

## **Desenvolvimento de chocolate medicamentoso contendo ácido fólico para terapêutica oncológica na pediatria**

**Ana Flávia Viana de Vasconcelos, David Willian Beraldo Pereira, Samira Verdelho Cardoso, Mariana Cecchetto Figueiredo, Júlia Figueiredo Machado, Luciana Urbano dos Santos, Silmara Novachi Lucchesi, Sabrina de Almeida Marques, Ana Carolina Antunes Naime\***

UniAnchieta - Centro Universitário Padre Anchieta - Curso de Farmácia - Campus Prof. Pedro. C. Fornari - Av. Odila Azalim, 575 - Vila Jundiainópolis - Jundiaí/SP<sup>1</sup>

\*Autor para Correspondência: Centro Universitário Padre Anchieta, Avenida Doutor Adoniro Ladeira, 94, Km 55,5, Rodovia Anhanguera, Jundiaí, São Paulo, Brasil.

Todos os autores deste artigo declaram que não há conflito de interesses

Artigo Original

### **Resumo**

Os pacientes oncológicos possuem um declínio dos níveis séricos de ácido fólico, resultando na recuperação incompleta da medula óssea, dito isso, o objetivo deste estudo foi desenvolver uma forma farmacêutica contemporânea para melhor a aceitação, originando um chocolate medicamentoso contendo ácido fólico. Para isto, o desenvolvimento da formulação foi realizado nos laboratórios de química, de nutrição e dietética, conforme RDC 67/2007<sup>15</sup>. O ácido fólico foi utilizado como princípio ativo da formulação, foi incorporado à base, que foi produzida com chocolate ao leite e chocolate 54% cacau, esta sofreu um processo de temperagem mediante a um choque térmico e, após a incorporação, foi obtido o tablete de chocolate medicamentoso, utilizando-se de processos de derretimento, homogeneização, temperagem e moldagem. O teste sensorial foi realizado apenas por integrantes do grupo, não houve alteração de sabor após a incorporação do ácido fólico. As unidades posológicas obtidas, apresentaram peso médio em conformidade com as especificações farmacopeicas para formas farmacêuticas sólidas de dose unitária. Foram realizados ensaios de controle de qualidade, microbiológicos e análise físico-química no lote de bancada, todos apresentando resultados satisfatórios diante da legislação e comparados a outros estudos. Considerando a dificuldade em aceitação ao tratamento farmacoterapêutico na pediatria, demonstrado em estudos, acredita-se que o chocolate

medicamentoso visa a otimizar essa adesão. Conclui -se que, no presente estudo, não houve alterações que pudessem oferecer prejuízos à saúde da criança, ao contrário, houve uma melhora sensorial em relação às formulações de ácido fólico existentes no mercado. A amostra apresentou resultados satisfatórios em relação aos parâmetros analisados, o que pode sugerir, para perspectivas futuras, novos estudos em relação à essa formulação contemporânea.

**Palavras-chave:** Ácido fólico, chocolate medicamentoso, pediatria, adesão, tratamento.

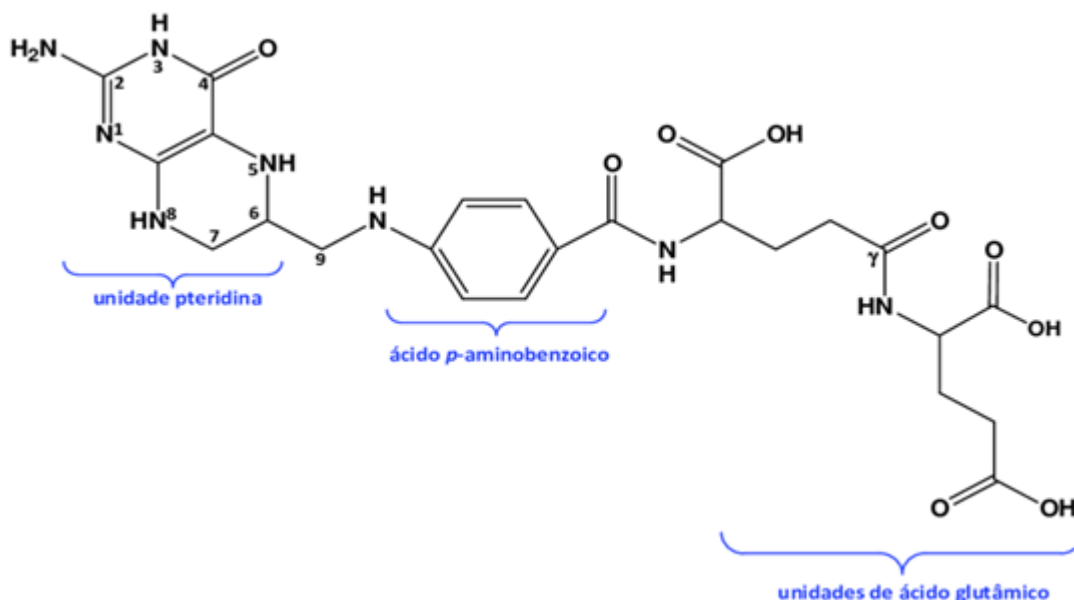
## Introdução

O ácido fólico é uma vitamina formada pelo 2-amino-4-hidroxi-pteridina ligada a uma porção p-aminobenzoilglutamato ao longo de um grupo metileno. As reações do folato em células ocorrem por meio da redução de seu anel de pirazina para a forma ativa chamada tetrahidrofolato. Em alguns casos, o tetrahidrofolato pode ser regenerado para sua reutilização, e quando isto não ocorre, pode ser obtido a partir da dieta ou administração medicamentosa<sup>1</sup>.

A redução do ácido fólico é catalisada pela di-hidrofolato redutase em dois estágios, origina di-hidrofolato (FH2) e tetra-hidrofolato (FH4 - Esse metil é a forma na qual o folato geralmente é transportado no sangue e entra nas células), cofatores que transferem grupamentos metil (transferências de um carbono) em várias vias metabólicas importantes. O FH4 é essencial para a síntese do DNA, devido ao seu papel como cofator na síntese de purinas e pirimidinas<sup>2</sup>.

Após a hidrólise, o folato atravessa a membrana basolateral das células da mucosa intestinal, que contêm PCFT (Proteína transportadora de folato), e devido ao seu caráter ácido, é responsável por transportar o ácido fólico para o sistema nervoso, visto que o pH é ácido nas células da mucosa, o ácido fólico é transportado a taxas mais altas, como monoglutamatos de folato reduzidos, por meio desta proteína<sup>1</sup>.

O folato é necessário para a síntese de purinas e pirimidinas e, portanto, é considerado importante para a proliferação celular adequada. Esse micronutriente também é necessário para a síntese da S-Adenosilmetionina, principal doador de grupos metil, promovendo a regulação epigenética adequada<sup>3</sup>. O ácido fólico é solúvel em água e é composto por três estruturas químicas (fig.1), em uma das extremidades há um anel pteridina, na parte central o ácido para-aminobenzoico (PABA) e na outra extremidade o ácido glutamato<sup>4</sup>.



**Figura 1:** Estrutura química do ácido fólico e suas unidades. Oiano Neto, João. (2010). Aspectos químicos e qualidade nutricional dos alimentos.

Os folatos estão envolvidos em vias complexas e em um grande número de processos bioquímicos que são essenciais para a vida, e desempenham um papel importante na biossíntese do ácido desoxirribonucleico (DNA)<sup>5</sup>. Sua carência afeta todas as células onde transcorrem replicação e divisão dos cromossomos, portanto os tecidos com maior renovação celular são os mais prejudicados<sup>6</sup>, em especial o epitélio do tubo digestivo, podendo levar à diarreia, glossite (vermelhidão e ardência na língua), queilite (inflamação no tubo digestivo) e perda do apetite, problemas que geralmente acomete pacientes em tratamento oncológico<sup>7</sup>.

Diante disso, possui a função fundamental no processo de multiplicação celular, sendo, portanto, indispensável durante a gravidez, pois interfere no aumento dos eritrócitos, no alargamento do útero e no crescimento da placenta e do feto, desta maneira, é requisito para o crescimento normal na fase reprodutiva (gestação e lactação) e na formação de anticorpos<sup>8</sup>.

O uso do ácido fólico durante a gestação serve para diminuir em até 95% os problemas de malformação fetal. Utilizado como prevenção na ocorrência de defeitos abertos do tubo neural (DATN) e outras anomalias, é recomendado que seja ingerido nos três meses pré-concepcionais e até 14 semanas pós-concepção. Estudos mostram que iniciar a

suplementação de ácido fólico 1 mês antes da gravidez reduz mais de 70% dos defeitos do tubo neural. Portanto é recomendado que todas as mulheres que podem engravidar, planejam engravidar ou estão grávidas façam uso de um suplemento diário de 0,4 mg a 0,8 mg (400-800 µg) desta vitamina<sup>3,8</sup>.

A diminuição da formação dos ácidos tetraidrofólicos, pela deficiência de folatos, causa sérios danos na síntese de proteínas, levando a um quadro específico de anemia, além da diminuição no número de células brancas e plaquetas. Sua ingestão inadequada influencia no desenvolvimento e aumento de determinadas neoplasias malignas<sup>10</sup>.

De acordo com um estudo publicado na Indian Pediatrics, foi observado um declínio consistente e significativo dos níveis de ácido fólico em pacientes pediátricos que estavam recebendo tratamento quimioterápico, assim, no dado contexto, podemos concluir que o tratamento oncológico influencia diretamente na deficiência de ácido fólico, resultando na recuperação incompleta da medula óssea<sup>11</sup>.

Logo, podemos concluir que o ácido fólico é de suma importância para auxiliar no tratamento oncológico para crianças, porém a farmacoterapia das crianças difere seus aspectos, em relação à farmacoterapia dos adultos. As crianças possuem necessidades e requisitos diferentes, portanto é essencial que as formulações pediátricas sejam adaptadas para otimizar a farmacoterapia e a adesão ao tratamento de forma adequada, de acordo com a idade, tamanho e condição fisiológica<sup>12</sup>.

Atualmente, existem no mercado diversas formas farmacêuticas para serem administradas por via oral ou parenteral; por via oral temos em gotas, na dosagem de 0,2 mg/ml, em solução oral, 0,4 mg/ml (as versões gotas e solução geralmente são para uso pediátrico, podendo ser utilizado por adultos), em comprimidos, nas dosagens de 2 mg, 5 mg e 7,5 mg, e em cápsulas gelatinosas ou comprimidos associados a outras vitaminas, como vitamina E, ferro, ômega 3, e/ou vitaminas do complexo B, nessas associações o ácido fólico é encontrado em concentrações menores do que na suplementação isolada; Na forma parenteral temos os injetáveis por via intramuscular, intravenoso e subcutânea profunda, na concentração de 10 mg/ml, para uso adulto e pediátrico em ambiente hospitalar<sup>9</sup>.

O uso de formas farmacêuticas contemporâneas para crianças pode evitar problemas como dificuldade de deglutição, problemas de aderência com medicações desagradáveis,

problemas com excipiente e toxicidade, o que dificilmente ocorre com adultos. Com isso, muitos medicamentos para uso adulto são administrados *off-label* em crianças, gerando sérios riscos e complicações para sua saúde<sup>13</sup>.

A aceitabilidade da formulação facilita a adesão do tratamento e é considerado um fator de suma importância para alcançar os resultados pretendidos durante a farmacoterapia. Estudos mostram que a principal razão para recusa de tratamento em pacientes pediátricos é a aversão ao paladar, dessa forma, produtos relacionados ao cacau podem ser utilizados como intensificadores de palatabilidade, devido a sua maior aceitação pela população pediátrica, podendo ser considerada uma forma alternativa de formulações contemporâneas<sup>14</sup>.

Portanto o objetivo do presente estudo é criar uma forma farmacêutica contemporânea, com ácido fólico incorporado à base de chocolate, que dará origem a um chocolate medicamentoso, para uso pediátrico em pacientes que fazem tratamento oncológico, visando a facilitar a adesão e a qualidade do tratamento desses pacientes.

## Método

O desenvolvimento da formulação do chocolate medicamentoso contendo ácido fólico foi realizado no laboratório de nutrição e dietética do Centro Universitário Padre Anchieta - localizado no Campus Prof. Pedro. C. Fornari, seguindo – de acordo com as Boas Práticas de Manipulação descritas na RDC nº 67, de 8 de outubro de 2007<sup>15</sup>.

O chocolate medicamentoso, também conhecido como pastilha macia ou *soft*, é obtido por meio de base graxa, por ser imiscível em água e álcool, será utilizado como base edulcorada e flavorizada.

Para produção da base de chocolate, este foi obtido em forma de barra de chocolate ao leite 54%, adquirido da empresa ChocoNutra.

O princípio ativo utilizado foi o ácido fólico, adquirido na Drogaria Marcelo, da cidade de Itatiba. De acordo com a farmacopeia, seu aspecto físico é de um pó cristalino de cor amarela - alaranjada, considerado levemente hidrossolúvel na forma ácida e bastante solúvel na forma alcalina, devido a isso, possui maior estabilidade em meio alcalino<sup>16</sup>.

De acordo com a literatura da farmacopeia, foi decidido que a formulação seja testada e a função de cada uma deve ser citada como na tabela 1 abaixo:

| <b>Formulação</b>  | <b>Função</b>                          |
|--------------------|--|
| Ácido Fólico       | Princípio ativo                        |
| Base de chocolate  | Veículo                                |
| Óleo de milho      | Ajuste do ponto de fusão e viscosidade |
| Sorbitol           | Edulcorante/umectante                  |
| Goma               | Agente suspensor                       |
| Hidróxido de sódio | Alcalinizante                          |

**Tabela 1:** Formulações utilizadas na preparação do chocolate medicamentoso contendo ácido fólico e suas respectivas funções.

O método para incorporar a base de chocolate ao princípio ativo, será a fusão com aquecimento em banho maria, com a posterior incorporação do ativo e os adjuvantes farmacotécnicos, sendo eles, óleo de milho para ajuste de viscosidade, goma como agente suspensor, sorbitol como edulcorante e hidróxido de sódio como alcalinizante<sup>17</sup>.

### **Produção da base de chocolate**

O chocolate utilizado será ChocoNutra 54% de Cacau, da marca ChocoNutra<sup>®</sup>, obtido da distribuidora Via Pharma, que possui alto teor de cacau e é rico em amido resistente, além de ser 100% vegetal com soja, devido a isso, deve-se ter cuidado com o consumo por pessoas alérgicas à soja.

| Composição                    | Função                       |
|-------------------------------|------------------------------|
| Massa de cacau                | Intensificar o sabor         |
| Manteiga de cacau             | Gordura vegetal              |
| Polidextrose                  | Fibra alimentar / prebiótico |
| Maltitol                      | Edulcorante                  |
| Sucralose                     | Edulcorante                  |
| Lecitina de soja              | Emulsificante                |
| Poliglicerol poliricenooleato | Emulsificante                |
| Aroma artificial              | Aroma                        |

**Tabela 2:** Componentes da base de chocolate e suas respectivas funções, de acordo com a literatura da distribuidora ViaPharma.

|                     |                  |
|---------------------|------------------|
| Valor Energético    | 131 kcal / 550kJ |
| Carboidratos, onde: | 12,1g            |
| Polióis             | 10g              |
| Outros              | 2,1g             |
| Proteínas           | 1,3g             |
| Gorduras Totais     | 8,6g             |
| Gorduras Saturadas  | 5,9g             |
| Gorduras Trans      | 0g               |
| Fibras              | 3g               |
| Sódio               | 2,9mg            |

**Tabela 3:** Informações nutricionais da base de chocolate em relação a uma porção de 25g, obtidas na literatura da distribuidora ViaPharma, importa esclarecer que o valor diário depende das necessidades energéticas.

Como etapa inicial, para preparar a base de chocolate, este será aquecido em um béquer no banho maria (~50°C), no qual a temperatura da água deve ser suportável ao toque das mãos, sem que ela aqueça demais ou ferva. Será adicionado em pequenos pedaços, misturando com a bagueta de vidro, até derreter por completo<sup>16, 17</sup>.

Após a fusão completa, a mistura formada será retirada do banho maria e resfriada sob mistura constante, até atingir 45°C, controlando a temperatura com um termômetro, e formar uma mistura de constante homogeneidade, a qual ficará em repouso até ser utilizada posteriormente como base para a formulação.

Para a temperagem, o chocolate derretido sofrerá o processo de choque térmico, sempre controlando a temperatura com um termômetro.

### **Incorporação da base com ativo**

Após a pesagem de todos os componentes da formulação em vidro - relógio na balança analítica devidamente calibrada - serão adicionados em um béquer o princípio ativo e todos os outros coadjuvantes em papel manteiga, separadamente.

Em um gral, será triturado com pistilo o princípio ativo no hidróxido de sódio para solubilizar e alcalinizar, após, adicionar a goma e misturar. Os demais componentes serão misturados em um béquer com o auxílio de uma bagueta de vidro. Verter a mistura de pós que estava no gral para o béquer contendo os outros componentes e misturar até obter constante homogeneidade.

Após, verter a mistura do béquer que contém todos os componentes homogeneizados para o outro béquer contendo a base de chocolate fundida, misturando de modo a promover a completa dispersão e incorporação.

Quando estiver completamente homogênea toda a mistura, esta será vertida para as formas, e em seguida levada ao refrigerador até endurecer, em temperatura de 10°C por pelo menos 15 minutos, até atingir o ponto ideal.

Assim que finalizado o processo, o chocolate será retirado das formas e passará pelos testes necessários, físico-químicos, microbiológicos e sensorial.



### **Análises Físico – Químicas**

Serão realizadas análises de determinação de umidade e cinzas determinadas mediante ao método de Merril & Water. Além destes testes, será realizado o teste de determinação de pH, por meio do pHmetro de bancada, comparando aos valores padrões. Todos os testes serão realizados em triplicata<sup>18</sup>.

### **Análises Microbiológicas**

Para a análise microbiológica, será levado em consideração a RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001, da Anvisa, para chocolates e produtos similares em barra ou em forma de bombom; para estes, os testes são de *Salmonella sp* e *Coliformes* a 45°C, com repetição em triplicata<sup>19</sup>.

### **Formulações Testadas**

O desenvolvimento de todas as formulações foi realizado em dois laboratórios, uma parte no laboratório de química e outra parte no laboratório de nutrição e dietética, ambos situados no Centro Universitário Padre Anchieta, localizado no Campus Prof. Pedro. C. Fornari, seguindo as Boas Práticas de Manipulação descritas na RDC nº 67, de 8 de outubro de 2007<sup>15</sup>.

O desenvolvimento do chocolate medicamentoso foi feito em diversas etapas e formulações até atingir o ponto ideal em relação a consistência, sabor e concentração. Na tabela 1 e 2 é possível encontrar os insumos e materiais utilizados, respectivamente, durante todo o processo, alguns adquiridos no laboratório da própria faculdade e outros na Drogaria Marcelo da cidade de Itatiba.

| <b>Insumos</b>            | <b>Marca</b> |
|---------------------------|--------------|
| <b>Chocolate 54%</b>      | ChocoNutra   |
| <b>Chocolate ao leite</b> | Garoto       |
| <b>Ácido fólico</b>       | VPK farma    |
| <b>Óleo de milho</b>      | Liza         |
| <b>Goma xantana</b>       | Aqua mel     |
| <b>Sorbitol 70%</b>       |              |
| <b>Hidróxido de sódio</b> | Lafan        |
| <b>Óleo de coco</b>       | Copra        |
| <b>Glucose</b>            | Karo         |
| <b>Sucralose</b>          | Linea        |

**Tabela 1:** Insumos utilizados no desenvolvimento da formulação.

| <b>Materiais</b>                | <b>Marca</b>       |
|---------------------------------|--------------------|
| <b>Béquer</b>                   | Uniglas            |
| <b>Banho - maria</b>            | Fisaton            |
| <b>Balança analítica</b>        | Shimadzu           |
| <b>Termômetro infravermelho</b> | Minipa             |
| <b>Gral</b>                     | Chiarroto          |
| <b>Fogão</b>                    | Consul             |
| <b>Cumbuca de alumínio</b>      |                    |
| <b>Colher</b>                   | Disole inox Brasil |

**Tabela 2:** Equipamentos utilizados no desenvolvimento da formulação.

O primeiro teste foi desenvolvido no laboratório de química da faculdade e, como etapa inicial, foram pesados 10g do chocolate 54% cacau, adicionado 1,03g do óleo de milho e levados para derretimento em banho-maria a 50°C. Após, foram incorporados 0,5g da goma xantana, 0,2g do sorbitol em 4mL de água, adicionado o ácido fólico 0,0016g e 2 gotas do hidróxido de sódio, como mostra o teste 1 abaixo.

| Componentes        | Concentração |
|--------------------|--------------|
| Ácido Fólico       | 0,0016 g     |
| Chocolate 54%      | 10 g         |
| Óleo de Milho      | 1,03 g       |
| Goma Xantana       | 0,5 g (5%)   |
| Sorbitol           | 0,2 g (2%)   |
| Água               | 4 mL         |
| Hidróxido de Sódio | 2 gts        |

**Teste 1:** Primeira formulação utilizada sem a incorporação do princípio ativo.



**Imagem 1 - Teste 1**

A partir do resultado do primeiro teste, foram feitas algumas alterações nas concentrações do ácido fólico\* para 0,0012g e da goma xantana\*\* para 0,1g, como mostrado no teste 2 abaixo. Os métodos desenvolvidos foram os mesmos.

| <b>Componentes</b>        | <b>Concentração</b> |
|---------------------------|---------------------|
| <b>Ácido Fólico*</b>      | 0,0012 g            |
| <b>Chocolate 54%</b>      | 10 g                |
| <b>Óleo de Milho</b>      | 1,03 g              |
| <b>Goma Xantana**</b>     | 0,1 g (5%)          |
| <b>Sorbitol</b>           | 0,2 g (2%)          |
| <b>Água</b>               | 3 mL                |
| <b>Hidróxido de Sódio</b> | 2 gts               |

**Teste 2:** Segunda formulação testada com alterações nas concentrações.



**Imagem 2 - Teste 2**



**Imagem 3 - Teste**

Foi realizada uma nova formulação, na qual foram retiradas a goma xantana e a água, além disso, o agente alcalinizante foi substituído pelo carbonato de sódio, o óleo de milho pelo óleo de coco e aumentado a concentração do ácido fólico, como mostra o teste 3 abaixo:

| <b>Componentes</b>             | <b>Concentração</b> |
|--------------------------------|---------------------|
| <b>Ácido Fólico</b>            | 0,0230 g            |
| <b>Chocolate</b>               | 90,64 g             |
| <b>Óleo de coco</b>            | 1 g                 |
| <b>Carbonato de Sódio 0,5M</b> | 10 gts              |
| <b>Sorbitol 70%</b>            | 7,14 g              |

**Teste 3:** Terceira formulação, testada com a mudança do componente alcalinizante.



**Imagem 4 - Teste 3**

Na formulação 4, citada na tabela abaixo, alguns componentes foram retirados, mantendo somente o chocolate e o sorbitol. A concentração do ácido fólico\* foi alterada.

| <b>Componentes</b>   | <b>Concentração</b> |
|----------------------|---------------------|
| <b>Ácido Fólico*</b> | 0,0005g             |
| <b>Chocolate</b>     | 10,65 g             |
| <b>Sorbitol 70%</b>  | 0,7 g               |

**Teste 4:** Quarta formulação, testada com a retirada de alguns componentes testados anteriormente.



**Imagem 5 -Teste 4**

A partir da formulação de número 5, todos os testes foram desenvolvidos no laboratório de nutrição e dietética, onde foram utilizados somente componentes para o desenvolvimento da base de chocolate, sem o princípio ativo, mostrada na tabela abaixo.

| Componente    | Concentração |
|---------------|--------------|
| Chocolate 54% | 45 g         |
| Sucralose     | 5 gotas      |

**Teste 5:** Formulação somente com os componentes da base de chocolate.



**Imagem 6 - Teste 5**

No teste 6, a nova formulação foi feita com substituição da sucralose pela glucose 75%\*, adicionada em temperatura ambiente 20° no chocolate derretido à temperatura de 30° para atingir o ponto ideal do sabor, como citada na tabela abaixo.

| Componente            | Concentração |
|-----------------------|--------------|
| Chocolate 54%         | 45 g         |
| Glucose de milho 75%* | 5 g          |

**Teste 6:** Formulação com alteração no componente responsável pelo sabor doce da formulação.



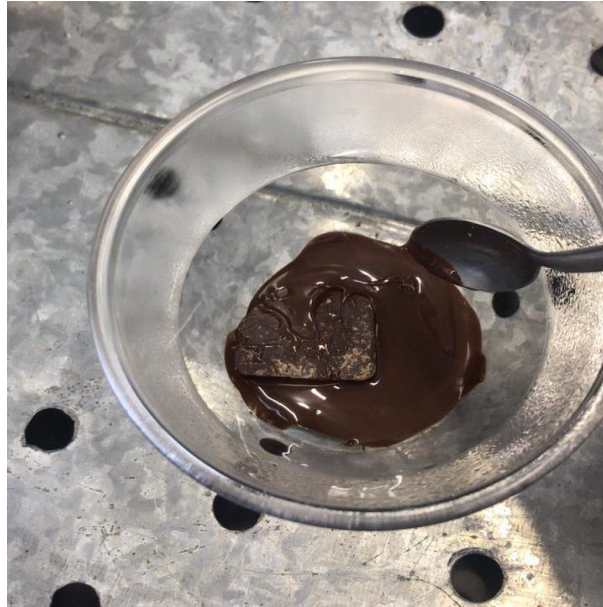
**Imagem 7 - Teste 6**

No teste 7 citado abaixo, foi alterada a temperatura da água e início da temperagem do chocolate.

| <b>Componentes</b>           | <b>Concentração</b> |
|------------------------------|---------------------|
| <b>Chocolate 54%</b>         | 45 g                |
| <b>Glucose de milho 75%*</b> | 5 g                 |

**Teste 7:** Formulação testada com chocolate aquecido e glucose em temperatura ambiente passando por temperagem.





**Imagem 8 - Teste 7**

O teste 8 foi feito com alteração na temperatura da glucose, que foi adicionada ao chocolate para ser incorporada durante o aquecimento, como citado abaixo:

| <b>Componentes</b>          | <b>Concentração</b> |
|-----------------------------|---------------------|
| <b>Chocolate 54%</b>        | 45g                 |
| <b>Glucose de milho 75%</b> | 5 g                 |

**Teste 8:** Formulação testada com chocolate e glucose aquecidos.



**Imagem 9 - Teste 8**

A próxima formulação foi feita para verificar estrutura e ponto da temperagem do chocolate, com alteração do chocolate 54% para chocolate ao leite, como citado abaixo:

| Componentes        | Concentração |
|--------------------|--------------|
| Chocolate ao leite | 26g          |

**Teste 9:** Derretimento do chocolate ao leite para testar alteração na estrutura.



**Imagem 10 - Teste 9**

A formulação 10 foi testada com o chocolate 54%, porém adicionado o sorbitol\*, para atingir o ponto e doçura ideal.

| Componentes   | Concentração |
|---------------|--------------|
| Chocolate 54% | 45,25 g      |
| Sorbitol*     | 2,5 mL       |

**Teste 10:** Formulação com chocolate 54% e sorbitol.



**Imagem 11 - Teste 10**

O teste citado abaixo, de número 11, foi realizado com chocolate ao leite e chocolate 54%, ambos aquecidos e passados pelo processo de temperagem, no qual a temperatura do chocolate no aquecimento foi de 30°C e a temperatura da água para o choque térmico foi de 20°C, a fim de atingir o ponto e sabor ideal.

| Componentes        | Concentrações |
|--------------------|---------------|
| Chocolate ao leite | 20 g          |
| Chocolate 54%      | 20 g          |

**Teste 11:** Formulação com chocolate ao leite e chocolate 54%.

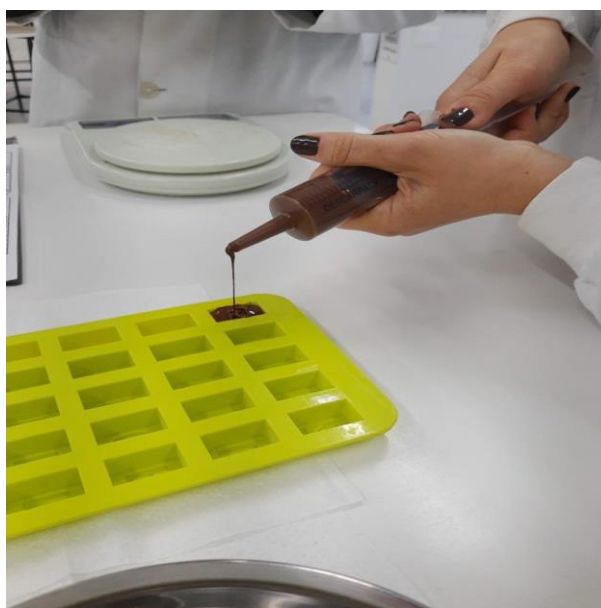


**Imagem 12 - Teste 11**

A partir da formulação 11, foi desenvolvida uma nova formulação, como mostra a tabela abaixo, com a base de chocolate ao leite e chocolate 54% feita anteriormente, porém com concentrações diferentes e com a incorporação do ácido fólico.

| Componentes        | Concentrações |
|--------------------|---------------|
| Chocolate ao leite | 24 g          |
| Chocolate 54%      | 24 g          |
| Ácido Fólico       | 0,004g        |

**Teste 12:** Desenvolvimento da base de chocolate com o princípio ativo



**Imagem 13 - Teste 12**

## Resultados

### Desenvolvimento da formulação

A formulação foi feita de acordo com a tabela teste 1, na qual o ácido fólico foi solubilizado em água à temperatura ambiente, com sorbitol e goma xantana, depois da solubilização foi adicionado o agente alcalinizante, porém o pH foi a 14, mesmo utilizando pequena quantidade, essa solução alcalina foi incorporada ao chocolate

derretido em banho-maria a uma temperatura de 50°, o chocolate incorporado foi acondicionado em forma de silicone e armazenado em geladeira por 15 minutos, mas o tablete apresentou uma consistência pastosa e gelatinosa, como apresentado na imagem 1; desta forma, no teste 2, foram reduzidos o ácido fólico e a goma xantana, e utilizado a mesma metodologia demonstrado na imagem 2, porém o resultado final ainda ficou espesso e desagradável, visualizado na imagem 3. Seguindo para o teste 3, houve algumas mudanças significativas, o óleo de milho foi substituído por óleo de coco, o agente alcalinizante Hidróxido de sódio foi substituído pelo Carbonato de sódio, o pH chegou a 8, a água e a goma xantana foram retirados, o ácido fólico foi solubilizado no sorbitol e incorporado ao chocolate da mesma forma dos testes anteriores, o resultado final ainda ficou pouco firme e oleoso ao toque, ficando com aspecto de massa de modelar como visto na imagem 4.

Chegando ao teste 4, foram retirados da formulação o óleo de coco, o carbonato de sódio e o sorbitol, obteve-se o aspecto desejável como de uma barra de chocolate, sem estar aerada ou oleosa, como é possível visualizar na imagem 5. A partir do teste 5, o desenvolvimento da formulação foi realizado no laboratório de nutrição e dietética, tendo como foco o teste sensorial realizado pelos integrantes do grupo. Como a quantidade de princípio é pequena, não altera o pH da solução, então os testes que seguiram foram para ajustar o sabor do chocolate medicamentoso 54% com o objetivo de torná-lo mais doce e agradável para uma criança, para isso foi testado o sucralose, mas após o envase da forma o tablete apresentou um sabor levemente amargo e um “*after tast*” (gosto residual) acentuado, a consistência permaneceu igual, como é possível observar na imagem 6.

No teste 6, a sucralose foi substituída por glucose de milho, a incorporação foi feita com o chocolate derretido em temperatura de 30° e a glucose em temperatura ambiente, porém ainda não mascarava totalmente o amargo e o tablete ficou com aspecto arenoso na boca, notando-se alteração na estrutura do chocolate, na imagem 7, visualmente, não apresenta diferença, porém foi possível observar no teste sensorial realizado pelos integrantes do grupo. Para o teste 7, a concentração da glucose foi mantida, mas a incorporação foi feita durante o derretimento do chocolate, com os dois produtos aquecidos juntos, como demonstrado na imagem 8, contudo foi obtido o mesmo resultado da formulação anterior e o chocolate ficou opaco. No teste seguinte, conforme tabela - teste 8, foi iniciado o teste de temperagem, a glucose foi incorporada junto com o chocolate no banho-maria, mas a

água foi aquecida a 92° no fogão e a panela foi retirada do fogo, o chocolate já apresentava estrutura consistente durante o aquecimento com a glucose, o choque térmico foi feito com água a temperatura fria, 18,5°, com o choque o chocolate começou a solidificar ainda na tigela, como é possível visualizar na imagem 9, a perda foi de 33% do conteúdo nos utensílios e houve dificuldade para moldar na forma. Os testes seguintes, além de ajustes no sabor, sofreram ajustes na temperagem, o chocolate precisava ficar firme ao toque, com brilho e macio ao contato com a boca.

No teste 9, o chocolate utilizado foi o ao leite, para verificar se a estrutura do chocolate puro era prejudicada após a temperagem, a temperatura da água quente foi de 87° e a da água fria 18°, a aparência do chocolate derretido foi mais líquido do que no teste anterior, como é visível na imagem 10, após o choque térmico, o chocolate foi vertido na forma em uma temperatura de 21, 5°. A estrutura atingiu o aspecto desejado, porém o sabor ficou muito adocicado e enjoativo. No teste seguinte foram utilizados o chocolate 54% e o sorbitol líquido, as temperaturas das águas utilizadas foram as mesmas, porém o aspecto arenoso voltou com a adição do sorbitol, que alterou a estrutura do chocolate, e o sabor ficou amargo.

O teste 10 foi realizado com uma mistura de 50% do chocolate a 54% cacau e 50% do chocolate ao leite, foi feita a temperagem como nos últimos testes, o resultado foi uma base de chocolate doce, não enjoativo, brilhante, com a dureza e palatabilidade desejáveis, sendo possível observar na imagem 12. No teste seguinte foi incorporado o ácido fólico na base de chocolate, no qual não houve nenhuma mudança na sua estrutura, que se manteve com as mesmas características do teste realizado anteriormente; foi utilizado uma seringa de 60 ml para padronizar a quantidade em cada poço da forma, como demonstrado na imagem 13.

O lote para testes foi realizado conforme o último teste, o chocolate medicamentoso foi vertido a uma forma de silicone contendo poços com 3,7 cm de largura e 0,00 de altura, em cada um deles foi colocado aproximadamente 5ml do chocolate utilizando-se de uma seringa de 60ml. Foram preparados 213, 569 g de chocolate, considerando que a perda do produto durante o preparo é a cerca de 10%. Cada tablete medicamentoso deve conter 0,4 mg de ácido fólico, portanto 0,0667 mg em cada g do produto, seguindo o cálculo para determinação da quantidade de ácido fólico a ser utilizado, foram feitos cálculos usando regra de 3 simples.

### **Cálculo 1**

6 g chocolate - 0,4 mg de ácido fólico

1 g chocolate - x mg de ácido fólico

$$6x = 1 \cdot 0,4$$

$$x = 0,4 / 6$$

x = 0,0667 mg de ácido fólico em cada g do chocolate

### **Cálculo 2**

1 g chocolate - 0,0667 mg ácido fólico

213,569 g chocolate - x mg de ácido fólico

$$1x = 213,569 \cdot 0,0667$$

x = 14,245 mg de ácido fólico total utilizado, resultado posteriormente convertido em g para ser pesado em balança analítica, sendo dividido por 1000, obtendo resultado de 0,014245 g

Foram feitos 32 tabletes de chocolate medicamentoso e houve uma perda de 21,538 g, que equivale a 10% do total preparado.

Todos os dados foram anotados em tabelas para seguir o padrão durante o preparo. A tabela a seguir é da preparação para os testes.

| <b>Ingredientes:</b>  | <b>Quantidade:</b>   | <b>Peso limpo<br/>tigela e talheres:</b>       | 146,497 g            |
|---|--|--|----------------------|
| Chocolate 54%   | 106,820 g  | <b>Peso com resíduo<br/>tigela e talheres:</b> | 192,043 g            |
| Chocolate ao leite  | 106,748 g  |  |                      |
| Ácido fólico  | 0,014245 g   | <b>Peso tabletes<br/>prontos:</b>              | 6,17 g<br>Peso médio |
|   |  |  |                      |
| Total   | 213,5822 g   |  |                      |
| <b>Aprovado</b> <b>X</b>  | <b>Conclusão:</b><br>Houve perda esperada de 21,5385g, valor equivalente a 10% do total preparado. |  |                      |
| <b>Reprovado</b>  |  |  |                      |
| <b>Como preparamos:</b><br>Todos os ingredientes foram pesados separadamente, os chocolates foram colocados em uma tigela e deixados em banho-maria com água a 80°C até total derretimento, o chocolate derretido atingiu a temperatura de 42°C, foi retirado do banho quente, acrescido o ácido fólico, e colocado em banho-maria frio, com água a 18°C para o choque, ao atingir 30°C foi vertido para a forma e levado ao refrigerador por 10 minutos. |  |  |                      |

### Testes Organolépticos

O teste organoléptico é o primeiro empregado no controle de qualidade, nesse ensaio é possível avaliar os aspectos físicos e estéticos do produto (Controle físico Químico e Qualidade de Medicamentos - Gil, E. S.), porém não descarta a necessidade de que sejam feitos outros testes. Foram feitas avaliações nos dias 1, 8 e 15, para que fosse possível acompanhar o produto durante o armazenamento, a fim de identificar qualquer alteração no produto após o seu preparo.



| Testes                | Temperatura Ambiente (25°C) |                |                | Armazenado em Refrigerador (8°C) |                |                |
|-----------------------|-----------------------------|----------------|----------------|----------------------------------|----------------|----------------|
|                       | Dia 1                       | Dia 8          | Dia 15         | Dia 1                            | Dia 8          | Dia 15         |
| <b>Organolépticos</b> |                             |                |                |                                  |                |                |
| <b>Cor</b>            | Característico              | Característico | Característico | Característico                   | Característico | Característico |
| <b>Consistência</b>   | Derretimento ao toque       | Firme          | Firme          | Firme                            | Firme          | Firme          |
| <b>Odor</b>           | Característico              | Característico | Característico | Característico                   | Característico | Característico |
| <b>Aspecto</b>        | Com brilho                  | Com brilho     | Com brilho     | Com brilho                       | Com brilho     | Com brilho     |
| <b>Forma</b>          | Regular                     | Regular        | Com brilho     | Regular                          | Regular        | Com brilho     |

### Determinação de pH

Para determinação de pH, em cada teste foram utilizadas 2 amostras de chocolate, com peso de  $\approx 6$  g cada, a primeira armazenada em temperatura ambiente ( $\approx 25^\circ\text{C}$ ) e a segunda em refrigerador ( $8^\circ\text{C}$ ). O chocolate foi submetido à diluição em água deionizada, aquecida a  $35^\circ\text{C}$  em placa aquecedora de bancada (Quimis), na proporção de 1:10, o pHmetro de bancada (MS TECNOPON) foi calibrado com as soluções tampão pH 4 e pH 7. Com a amostra na temperatura ambiente, o eletrodo foi inserido no béquer para a avaliação do pH. Foram feitos testes nos dias 1, 8 e 15, após o preparo para acompanhamento da estabilidade do pH.

| Determinação de pH | Amostra Ambiente | Amostra Refrigerada |
|--------------------|------------------|---------------------|
| Dia 1              | pH 6,00          | pH 6,00             |
| Dia 8              | pH 6,09          | pH 6,09             |
| Dia 15             | pH 6,20          | pH 6,16             |

**pH Médio**  $6,09 \pm 0,081$



**Imagem 14 - Teste de pH**

### **Desintegração**

O teste de desintegração foi realizado no desintegrador de comprimidos de 1 prova modelo 301/AC (Ethick technology), utilizando 06 tabletes do chocolate medicamentoso enriquecido com ácido fólico em formato especial, porém com o mesmo peso de 6 g, sendo 03 deles em temperatura ambiente (25°C) e os outros 03 em temperatura de geladeira (8°C).

Para que o teste fosse realizado com o pH salivar mais próximo ao de uma criança em tratamento oncológico, que varia entre pH 8,1 e pH 8,34, a saliva artificial preparada precisou de uma correção com o trietanolamina para atingir o pH 8, a temperatura da saliva artificial foi de 37°C, que demorou em média 3 min e 30 seg para a desintegração total do chocolate, como mostrado na tabela abaixo.

| <b>Temperatura ambiente (25°C)</b> |              |              | <b>Temperatura de geladeira (8°C)</b> |              |              |
|------------------------------------|--------------|--------------|---------------------------------------|--------------|--------------|
| Poço 01                            | Poço 02      | Poço 03      | Poço 04                               | Poço 05      | Poço 06      |
| 3 min 30 seg                       | 3 min 30 seg | 3 min 30 seg | 3 min 49 seg                          | 3 min 49 seg | 3 min 49 seg |

**Tempo Médio** 3 min 49 seg  $\pm$  0,005



**Imagem 15 - Preparação para teste de desintegração**



**Imagem 16 - Teste de desintegração**

### **Teor por Espectrofotometria**

O teste de teor seria feito por aparelho de espectrofotômetro da marca Bioespectro, mas como o branco (chocolate sem ácido fólico) após diluição na proporção 1:10 apresentou aspecto muito turvo, não foi possível fazer a medição, seriam necessárias muitas diluições até se obter uma solução límpida, capaz de verificar a interação do material com a luz,

por meio da absorvância, mas como a dosagem do ácido fólico é baixa (0,4 mg / tablete), o espectrofotômetro não seria sensível com tantas diluições, sugere-se a pesquisas futuras que sejam feitas dosagem de teor mediante métodos mais sensíveis, como HPLC.



**Imagem 17 - Diluição para Teste de Teor**

### **Peso Médio**

Para obter-se o peso médio, foram pesados em balança semi analítica da marca Shimadzu 18 tabletes de chocolate enriquecido com ácido fólico e anotados. Foi determinado o peso médio utilizando-se do quociente da somatória dos pesos individuais dividido pelo número de amostras. O resultado deve ser o menor possível para que se atinja maior uniformidade do envase. O valor obtido foi de 6,174 g, apresentando um desvio de 2,9% em relação ao peso esperado de 6 g, como apresentado na tabela abaixo, demonstrando uma boa uniformidade.

**Peso de cada tablete**

|         |         |         |         |
|---------|---------|---------|---------|
| 6,275 g | 6,419 g | 6,493 g | 6,184 g |
| 6,397 g | 6,071 g | 5,904 g | 6,110 g |
| 6,247 g | 6,025 g | 6,000 g | 6,156 g |
| 5,880 g | 6,210 g | 6,187 g | 6,237 g |

**Peso Médio** 6,186g  $\pm$  0,175

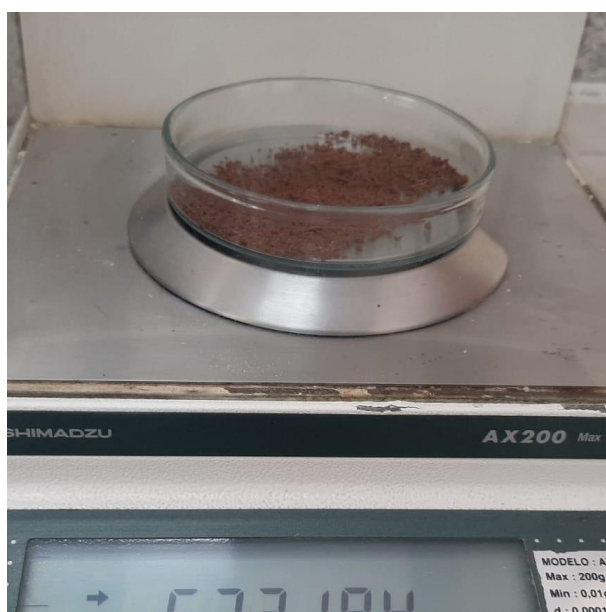
### Determinação de Umidade e Cinzas

Para determinação de umidade foram feitas 3 amostras contendo 2g do chocolate medicamentoso ralado em cada placa de petri de vidro, as amostras foram submetidas em estufa (marca) à temperatura de 105°C por 3 horas, após esse período as amostras ficaram em dessecador (marca) até atingir temperatura ambiente para serem pesadas, esse procedimento foi repetido até atingir peso constante, conforme (IAL, 2008).

#### Umidade

| Amostra | Peso da amostra úmida | Peso placa + amostra úmida | Peso placa + amostra seca | Peso amostra seca | Peso da placa vazia | Umidade (%) | Sólidos totais (%) |
|---------|-----------------------|----------------------------|---------------------------|-------------------|---------------------|-------------|--------------------|
| 1       | 2,0450 g              | 45,9408 g                  | 45,9195 g                 | 2,0237 g          | 43,8958 g           | 1,04 %      | 98,96 %            |
| 2       | 2,0657 g              | 53,2506 g                  | 53,2255 g                 | 2,0406 g          | 51,1849 g           | 1,21 %      | 98,79 %            |
| 3       | 2,0661 g              | 57,2437 g                  | 57,2144 g                 | 2,0368 g          | 55,1776 g           | 1,41 %      | 98,59 %            |

**Umidade Média** 1,21% ± 0,185



**Imagem 18 - Teste de Umidade**

Para determinação de cinzas, o teste foi realizado com 3 amostras contendo 5 g de chocolate medicamentoso ralado e pesado, colocadas em cadinhos, queimadas em bico de bunsen e posteriormente levadas à estufa (marca) com temperatura de 550°C por 3 horas, após esse período as amostras ficaram em dissecador até atingir temperatura ambiente, foram pesadas e novamente levadas à estufa, esse procedimento foi repetido até ser atingido o peso constante, conforme (IAL,2008).

### Cinzas

| Amostra | Peso da amostra úmida | Peso cadinho + amostra úmida | Peso cadinho + amostra seca | Peso amostra seca (cinza) | Peso do cadinho vazio | Cinzas (%) |
|---------|-----------------------|------------------------------|-----------------------------|---------------------------|-----------------------|------------|
| 1       | 5,0155 g              | 70,6486 g                    | 65,7067 g                   | 0,0436 g                  | 65,6631 g             | 0,8693 %   |
| 2       | 5,0229 g              | 66,3889 g                    | 61,4385 g                   | 0,0725 g                  | 61,3660 g             | 1,4433 %   |
| 3       | 5,0274 g              | 60,9282 g                    | 55,9729 g                   | 0,0721 g                  | 55,9008 g             | 1,4341%    |

Média de Cinzas 1,443%  $\pm$  0,328



Imagem 19 - Preparação para Teste de Cinzas



**Imagem 20 - Teste de Cinzas**

### **Análises microbiológicas**

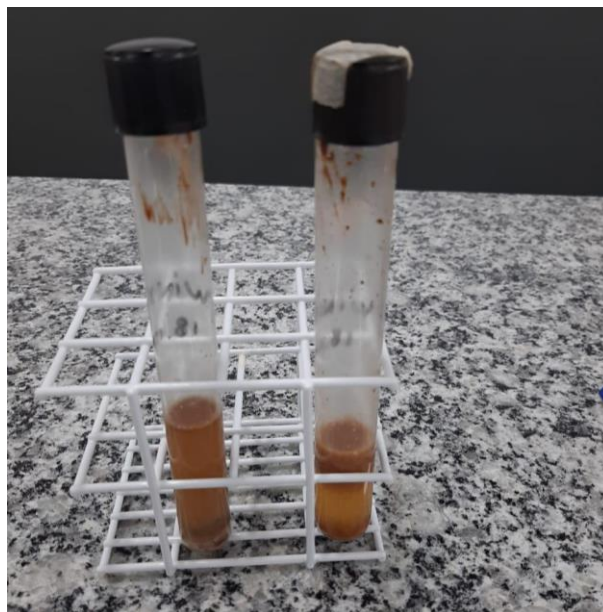
O preparo da formulação de bancada utilizado para todos os testes, inclusive os microbiológicos, foi realizado seguindo as normas da Cartilha de Boas Práticas para Serviços de Alimentação<sup>31</sup>, seguiu-se todos os cuidados com higiene tanto do ambiente quanto dos utensílios e pessoal envolvidos. Foram separadas 2 amostras de 1g cada para pesquisa de *Salmonella sp.* e *Coliformes totais* (enterobactéria), como proposto na legislação. Após o preparo do chocolate medicamentoso com ácido fólico, as amostras para pesquisa de contaminação foram levadas ao laboratório microbiológico do Centro Universitário. As amostras foram diluídas na proporção de 1:10; para pesquisa de Salmonella 1g da amostra foi transferida para um tubo contendo 9ml de Caldo Tetracionato, já para Coliformes, a amostra foi transferida para um tubo com Caldo BHI, toda a transferência foi feita com o bico de bunsen aceso, com pinça e equipamentos esterilizados. As amostras ficaram em estufa a uma temperatura de 37°C por um período de 24 horas. Após esse período, a amostra diluída no Tetracionato foi cultivada em placas contendo Ágar SS, já a diluída no Caldo BHI foi cultivada em placas contendo Ágar MacConkey, ambas as amostras foram cultivadas ao lado do bico de bunsen com alça de semeadura descartável de 10µl para cada placa, as duas pesquisas foram feitas em triplicata. As 6 placas (3 para cada pesquisa) ficaram acondicionadas em estufa na mesma temperatura do enriquecimento, foram feitas avaliações a cada 24 horas, mas em um período de 48 horas não houve crescimento bacteriano em nenhuma das placas cultivadas.

### Testes Microbiológicos

| Meio de Cultura              | Espécie                  | Resultado | Valor de Referência |
|------------------------------|--------------------------|-----------|---------------------|
| Caldo tetracionato + Ágar SS | <i>Salmonella spp.</i>   | Negativo  | Ausência em 25g     |
| Caldo BHI+Ágar McConkey      | <i>Coliformes totais</i> | Negativo  | Máximo 102/g        |



**Imagem 21 - Diluição em Caldos para Testes Microbiológicos**

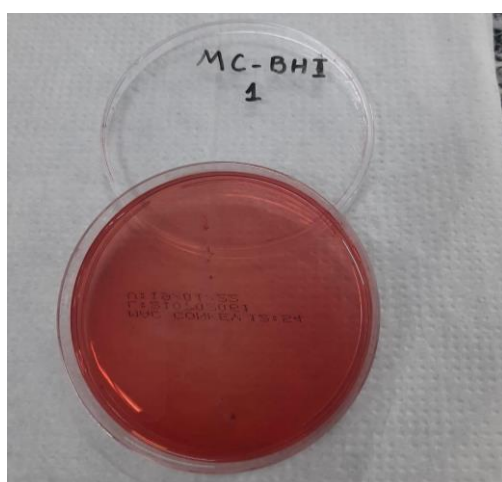


**Imagem 22 - Caldos BHI e Tetracionato**

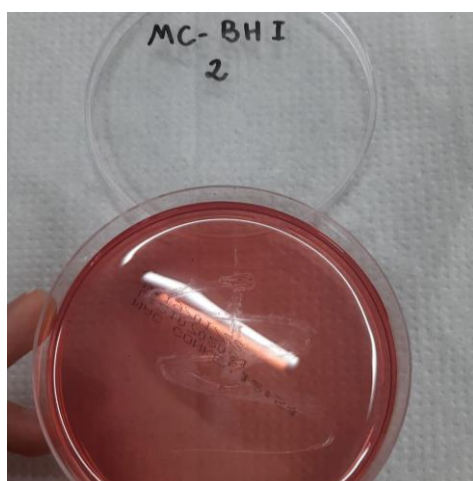




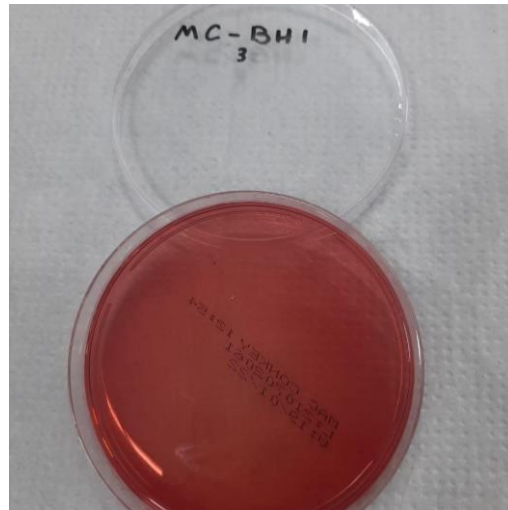
**Imagem 23 - Placas armazenadas em estufa**



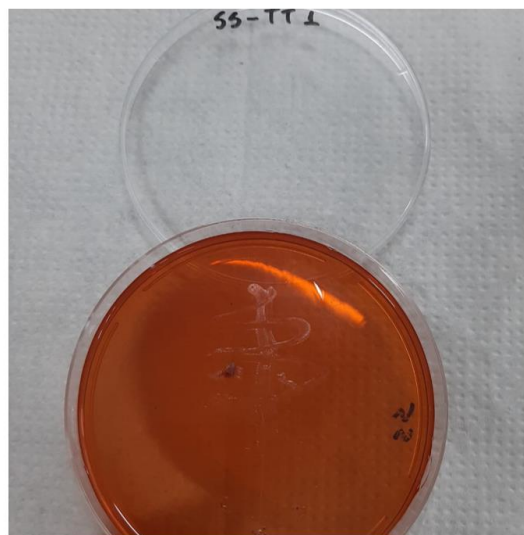
**Imagem 24 - Placa 1 Mc Conkey - BHI sem crescimento bacteriano**



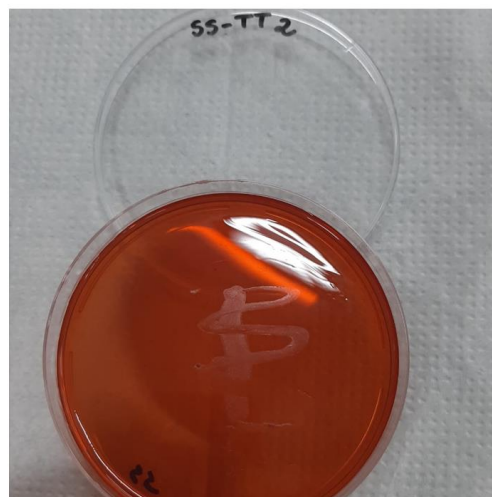
**Imagem 25 - Placa 2 Mc Conkey - BHI sem crescimento bacteriano**



**Imagem 26 - Placa 3 Mc Conkey - BHI sem crescimento bacteriano**



**Imagem 27 - Placa 1 Ágar SS – Tetratonato sem crescimento bacteriano**



**Imagem 28 - Placa 2 Ágar SS – Tetratonato sem crescimento bacteriano**

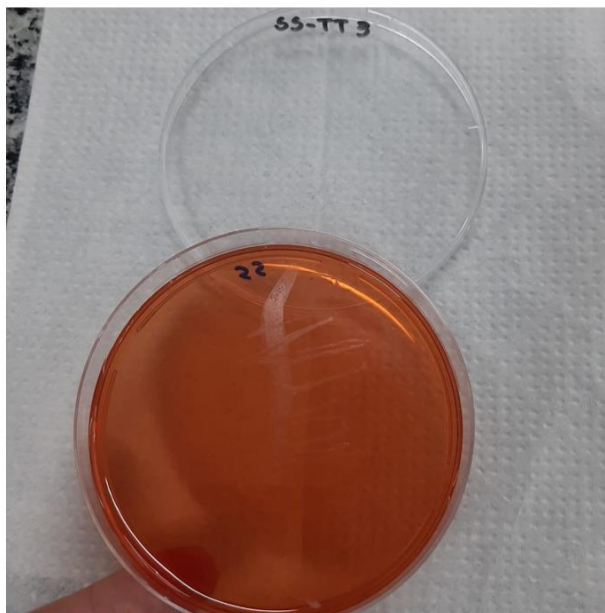


Imagem 29 - Placa 3 Ágar SS – Tetrionato sem crescimento bacteriano

## Discussão

Segundo o estudo de Batchelor et al., por volta dos 4 anos de idade, fatores como odor, textura e palatabilidade de medicamentos tornam-se relevantes para a aceitação ou recusa de determinadas formas farmacêuticas para o público pediátrico<sup>21</sup>. Dito isso, a boa aceitação do tratamento farmacoterapêutico pediátrico está diretamente relacionada à disponibilidade de novas formulações adaptadas a este público infantil, uma vez que estes pacientes costumam recusar formulações que apresentem sabor desagradável<sup>21</sup>. Neste sentido, o chocolate foi utilizado como base para a formulação, com o objetivo de trazer uma melhor palatabilidade e aceitação do medicamento.

A formulação, com a goma e sucralose, diferente do resultado descrito no livro Guia Prático da Farmácia Magistral<sup>18</sup>, não apresentou o resultado esperado, necessitando de ajustes para a obtenção de aspecto e sabor desejáveis.

Do início ao fim dos testes, foi constatada a importância do sabor e textura da base e também a relevância de alguns componentes utilizados. Como não foi obtido o resultado descrito no primeiro ensaio, houve a necessidade de realizar alterações, sendo estas essenciais para determinação da base final, chegando-se a uma formulação firme e consistente, que não utilizou muitos dos componentes testados nas fases anteriores.

No teste de bancada, buscou-se avaliar a compatibilidade da base de chocolate com o princípio ativo e os demais coadjuvantes, a fim de definir as respectivas concentrações empregadas na formulação. A princípio não houve alteração física e o sabor prevaleceu o mesmo.

A partir dos resultados obtidos por meio das análises realizadas, foi feita a comparação com resultados descritos na literatura. Em relação ao pH, a média dos valores obtidos das amostras em temperatura ambiente e refrigeradas no 1º, 8º e 15º dia foi de 6,09, valor aproximado do obtido no estudo de Battiston et al. (2016)<sup>2</sup>, e dentro dos parâmetros determinados pela legislação. Por outro lado, valores superiores foram encontrados quando comparados ao estudo de Da Cruz et. al. (2020)<sup>25</sup> com chocolate diet e amargo. Diante disso, percebemos que a análise do pH dos alimentos é muito importante, pois a maior parte dos microrganismos crescem em valores de pH de acima de 7,0 e abaixo de 4,0.

Para determinar o tempo de desintegração, foi utilizada uma saliva artificial preparada com pH 8,0, compatível com o estudo de Gonçalves et al. (2017)<sup>26</sup>, no qual foram analisadas as alterações da saliva de pacientes submetidos a radioterapia e quimioterapia. O tempo de desintegração variou entre 3 minutos e 30 segundos e 3 minutos e 49 segundos, na amostra em temperatura ambiente e refrigerada, respectivamente.

Em relação a determinação de umidade, obteve - se uma média de 0,044%, valor aproximado do encontrado no estudo de Marques et. al. (2018)<sup>24</sup>, com chocolate amargo, além de que, conforme legislação, está dentro do padrão, que é no máximo de 3% de umidade. Os chocolates podem absorver umidade durante o preparo, transporte ou armazenamento, resultando em excesso, e ao consumidor pode causar uma percepção desagradável.

Após o teste de determinação de cinzas, obtivemos uma média de 1,44% de cinzas e segundo a resolução CNNPA nº 12, de 1978, a referência de cinzas para chocolates é de 2,5%, ou seja, o valor encontrado está de acordo com a legislação<sup>27</sup>.

O controle microbiológico em alimentos é realizado, principalmente, por meio da pesquisa de micro-organismos indicadores que, quando presentes, podem fornecer informações sobre as condições sanitárias da produção, do processamento, ou

armazenamento, assim como a possível presença de patógenos e estimativa da vida de prateleira do produto<sup>28,29</sup>.

Levantamentos epidemiológicos realizados em vários países situam as *Salmonellas spp.* entre os agentes patogênicos mais frequentemente encontrados em surtos de toxinfecção de origem alimentar, tanto em países desenvolvidos, como em desenvolvimento. De acordo com os resultados, a formulação apresentou ausência de *Salmonella sp.*, ou seja, o teste estava dentro dos limites recomendados pela legislação<sup>30</sup>, o que em comparação com o estudo de Reis, 2015<sup>32</sup>, onde foi realizada uma avaliação microbiológica de produtos a base de chocolate, está de acordo.

Quanto aos coliformes totais, a formulação também apresentou ausência destes, indicando que a formulação está dentro dos valores recomendados pela legislação, que nos mostra a referência de no máximo 102 por grama do produto<sup>31</sup>. Sousa, et al., 2010, encontrou em seu estudo de análise de bombons valores acima do recomendado pela legislação e, neste caso, este resultado indica a necessidade maior de controle higiênico-sanitário na produção da amostra.

## Referências

1. Bittencourt BF, Henrique AL, Roberto OM. O consumo materno de ácido fólico durante a gestação e seus efeitos a longo prazo no fígado da prole: uma revisão sistemática. Rev. Bras. Saude Mater. Infant. [Internet]. 2017 Mar [cited 2021 Apr 03];17(1):7-15. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/1806-93042017000100002>.
2. Battiston CSZ, et al. Caracterização físico-química e atividade antioxidante de chocolate branco com extrato de erva-mate. Revista virtual de Química. 2016:1878-88.
3. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ, Henderson GR & Dale. Farmacologia. 8ª edição. Rio de Janeiro, Elsevier, 2016.808 p.
4. Ramírez-Cheyne J. Charaterization of prenatal exposure variables in a group of children aged 0-5 years with congenital heart defect treated in Cali, Colombia. The importance of folic acid. rev.fac.med. [Internet]. 2020 Mar [cited 2021 Apr 03];68(1):34-43. Disponível em: <https://doi.org/10.15446/revfacmed.v68n1.69885>.
5. Katzung BG, Trevor AJ. Farmacologia Básica e Clínica, 13 ed., McGraw-Hill/Artmed, Porto Alegre, 2017 - Biblioteca Virtual Unianchieta.

6. Nagao T, Hirokawa M. Diagnosis and treatment of macrocytic anemias in adults. *J Gen Fam Med.* 2017 Apr 13;18(5):200-204. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29264027/>.
7. Brunton LL, Chabner BA, Knollmann BC. Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 12ª edição. Rio de Janeiro, McGraw-Hill, 2012,2112 p.
8. Zago MA, Falcão, RP, Pasquini, R. Tratado de Hematologia. 1a ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2013. 1064 p.
9. Medeiros RRS, Nóbrega MM, Santos MLL, Vieira TG. Percepção de gestantes acerca da importância do uso do ácido fólico e sulfato ferroso e o papel assistencial da enfermagem na atenção primária. *Rev. Temas em Saúde.* [internet] 2016 [cited 2021 Mar 20]; 16(4). Disponível em: <https://temasemsaude.com/wp-content/uploads/2017/01/16419.pdf>
10. (Manual Farmacêutico - Disponível em <https://aplicacoes.einstein.br/manualfarmaceutico/Paginas/RelacaoMedicamentos.aspx?tipo=&filtro=A&busca=%22%22&itemID=ACIDO+FOLICO> consultado em 21 de março de 2021).
11. Hoffbrand, AV. Fundamentos em Hematologia/ A. V. Hoffbrand. P. A. H. Moss. J E. Pettit: Tradução: Renato Failace. 5º Ed. Porto Alegre: Artmed, 2008
12. Tandon S, Moulik NR, Kumar A, Mahdi AA, Kumar A. Effect of Pre-treatment Nutritional Status, Folate and Vitamin B12 Levels on Induction Chemotherapy in Children with Acute Lymphoblastic Leukemia. *Indian Pediatr.* 2015 May;52(5):385-9. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26061923/>.
13. Thabet Y, Klingmann V, Breikreutz J. Drug Formulations: Standards and Novel Strategies for Drug Administration in Pediatrics. *J Clin Pharmacol.* 2018 Oct;58 Suppl 10:S26-S35. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30248193/>.
14. Gerrard SE, Walsh J, Bowers N, Salunke S, Hershenson S. Innovations in Pediatric Drug Formulations and Administration Technologies for Low Resource Settings. *Pharmaceutics.* 2019 Oct 8;11(10):518. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31597277/>.
15. Synaridou, M.S., Morichovitou, A.K. & Markopoulou, C.K. Innovative Pediatric Formulations: Ibuprofen in Chocolate-Coated Honey Core. *J Pharm Innov,* 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12247-019-09389-1>.

16. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BR). Resolução da Diretoria Colegiada no 67, de 8 de outubro de 2007. Dispõe sobre boas práticas magistrais e oficinais para uso humano em farmácias. Diário Oficial da União. 2007.
17. Farmacopéia Brasileira, volume 1. 6ª Ed. Brasília, 2010b. Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
18. Ferreira, Anderson. Guia Prático de Farmácia Magistral. 4º ed. Pharmabooks: 2011.
19. Tabela brasileira de composição de alimentos / NEPA – UNICAMP.- 4. ed. rev. e ampl. Campinas: NEPA- UNICAMP, 2011. 161 p.
20. BRASIL, Ministério da saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Resolução nº 12 de 02 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico Sobre Os Padrões Microbiológicos para Alimentos. Diário Oficial. Brasília, DF.
21. Batchelor HK, Marriott JF. Formulations for children: problems and solutions. Br J Clin Pharmacol. 2015; 79(3):405-18.
22. Zajicek A, Fossler MJ, Barrett JS, Worthington JH, Ternik R, Charkoftaki G et al. A report from the pediatric formulations task force: perspectives on the state of child-friendly oral dosage forms. The Aaps Journ. 2016; 15(4):1072-81.
23. INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos Físico-químicos para Análises de Alimentos. 4ª ed. (1ª Edição digital), 2008. 1020 p.
24. Marques JH. Determinação da composição centesimal de chocolate meio amargo. Revista Destaques Acadêmicos, v. 10, n. 4, 2018.
25. Da Cruz LM, Guimarães RCA. Controle de qualidade de bombom funcional acrescido de biomassa de banana-verde e geleia de pitanga. Multitemas, p. 163-180, 2020.
26. Gonçalves LMVC. Avaliação do pH salivar em pacientes submetidos a radioterapia à região de cabeça e pescoço. 2015. Tese de Doutorado. [sn].
27. ANVISA; Resolução - CNNPA nº 12, de 1978, publicado no Diário Oficial da União de 24 de julho de 1978. Disponível em [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br): Acessado em 23 de outubro de 2021.
28. Franco BDGM, Langraf M. Microbiologia dos Alimentos. São Paulo: Atheneu, 1996.
29. Tamanini R, Silva LCC, Monteiro AA, Magnani DF, Barros MAF, Beloti V. Avaliação da qualidade microbiológica e dos parâmetros enzimáticos da pasteurização de

leite tipo “C” produzido na região norte do Paraná. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 28, n. 3, p. 449-454, jul./set. 2007.

30. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC nº 12/2001. 48p. Brasil. 2001.

31. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 216 de 15 de setembro de 2004. Dispõe sobre Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviço de Alimentação.

32. Reis VR. Avaliação da qualidade microbiológica de produtos a base de chocolates artesanais. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

33. Yana PP, Araújo EAF, Pena RS.. Avaliação Microbiológica, Físico-Química e das Condições de Fabricação de Bombom de Chocolate com Recheio de Frutas. *Alim. Nutr. Araraquara*, v.21, n.2, p. 305-310, abr./jun. 2010.