estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Estabilidade dos cubossomas liofilizados contendo isoniazida, pirazinamida e rifampicina.

Formulação	Fármaco	Teor tempo zero (%)	Teor tempo 7 dias (%)	Degradação em 7 dias (%)
PHY:F127 (2:1)	INH	98,36	90,59	7,77
	PYZ	107,46	108,48	-
	RIF	88,55	56,80	31,75
PHY:F127 (2:1) + aerosil [®]	INH	56,04	-	-
	PYZ	66,71	-	-
	RIF	59,08	-	-
PHY:F127 (2:1) + manitol	INH	92,47	47,50	44,97
	PYZ	103,40	75,10	28,30
	RIF	55,11	27,40	27,71

Após o processo de liofilização, as formulações contendo sacarose e xilitol não resultaram em um pó e por esse motivo não foram analisadas quanto ao teor. Formulações contendo os crioprotetores aerosil[®] e manitol originaram pós homogêneos de cor laranja e livres de agregações. As formulações contendo aerosil[®] e manitol foram facilmente solúveis em metanol: água (7:3).

Dentre as duas formulações liofilizadas, a formulação contendo 5% de aerosil[®] apresentou maior degradação dos fármacos no tempo zero e devido a esses resultados, o ensaio de degradação em 7 dias não foi realizado. A utilização de 5% de manitol também não foi capaz de originar uma formulação estável, os resultados apresentados mostram uma degradação superior a formulação coloidal, tanto no tempo zero quanto no tempo 7 dias. A redução nos valores de teor dos fármacos INH, PYZ e RIF independentemente do tempo analisado e do crioprotetor utilizado indica um impacto

da liofilização na integridade dos cubossomas, contribuindo para a degradação dos fármacos.

Com base nos resultados preliminares, uma nova abordagem foi realizada, e a produção de uma formulação estável foi preferida. Nesse sentido, o desenvolvimento de uma formulação nanotecnológica contendo os fármacos PYZ e RIF foi estudada. Inicialmente, foi desenvolvido um método espectrofotométrico de derivadas para quantificação simultânea de PYZ e RIF em formulação nanotecnológica. Os resultados oriundos dessa validação analítica foram publicados no periódico *Drug Analytical Research* (MARQUES *et al.*, 2021), correspondente ao capítulo II desta tese. O método analítico proposto apresentou resultados adequados, com valores de acordo com o que é preconizado pelos compêndios oficiais (BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2017), sendo considerado um método analítico simples, rápido, sensível, preciso e exato e apropriado para a quantificação simultânea de PYZ e RIF em formulação nanotecnológica.

Após a validação do método analítico para a quantificação dos fármacos tuberculostáticos, uma formulação nanotecnológica líquida contendo os fármacos PYZ e RIF foi desenvolvida objetivando o tratamento da tuberculose pediátrica. A incorporação de PYZ (OLA; BELGAMWAR, 2017) ou RIF (TRAN *et al.*, 2018) em nanoestrutura lipídica, como por exemplo, cubossomas, já foi descrito em literatura. No entanto, não existem estudos relatando o desenvolvimento de formulações contendo essa associação de fármacos tuberculostáticos em uma nanoestrutura. Na presente tese, a incorporação simultânea de PYZ e RIF em um nanossistema lipídico demonstrou ser uma forma adequada de administração oral para o tratamento da tuberculose pediátrica. O nanossistema desenvolvido contendo os fármacos tuberculostáticos é isento de etanol, propilenoglicol, adoçantes ou aromatizantes, sendo indicado para o público pediátrico. Os resultados de eficiência de incorporação de mostraram haver uma alta coincorporação dos fármacos PYZ e RIF no nanossistema. Ainda, o uso da formulação nanotecnológica desenvolvida foi testada contra cepa H37Rv *Mycobacterium tuberculosis* e se mostrou que a incorporação de PYZ e RIF no nanossistema desenvolvido os tornou mais tóxicos para o *Mycobacterium tuberculosis*,

com uma redução dos valores de MIC. Esse nanossistema pode ser uma estratégia razoável para obter um medicamento pediátrico promissor para a terapia da tuberculose.

Os resultados obtidos no contexto desta tese sugerem que uma formulação líquida composta de um nanossistema de PHY, no qual há co-incorporação de PYZ e RIF, pode ser potencialmente utilizada para o desenvolvimento de um medicamento pediátrico para o tratamento da tuberculose infantil. Para fins de clareza, as conclusões foram elencadas conforme as evidências apresentadas em cada capítulo:

CAPÍTULO 1

- As principais motivações para o uso da nanotecnologia no desenvolvimento de formulações pediátricas estão associadas ao aumento da eficácia terapêutica, melhora do sabor do medicamento, terapia direcionada, melhora da biodisponibilidade e permeabilidade do medicamento.
- A classe de nanocarreadores à base de lipídios foi amplamente utilizada para o desenvolvimento de formulações pediátricas com atividades antitumoral e antiviral, além de se mostrarem promissoras em mascarar o sabor de fármacos e carrear fármacos de diferentes lipofilicidades.
- A utilização da nanotecnologia no desenvolvimento de formulações pediátricas se mostrou promissora e o seu uso pode originar produtos patenteáveis.

CAPÍTULO 2

- É possível quantificar simultaneamente os fármacos tuberculostáticos PYZ e RIF através de método de espectrofotometria de derivadas.
- Os fármacos PYZ e RIF incorporados em formulação nanotecnológica podem ser quantificados através do método de espectrofotometria de derivadas previamente validado.

CAPÍTULO 3

- A formulação líquida nanotecnológica contendo os fármacos tuberculostáticos PYZ e RIF foi desenvolvida utilizando uma abordagem verde (sem solventes ou

resíduos químicos) originando um produto isento de etanol, propilenoglicol, adoçante ou aromatizante, podendo ser potencialmente indicada para o público pediátrico.

- O nanossistema desenvolvido apresenta características nanotecnológicas apropriadas.
- A taxa de incorporação dos fármacos tuberculostáticos na partícula é elevada.
- Os resultados de MIC mostraram que a incorporação simultânea dos fármacos PYZ e RIF se mostrou eficaz frente ao microrganismo *Mycobacterium tuberculosis*.

Além dos ensaios executados até o momento dessa defesa, outros devem ser realizados para melhor compreensão do sistema nanotecnológico desenvolvido. Nesse sentido, algumas perspectivas são sugeridas:

- Caracterizar o sistema nanoestruturado contendo PYZ e RIF através dos ensaios de Espalhamento de Raios X a Baixos Ângulos (SAXS, do inglês: *small angle X-ray scattering*) e Crio-Microscopia Eletrônica de Transmissão (Cryo-TEM do inglês: *cryo-transmission electron microscopy*).
- Estudar o potencial irritante do sistema nanoestruturado contendo PYZ e RIF utilizando o teste em membrana corialantóide de ovo embrionado de galinha (HET-CAM, do inglês: *Hen's Egg Test-Chorion Allantoic Membrane*).

- AHMED, M. *et al.* Potential of nanoemulsions for intravenous delivery of rifampicin. **Pharmazie**, v. 63, n. 11, p. 806–811, 2008.
- AVACHAT, Amelia; PARPANI, Shreekrishna. Formulation and development of bicontinuous nanostructured liquid crystalline particles of efavirenz. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 126, p. 87–97, 2015.
- BARRATT, G. Colloidal drug carriers: Achievements and perspectives. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 60, n. 1, p. 21–37, 2003.
- BOISSEAU, Patrick; LOUBATON, Bertrand. Nanomedicine, nanotechnology in medicine. **Comptes Rendus Physique**, v. 12, n. 7, p. 620–636, 2011.
- BRASIL. **Ministério da Saúde. Formulário Terapêutico Nacional**. 2010.
- BRASIL. **Ministério da Saúde. Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil**. 2011.
- BRASIL. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME)**. 2017.
- BRASIL. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME)**. 2020.
- BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **RDC Nº 166, de 24 de Julho de 2017**. 2017.
- BRITISH NATIONAL FORMULARY FOR CHILDREN. **British National Formulary for Children**. 2006.
- CHANDRASEKARAN, P *et al.* Solid oral flexible formulations for pediatric and geriatric patients: age-appropriate formulation platforms. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 80, n. 01, p. 14–25, 2018.
- COSTA, Patrícia *et al.* Carência de preparações medicamentosas para uso em crianças no Brasil. **Jornal de Pediatria**, v. 85, n. 3, p. 229–235, 2009.
- DATASUS. **Brasília (DF): Ministério da Saúde**. 2021.
- EUROPEAN MEDICINES AGENCY. Guideline on pharmaceutical development of medicines for paediatric use. p. 1–24, 2013.
- EUROPEAN MEDICINES AGENCY. **Guideline on the role of pharmacokinetics in the development of medicinal products in the paediatric population**, 2007.
- EUROPEAN MEDICINES AGENCY. Reflection paper: Formulation of Choice for the Paediatric Population, p. 1–45, 2006.
- FARMACOPEIA AMERICANA. USP 43ed, 2020.

FERREIRA, Lilian de Abreu *et al.* A alta prevalência de prescrições de medicamentos off-label e não licenciados em unidade de terapia intensiva pediátrica brasileira.

Revista da Associação Médica Brasileira, v. 58, n. 1, p. 82–87, 2012.

FLOSS, Heinz G.; YU, Tin-Wein. Rifamycin - Mode of Action, Resistance, and Biosynthesis. **Chemical Reviews**, v. 105, n. 2, p. 621–632, 2005.

GROTZ, Estefania *et al.* **Nanotechnology in Tuberculosis: State of the Art and the Challenges Ahead**, 2018.

Handbook of Anti-Tuberculosis Agents, 2008. Pyrazinamide, **Tuberculosis**, 88 (2): 141–144.

Handbook of Anti-Tuberculosis Agents, 2008. Rifampin, **Tuberculosis**, 88 (2): 151–154.

HARTNETT, Terence E; O’CONNOR, Andrea J; LADEWIG, Katharina. Cubosomes and other potential ocular drug delivery vehicles for macromolecular therapeutics.

Expert Opinion on Drug Delivery, v. 12, n. 9, p. 1513–1526, 2015.

HORVÁTI, Kata *et al.* Nanoparticle encapsulated lipopeptide conjugate of antitubercular drug isoniazid: In vitro intracellular activity and in vivo efficacy in a guinea pig model of tuberculosis. **Bioconjugate Chemistry**, v. 25, n. 12, p. 2260–2268, 2014.

HUSSAIN, Marwa M.; SAMIR, Tamer M.; AZZAZY, Hassan M.E. Unmodified gold nanoparticles for direct and rapid detection of Mycobacterium tuberculosis complex.

Clinical Biochemistry, v. 46, n. 7–8, p. 633–637, 2013.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE (ICH); *In*: 2005, Geneva. **Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, Q2(R1)**. Geneva: 2005.

IVANOVSKA, Verica *et al.* Pediatric drug formulations: a review of challenges and progress. **Pediatrics**, v. 134, n. 2, p. 361–372, 2014.

KATIYAR, S. K.; KATIYAR, Sandeep. **Protocol for the management of newly diagnosed cases of tuberculosis**, 2019.

KAUFMANN, Stefan H.E. **How can immunology contribute to the control of tuberculosis?**, 2001.

- KAUFMANN, S. H.E. Is the development of a new tuberculosis vaccine possible?. **Nature Medicine**, v. 6, n. 9, p. 955–960, 2000.
- KHATAMI, Ameneh; BRITTON, Philip N.; MARAIS, Ben J. Management of Children with Tuberculosis. **Clinics in Chest Medicine**, v. 40, n. 4, p. 797–810, 2019.
- KHAWAS, Sourav *et al.* Simultaneous Spectrophotometric Estimation of Rifampicin, Isoniazid and Pyrazinamide in their Pharmaceutical Dosage Form. **Asian Journal of Research in Chemistry**, v. 13, n. 2, p. 117, 2020.
- KUMARI, Avnesh; YADAV, Sudesh Kumar; YADAV, Subhash C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 75, n. 1, p. 1–18, 2010.
- LOPEZ, Felipe L *et al.* Formulation approaches to pediatric oral drug delivery: benefits and limitations of current platforms. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 12, n. 11, p. 1727–1740, 2015.
- MARQUES, Morgana Souza *et al.* Development of derivative spectrophotometric method for simultaneous determination of pyrazinamide and rifampicin in cubosome formulation. **Drug Analytical Research**, v. 5, n. 1, p. 46–50, 2021.
- MARQUES, Morgana Souza *et al.* Nanotechnology for the treatment of paediatric diseases: A review. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 75, p. 103628, 2022.
- MELO, Katherine Jasmine Curo *et al.* Rifampicin nanocrystals: Towards an innovative approach to treat tuberculosis. **Materials Science and Engineering C**, v. 112, p. 110895, 2020.
- MO, J.; MILLERET, G.; NAGARAJ, M. Liquid crystal nanoparticles for commercial drug delivery. **Liquid Crystals Reviews**, v. 5, n. 2, p. 69–85, 2017.
- MOORE, B K *et al.* Epidemiology of drug-resistant tuberculosis among children and adolescents in South Africa, 2005-2010. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 19, n. 6, p. 663–669, 2015.
- NIU, Ning-Kui *et al.* Preparation, Characterization, and in-vitro Cytotoxicity of Nanoliposomes Loaded With Anti-tuberculous Drugs and TGF- β 1 Sirna for Improving Spinal Tuberculosis Therapy. 2020.

- OLA, Monika; BELGAMWAR, V S. Process optimization for formulation of an oral pyrazinamide cubosome. **International Journal of Recent Scientific research**, v. 8, n. 9, p. 20138–20141, 2017.
- PANDEY, Rajesh; KHULLER, G. K. Subcutaneous nanoparticle-based antitubercular chemotherapy in an experimental model. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, n. 1, p. 266–268, 2004.
- PANDEY, Rajesh; SHARMA, Sadhna; KHULLER, G. K. Oral solid lipid nanoparticle-based antitubercular chemotherapy. *In*: 2005. **Tuberculosis**. Tuberculosis (Edinb), 2005. p. 415–420.
- RIBEIRO, Iris R. *et al.* Physiological neutral pH drives a gradual lamellar-to-reverse cubic-to-reverse hexagonal phase transition in phytantriol-based nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 177, p. 204–210, 2019.
- SAHU, Tarun *et al.* Nanotechnology based drug delivery system: Current strategies and emerging therapeutic potential for medical science. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 63, p. 102487, 2021.
- SANTOS, Djanilson Barbosa *et al.* Off-label and unlicensed drug utilization in hospitalized children in Fortaleza, Brazil. **European journal of clinical pharmacology**, v. 64, n. 11, p. 1111–1118, 2008.
- SHISHOO, C J *et al.* Impaired bioavailability of rifampicin in presence of isoniazid from fixed dose combination (FDC) formulation. **International journal of pharmaceutics**, v. 228, n. 1–2, p. 53–67, 2001.
- SHISHOO, C J *et al.* Stability of rifampicin in dissolution medium in presence of isoniazid. **International journal of pharmaceutics**, v. 190, n. 1, p. 109–123, 1999.
- SINGH, S. *et al.* The Reason for an Increase in Decomposition of Rifampicin in the Presence of Isoniazid under Acid Conditions. **Pharmacy and Pharmacology Communications**, v. 6, n. 9, p. 405–410, 2000.
- SOSNIK, Alejandro; CARCABOSO, Angel M. Nanomedicines in the future of pediatric therapy. **Advanced drug delivery reviews**, v. 73, p. 140–161, 2014.
- TANEJA, R. *et al.* Paediatric formulations of second-line anti-tuberculosis medications: challenges and considerations. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 19, n. 12, p. 61–68, 2015.

- THOMPSON, Charles *et al.* Best practice recommendations regarding the assessment of palatability and swallowability in the development of oral dosage forms for pediatric patients. **Therapeutic Innovation & Regulatory Science**, v. 49, n. 5, p. 647–658, 2015.
- TRAN, Nhiem *et al.* Non-lamellar lyotropic liquid crystalline nanoparticles enhance the antibacterial effects of rifampicin against *Staphylococcus aureus*. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 519, p. 107–118, 2018.
- TURNER, M. A. *et al.* Paediatric drug development: the impact of evolving regulations. **Advanced drug delivery reviews**, v. 73, p. 2–13, 2014.
- WALSH, Jennifer *et al.* Playing hide and seek with poorly tasting paediatric medicines: do not forget the excipients. **Advanced drug delivery reviews**, v. 73, p. 14–33, 2014.
- WEHRLI, Walter. Rifampin: Mechanisms of Action and Resistance. **Rev Infect Dis**, v. 5, p. S407-11, 1983.
- WHO. **GLOBAL STATUS REPORT on noncommunicable diseases**. 2014.
- WHO. **Global tuberculosis report**, 2019.
- WHO. **Global tuberculosis report**. 2020.
- ZHANG, Ying *et al.* Mechanisms of pyrazinamide action and resistance. **Microbiology spectrum**, v. 2, n. 4, p. 1–12, 2013.
- ZHANG, Y.; MITCHISON, D. The curious characteristics of pyrazinamide: a review. **International Union Against Tuberculosis and Lung Disease**, v. 7, n. 1, p. 6–21, 2003.
- ZUMLA, Alimuddin *et al.* **Tuberculosis treatment and management-an update on treatment regimens, trials, new drugs, and adjunct therapies**. Lancet Publishing Group, 2015.