



UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ – UTFPR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO LATO SENSU
ANÁLISE INSTRUMENTAL

**AVALIAÇÃO IN SÍLICO DA TOXICIDADE DOS PRINCIPAIS
PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE
MANJERONA POR MEIO DE ESTRESSE FOTOLÍTICO**

Marcos Mendes

Toledo, PR
2019



UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ – UTFPR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO LATO SENSU
ANÁLISE INSTRUMENTAL

**AVALIAÇÃO IN SÍLICO DA TOXICIDADE DOS PRINCIPAIS
PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE
MANJERONA POR MEIO DE ESTRESSE FOTOLÍTICO**

Marcos Mendes

Projeto de pesquisa realizado na disciplina de Metodologia da Pesquisa do Programa de Pós-Graduação Lato Sensu em Análise Instrumental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus de Toledo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Especialista em Análise Instrumental

Orientadora: Dra. Viviane Lobo

Toledo, PR

2019

TERMO DE APROVAÇÃO

AVALIAÇÃO IN SÍLICO DA TOXICIDADE DOS PRINCIPAIS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE MANJERONA POR MEIO DE ESTRESSE FOTOLÍTICO

Por

Marcos Mendes

Esse trabalho de conclusão de curso foi apresentado no dia 17 de junho de dois mil e dezenove, como requisito parcial para a obtenção do título de Especialista em Análise Instrumental, no Curso de Especialização em Análise Instrumental, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Toledo. O candidato foi arguido pela banca examinadora composta pelos professores abaixo relacionados.

Após deliberação, a banca Examinadora considerou o trabalho **Aprovado**.

Prof. Dr^a. Viviane Lobo (Orientador)

Prof. Dr. Maurício Rosa. (Membro – UNIOESTE)

Prof. Dr. Renato Eising. (Membro – UTFPR)

***A versão assinada encontra-se arquivada na Coordenação da
Especialização**

MENDES, M. B. **AVALIAÇÃO IN SÍLICO DA TOXICIDADE DOS PRINCIPAIS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE MANJERONA POR MEIO DE ESTRESSE FOTOLÍTICO** 2019. 48 páginas. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, 2019.

RESUMO

Óleos essenciais são extratos obtidos através de plantas aromáticas e em determinados casos apresentam propriedades como atividade anti-inflamatória e inibitória da proliferação de bactérias sendo assim os óleos essenciais estão contidos em uma série de produtos dos diversos setores da indústria, variando entre conservantes e aromatizantes. No entanto pouco se sabe sobre o perfil de degradação e toxicidade dos produtos de degradação dessas moléculas uma vez que as legislações vigentes nas áreas relacionadas não cobram elaboração de estudo de estabilidade. Neste contexto o estudo teve por objetivo determinar a toxicidade in sílico dos produtos de degradação obtidos por estresse fotolítico do óleo essencial de manjerona visando demonstrar a importância de monitorar determinados produtos de degradação que apresentam alertas estruturais para à mutagenicidade, carcinogenicidade e toxicidade aguda.

Palavras-chave: óleos essenciais, perfil de degradação, estresse fotolítico, *in sílico*, mutagenicidade, carcinogenicidade.

MENDES, M. B. **AVALIAÇÃO IN SÍLICO DA TOXICIDADE DOS PRINCIPAIS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE MANJERONA POR MEIO DE ESTRESSE FOTOLÍTICO** 2019. 48 páginas. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, 2019.

ABSTRACT

Essential oils are extracts obtained from aromatic plants and in cases have properties such as anti-inflammatory activity and inhibitory proliferation of bacteria, the essential oils are contained in a number of products from various industry sectors, ranging from preservatives to flavorings. However, there are not many studies about the degradation profile and toxicity of the degradation products of these molecules since the laws in force in the related areas do not require elaboration of stability studies. In this context the objective of this study was to determine the in silico toxicity of degradation products obtained by photolytic stress of marjoram essential oil in order to demonstrate the importance of monitoring certain degradation products that have structural alerts to mutagenicity, carcinogenicity and acute toxicity.

Keywords: essential oils, degradation products, photolytic stress, in silico, mutagenicity, carcinogenicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-Esquema sobre o perfil de degradação.....	10
Figura 2 - Esquema da formação de hidroperóxidos e abstração de hidrogênio alílico a partir de alfa terpenos.....	12
Figura 3 - Esquema da formação de peróxidos e epóxidos a partir de alfa terpenos	13
Figura 4 - Oxidação a partir do 4-terpinol, via formação de 1,2,4-trihidroxi	13
Figura 5 – Esquema exemplificado a associação de um fragmento molecular com a sua respectiva atividade biológica.	20
Figura 6 - Grupos funcionais relacionados a toxicidade do DNA.....	21
Figura 7 - Esquema representativo do modo operante do PROTOXI II.....	24
Figura 8 - 4- Terpeneol	28
Figura 9 - cis-sabineno	29
Figura 10 - o-cimeno.....	31
Figura 11 – γ - terpineno.....	33
Figura 12 - p-menta-1-en-8-ol.....	34
Figura 13 - 1,4-Diisopropil-benzeno.....	35
Figura 14 - 2-undecanona.....	37
Figura 15 -1,3-Diisopropil-benzeno.....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação e ação correlata do ICH M7	17
Tabela 2 – Ingestões diárias aceitáveis para impurezas individuais.....	18
Tabela 3 - Classificação da toxicidade aguda segundo ONU (GHS).....	25
Tabela 4 - Índices de retenção (Coluna DB5) e percentual dos componentes principais do óleo essencial da manjerona.....	26
Tabela 5 - Índices de retenção (Coluna DB5) e percentual dos componentes principais do perfil de degradação por estresse fotolítico do óleo essencial da manjerona.	27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CG-MS: Cromatografia gasosa com espectrômetro de massa

DL50: Dose letal média

EEA: Espaço Económico Europeu

EMA: Agência Europeia de Medicamentos

EPA: Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos

FDA: *Food and Drug Administration*

GHS: Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos

ICH: Conselho Internacional para a Harmonização dos Requisitos Técnicos para Produtos Farmacêuticos

IFA: Insumo Farmacêutico Ativo

ISO: Organização Internacional de Normalização

IUPAC: *International Union of Pure and Applied Chemistry*

OCDE: Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico

OMS: Organização mundial da saúde

ONU: Organização das Nações Unidas

PD: Produto de degradação

pH: Potencial hidrogeniônico

QSAR: Relação quantitativa estrutura/atividade

RDC: Resolução da diretoria colegiada

SAR: Relação estrutura/atividade

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	5
1.1	OBJETIVOS	7
1.1.1	Geral	7
1.1.2	Específicos.....	7
1.2	JUSTIFICATIVA	7
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	7
2.1	PRODUTO DE DEGRADAÇÃO	7
2.2	ESTUDO DE DEGRADAÇÃO FORÇADA.....	8
2.3	PERFIL DE DEGRADAÇÃO.....	9
2.4	PERFIL DE DEGRADAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS	10
2.5	IDENTIFICAÇÃO DE UM PRODUTO DE DEGRADAÇÃO	14
2.6	QUALIFICAÇÃO DE UM PRODUTO DE DEGRADAÇÃO	14
2.7	GUIA PARA ESTABILIDADE OBTENÇÃO DE PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E QUALIFICAÇÃO DE DEGRADAÇÃO EM MEDICAMENTOS (ANVISA)	15
2.8	ICH M7(R1) ¹⁴ - AVALIAÇÃO E CONTROLE DE IMPUREZAS DNA REATIVAS (MUTAGÊNICAS) EM FARMACOS PARA CONTROLE DO POTENCIAL CARCINOGENICO	16
2.9	PREDIÇÃO IN SÍLICO	18
3	METODOLOGIA	22
3.1	CARACTERIZAÇÃO E DEGRADAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL	22
3.2	SOFTWARE PROTOXI II	23
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4.1	CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DA MANJERONA.....	25
4.2	CARACTERIZAÇÃO DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO OBSERVADOS NO ESTRESSE FOTOLITICO PARA O ÓLEO ESSENCIAL DA MANJERONA	26
4.3	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE IN SÍLICO DOS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS NO ÓLEO.....	27
4.4	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE <i>IN SÍLICO</i> DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO MAJORITÁRIOS DO ÓLEO	35
5	CONCLUSÕES.....	41

6 REFERÊNCIAS.....42

1 INTRODUÇÃO

Óleos essenciais são compostos voláteis, naturais e complexos caracterizados por um forte odor e formados a partir de plantas aromáticas como metabólitos secundários. São geralmente obtidos por vapor ou hidrodestilação e conhecidos por suas características antissépticas, bactericida, viricida e fungicida, por propriedades medicinais e fragrância, de longa data são usados na preservação de alimentos e como remédios antimicrobianos, analgésicos, sedativos, anti-inflamatórios, espasmolíticos e anestésicos locais.¹

Na natureza, os óleos essenciais desempenham um papel importante quanto a proteção das plantas como antibacterianos, antivirais, antifúngicos, inseticidas e também contra herbívoros, além de atrair insetos para favorecer a dispersão de pólen e sementes, ou repelir outros indesejáveis.¹

Os óleos essenciais são extraídos de várias plantas aromáticas geralmente localizadas em países temperados e tropicais, onde representam uma parte importante do conjunto de compostos tradicionais. Apresentam-se na forma de líquidos, voláteis, límpidos e raramente coloridos, lipossolúveis e solúvel em solventes orgânicos com uma densidade geralmente menor que a da água podem ser sintetizados por todos os órgãos da planta, ou seja, botões, flores, folhas, caules, galhos, sementes, frutas, raízes, madeira ou casca, embora mais comumente estejam armazenados em células secretoras, cavidades, canais, células epidérmicas ou tricomas glandulares.²

Existem vários métodos para extrair óleos essenciais. Estes podem incluir o uso de dióxido de carbono líquido ou micro-ondas, e principalmente destilação de baixa ou alta pressão empregando água fervente ou vapor quente. Devido às suas propriedades bactericidas e fungicidas, uso farmacêutico e alimentar estão cada vez mais difundidas como alternativas aos produtos químicos para proteger o equilíbrio ecológico. Nestes casos, a extração por destilação a vapor ou por expressão, por exemplo para citros é preferida.¹

Para perfumaria, a extração com solventes lipofílicos e às vezes com dióxido de carbono supercrítico é favorecida. Assim, o perfil químico dos derivados de óleos essenciais não difere apenas o número de moléculas, mas também na estereoquímica das mesmas, o tipo de extração é escolhido de acordo com o propósito do uso. O produto de extração pode variar em qualidade, quantidade e composição de acordo com o clima, composição do solo, órgão vegetal, idade e estado vegetativo da planta^{3,4}

Assim, a fim de obter óleos essenciais equivalentes, são extraídos sob as mesmas condições do mesmo órgão da planta que vem crescendo o mesmo solo, sob o mesmo clima e foi escolhido na mesma temporada. A maioria dos produtos essenciais comercializados são quimiotipados por cromatografia gasosa e massa análise espectrométrica. Monografias analíticas foram publicado (Farmacopeia Europeia, ISO, OMS) para garantir a boa qualidade óleos essenciais⁵.

Óleos essenciais têm sido largamente empregados por suas propriedades já observadas na natureza, e atualmente, aproximadamente 3000 óleos essenciais são conhecidos, 300 dos quais são comercialmente importantes especialmente para o farmacêutico, indústrias agronômicas, alimentícias, sanitárias, cosméticas e de perfumaria. Alguns extratos como, D-limoneno, acetato de geranila ou D-carvona são empregados em perfumes, cremes, sabonetes, como aditivos de sabor para alimentos, em fragrâncias para produtos de limpeza doméstica e solventes industriais.

Alguns óleos essenciais parecem apresentar propriedades medicinais específicas que foram reivindicadas para curar uma ou outra disfunção orgânica ou distúrbio sistêmico^{6,7}

Devido à nova atração por tais produtos naturais, e apesar de sua ampla utilização, ainda é importante desenvolver uma melhor compreensão de seu modo de ação biológica, e perfil de degradação dos compostos para novas aplicações na saúde humana, agricultura e no meio ambiente, para que se consolidem cada vez mais como alternativa ou complementos eficazes aos compostos sintéticos da indústria química, sem mostrar os mesmos efeitos secundários⁸.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Geral

Promover o estresse de um óleo essencial e posterior identificação dos produtos de degradação gerados e sua toxicidade quanto a mutagenicidade e carcinogenicidade

1.1.2 Específicos

Determinar o perfil de degradação do estresse fotolítico da manjerona, identificando seus principais componentes e avaliando a toxicidade *in silico* dos produtos de degradação majoritários buscando por alertas estruturais.

1.2 JUSTIFICATIVA

No processo de desenvolvimento de um novo fármaco, o órgão regulador ANVISA solicita uma série de estudos sempre embasado na segurança do produto. O principal requerimento é a obtenção do perfil de degradação⁹, já o mesmo nível de conhecimento não é solicitado pelo mesmo órgão regulador quando se trata de moléculas aplicadas a segmentos correlatos tais como cosméticos e alimentício.

No contexto apresentado, vale a investigação do perfil de degradação e principalmente da toxicidade das impurezas formadas no estresse, (fotolítico), aplicado às moléculas constituintes do óleo essencial da manjerona cuja as principais aplicações está relacionada ao setor alimentício, uma vez seus produtos de degradação apresentam grandes similaridades com produtos de degradação dos fármacos que por sua vez são rigorosamente controlados durante toda a vida útil do produto.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 PRODUTO DE DEGRADAÇÃO

São impurezas resultantes de alterações químicas que surgem durante a fabricação ou armazenamento do produto. Impureza é qualquer componente presente no insumo farmacêutico ou no produto terminado que não seja o próprio insumo farmacêutico ativo nem os excipientes As principais impurezas que podem estar

presentes nas matrizes de produtos formulados são aquelas derivadas do processo de síntese de seus componentes (impurezas orgânicas, inorgânicas e solventes residuais), além daquelas resultantes de alterações químicas que surgem durante a fabricação ou armazenamento do medicamento.

Diante da necessidade do controle de produtos de degradação não desejados durante o estudo de estabilidade de medicamentos, aliada ao fato de que a presença destas substâncias, mesmo em quantidades mínimas, pode interferir na segurança e eficácia dos medicamentos faz-se necessário o desenvolvimento de metodologias indicativas de estabilidade com especificidade e seletividade suficientemente acuradas para identificação e quantificação desses compostos. Os produtos de degradação são compostos originários da degradação do princípio ativo ou excipientes de uma formulação, podendo surgir durante o armazenamento do medicamento ou diante de situações de estresse, como por exemplo, exposição à luz, temperatura, pH, umidade ou no transporte. Podem ser gerados também por incompatibilidade entre fármaco e excipientes, ou devido ao contato com a embalagem primária. Estudos de degradação forçada são estudos que permitem a geração de produtos de degradação, por meio da exposição do insumo farmacêutico ativo e produto acabado a condições de estresse, como por exemplo, luz, temperatura, calor, umidade, hidrólise ácida/básica e oxidação, entre outras. Estes estudos permitem o desenvolvimento de métodos indicativos de estabilidade com especificidade e seletividade adequada, e também fornecem informações a respeito das possíveis rotas de degradação de um determinado produto ⁹.

2.2 ESTUDO DE DEGRADAÇÃO FORÇADA

O estudo de degradação forçada é, a ferramenta utilizada para se obter um perfil de degradação para o desenvolvimento do método indicativo de estabilidade. No entanto, como o perfil de degradação depende das condições a que se expõe o produto, o perfil obtido na degradação forçada não será igual ao obtido no estudo de estabilidade. Daí a necessidade da realização de degradação forçada em diversas condições para gerar todos os PD que aparecerão nos estudos de estabilidade. Na prática, percebe-se que geralmente aparecem mais PD na degradação forçada do que no estudo de estabilidade; portanto, o perfil do estudo de degradação forçada é maior que o perfil de degradação “real”. Trata-se de um perfil de degradação “potencial”.¹⁰

2.3 PERFIL DE DEGRADAÇÃO

O perfil de degradação é o conjunto de produtos de degradação observados no insumo farmacêutico ativo (IFA) ou no medicamento quando exposto a determinada condição. Por “condição”, entende-se um conjunto de parâmetros, por exemplo, temperatura, pH, tempo, umidade. O perfil de degradação de interesse sanitário é aquele gerado pela condição a qual o medicamento é exposto em sua vida útil, que é simulada no estudo de estabilidade em longa duração. Portanto, o perfil de degradação de interesse sanitário é aquele obtido após a exposição do medicamento ou IFA à temperatura e umidade da estabilidade de longa duração, pelo tempo equivalente à sua vida útil. Para efeito deste guia, este perfil de degradação, de interesse sanitário, será definido como perfil de degradação “real”. O estudo de estabilidade acelerado, apesar de ser primariamente preditivo, seu perfil de degradação pode ser relevante em situações especiais, como nos casos de concessão de prazo de validade provisório.¹⁰

Um método indicativo de estabilidade para produtos de degradação é aquele capaz de detectar e quantificar todos os PD relevantes do perfil de degradação “real”. Porém, não é possível desenvolver tal método utilizando-se apenas amostras do IFA ou medicamento no final do estudo de estabilidade de longa duração porque em geral a degradação é pequena, sendo possíveis dois tipos de problemas:

1. Caso seja observada uma ligeira redução no resultado de teor sem observação de produtos de degradação, não é possível saber se a ligeira redução é somente uma variação intrínseca da análise ou se houve, de fato, degradação e o PD não está sendo detectado.

2. Caso não seja observada variação de teor, não é possível saber se realmente não houve degradação ou se não há separação entre o pico do IFA e de seus PD.

Por estes motivos, é necessário causar deliberadamente a degradação em maior escala do IFA ou medicamento, expondo-os a condições mais extremas que aquela praticada no estudo de estabilidade de longa duração. O seja, é necessário realizar o estudo de degradação forçada, também chamado de estudo de estresse.

O estudo do perfil de degradação deve ser realizado: no registro do medicamento, para todas as concentrações e formas farmacêuticas; em inclusões de novas concentrações e formas farmacêuticas; além de em alterações pós-registro.

Cabe ressaltar que o perfil de degradação “potencial” pode ser diferente do “real” tanto qualitativamente (compostos diferentes) quanto quantitativamente (concentrações diferentes), mas do ponto de vista qualitativo, o perfil “real” está contido no perfil “potencial”. Os perfis de degradação obtidos no estudo de estabilidade acelerada e de longa duração também podem ser qualitativa e quantitativamente diferentes.

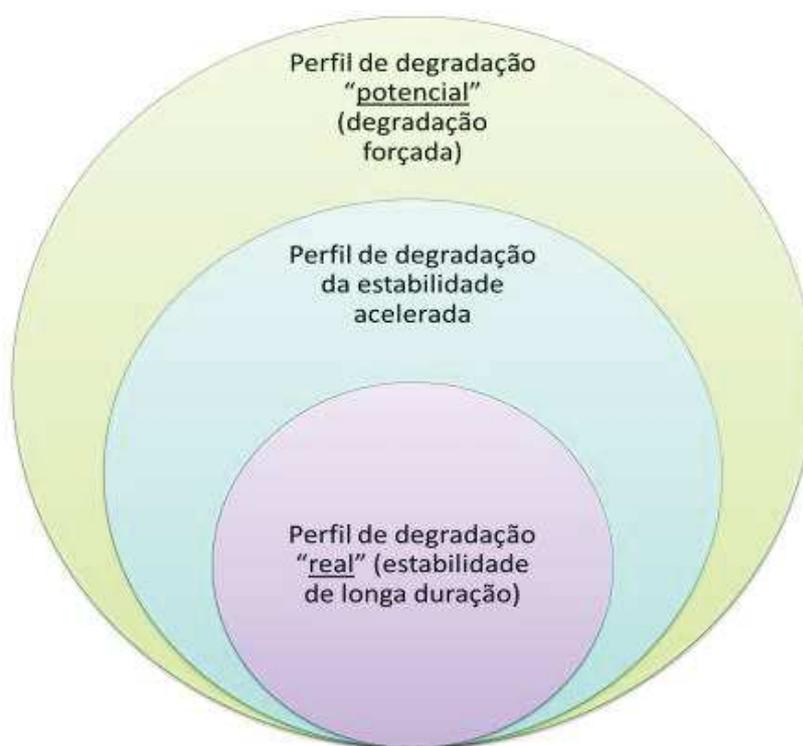


Figura 1-Esquema sobre o perfil de degradação

2.4 PERFIL DE DEGRADAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS

A degradação dos óleos essenciais depende vários fatores externos como temperatura, luz, e oxigênio disponível. Além disso, da própria composição do óleo, e presença de impurezas que também podem influenciar diretamente na estabilidade e por consequência no perfil de impurezas formado.

Considera-se que a luz ultravioleta (UV) e a luz visível (Vis) aceleram os processos de auto oxidação, desencadeando a abstração de hidrogênio que resulta na formação de radicais alquílicos. Tal observação foi confirmada nos perfis de degradação dos óleos de louro e erva-doce e especialmente quando se trata de monoterpenos, são evidenciadas a capacidade de degradar rapidamente sob a influência da luz. O mesmo estudo também relatou reações de transformação ocorreram no óleo de manjerona durante o armazenamento sob luz que levou à formação de vários não identificados componentes menores. Muito recentemente, Turek e Stintzing (2011b; 2012) mostrou que as mudanças em vários óleos essenciais foram promovidas sob o impacto da luz, no entanto, óleos de espécies vegetais variadas respondeu diferentemente: enquanto o óleo essencial de tomilho não alterou muito, o óleo de alecrim acabou por ser muito suscetível a ser estressado pela radiação uv-vis.

A radiação também é crucial em um segundo mecanismo de reação, denominada fotooxidação, mecanismo no qual oxigênio atmosférico é levado ao estado singlete (excitado) e essa nova configuração, eletrofílica não radicalar passa a reagir diretamente com a dupla ligação presente na estrutura do material levando a formação de hidroperóxidos após abstração de hidrogênio alílico. Conforme esquema da Figura 2

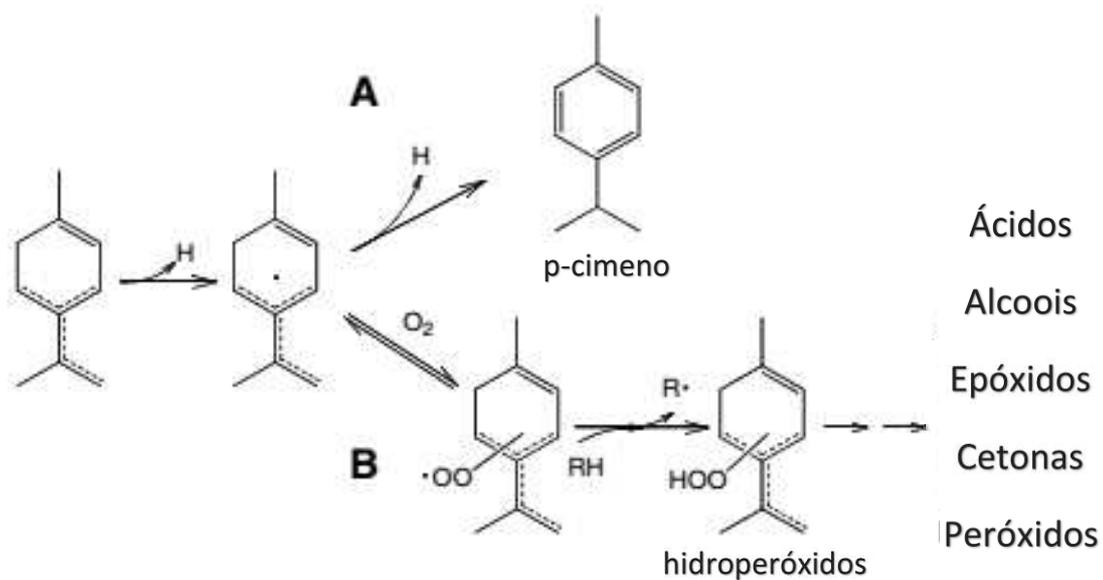


Figura 2 - Esquema da formação de hidroperóxidos e abstração de hidrogênio alílico a partir de alfa terpenos

Alternativamente, a foto oxidação de α -terpenos podem gerar endoperoxidos, cetoepóxidos e diepóxidos como apresentado na Figura 3, também é observado um possível mecanismo de reação para oxidação a partir do 4-terpinol, via formação de peróxidos e passando pela formação de 1,2,4-trihidroxi e chegando ao produto final da reação o p-cimeno.

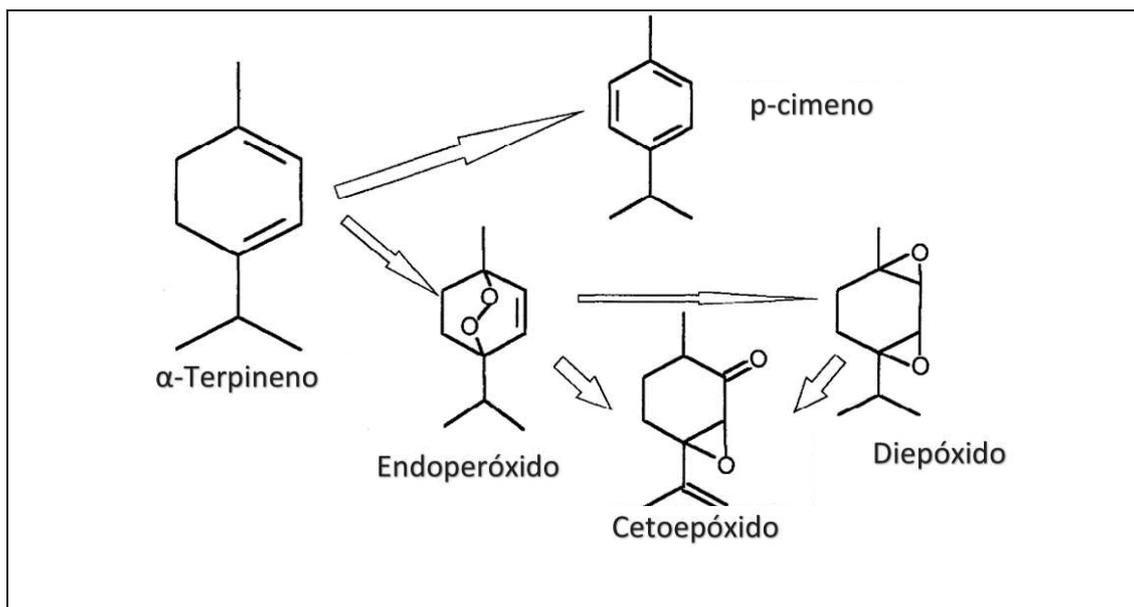


Figura 3 - Esquema da formação de peróxidos e epóxidos a partir de alfa terpenos

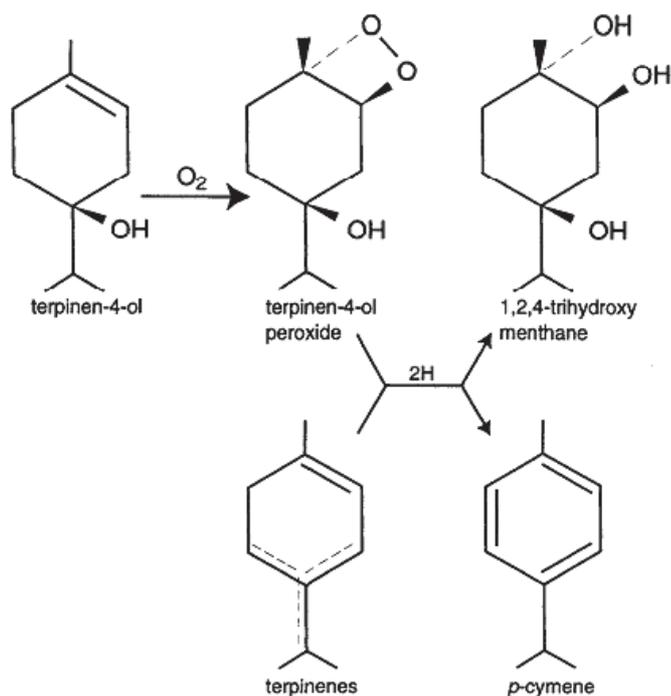


Figura 4 - Oxidação a partir do 4-terpinol, via formação de 1,2,4-trihidroxí

2.5 IDENTIFICAÇÃO DE UM PRODUTO DE DEGRADAÇÃO

A identificação dos produtos de degradação é fundamentada nos guias ICH Q3A (R2)¹² e Q3B (R2)¹³ e devem ser realizadas nas situações previstas na resolução de produtos de degradação.

São métodos considerados aceitáveis na identificação de um produto de degradação:

- Injeção de um padrão caracterizado ou farmacopeico de uma substância que tenha o mesmo tempo de retenção e o mesmo espectro de UV no método indicativo de estabilidade;
- Um mecanismo de degradação proposto que leve a uma estrutura confirmada com uma técnica espectroscópica de caracterização (espectros de massas, de RMN, infravermelho);
- Caracterização conclusiva, realizada com pelo menos duas técnicas espectroscópicas diferentes (espectros de massas, de RMN, infravermelho).

2.6 QUALIFICAÇÃO DE UM PRODUTO DE DEGRADAÇÃO

A qualificação dos produtos de degradação também é fundamentada nos guias ICH Q3A (R2) e Q3B (R2) e deve ser realizada nas situações previstas em tais guias e por consequência no procedimento para qualificação de produtos de degradação devendo necessariamente ser precedido pela classificação do produto de degradação de acordo com seu potencial de mutagenicidade e carcinogenicidade.

Essa classificação pode ser baseada em guias internacionais. Para a condução de ensaio de qualificação de uma impureza de degradação, recomenda-se que os estudos de segurança considerem a população de pacientes, a dose diária e a duração da administração do medicamento.

Para a condução dos estudos, deve ser avaliado potencial genotóxico do produto de degradação a fim de determinar mutações pontuais e aberrações cromossômicas além de estudos de toxicidade geral. O estudo deverá ser realizado em espécies animais mais susceptíveis a detecção de potencial toxicidade do produto de degradação. Esses estudos devem contemplar duração mínima de 14 dias e

máxima de 90 dias. Recomenda-se a opção pelo (s) ensaio (s) que seja mais adequado a análise a ser realizada.

Em geral, a investigação do potencial genotóxico é considerada relevante para a avaliação. A verificação quantitativa das relações entre a estrutura química e a atividade biológica (QSAR) pode ser utilizada como suporte a fim de complementar as avaliações realizadas. Esta avaliação deve ser realizada por modelos adequados de toxicologia computacional, seguindo guias globalmente aceitos. Estes estudos podem ser conduzidos com o produto de degradação isolado ou com a molécula em estudo contaminada com quantidade coerente com a concentração encontrada no estudo de estabilidade.

2.7 GUIA PARA ESTABILIDADE OBTENÇÃO DE PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E QUALIFICAÇÃO DE DEGRADAÇÃO EM MEDICAMENTOS (ANVISA)

O sucesso de um tratamento medicamentoso depende não somente da utilização do medicamento de acordo com a orientação prescrita pelo profissional de saúde, mas também da segurança, eficácia e qualidade do medicamento administrado. Em relação à segurança de um fármaco, este aspecto está relacionado ao perfil farmacológico do mesmo, aos efeitos adversos causados por esse medicamento e com as impurezas que podem estar presentes em sua formulação.

No entanto, a segurança se refere a um conceito relativo, pois, todo medicamento pode ser tanto prejudicial como benéfico. Nesse sentido, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) vem estabelecendo diretrizes para a condução de estudos que garantam a qualidade, segurança e confiabilidade dos medicamentos desenvolvidos no Brasil, de forma a harmonizar sua regulamentação legal com os requisitos existentes em diretrizes de agências reguladoras internacionais

Neste contexto, Guia 04/2015 tem o objetivo de expor o racional da agência e demonstrar o melhor entendimento para o cumprimento da Resolução-RDC nº 53, de 4, de dezembro de 2015, mais especificamente, na realização de estudos de degradação forçada e estudos de perfil de degradação, na identificação e qualificação de produtos de degradação (PD). Abrangendo os temas:

1. Realização do estudo de degradação forçada;
2. Documentação a ser enviada para a ANVISA sobre perfil de degradação;
3. Procedimentos para identificação de produtos de degradação; e
4. Procedimentos para qualificação de produtos de degradação.

2.8 ICH M7(R1)¹⁴ - AVALIAÇÃO E CONTROLE DE IMPUREZAS DNA REATIVAS (MUTAGÊNICAS) EM FARMACOS PARA CONTROLE DO POTENCIAL CARCINOGENÉTICO

Com o propósito de fornecer uma estrutura de análise prática e aplicável na Identificação, categorização, qualificação e controle de impurezas mutagênicas para limitar risco carcinogênico em potencial. Tal diretriz destina-se a complementar o ICH Q3A (R2), Q3B (R2) e ICH M3 (R2). Enfatizando considerações de segurança e gerenciamento de risco e qualidade em estabelecer níveis de impurezas mutagênicas.

O Guia descreve as recomendações para avaliação e controle de impurezas mutagênicas que residam ou se espere razoavelmente que residam na substância ou produto final do medicamento, considerando as condições pretendidas de uso humano. Conforme o guia ICH M7 a avaliação do risco mutagênico e carcinogênico envolve a análise inicial das impurezas presentes e potenciais através de uma pesquisa de dados de carcinogenicidade e de mutagenicidade bacteriana na literatura e em bases de dados, de modo a classificar as impurezas nas classes de 1 a 5, como descritas na Tabela 1. Se os dados para realizar a classificação não estiverem disponíveis deverá ser realizada uma avaliação das relações estrutura-atividade (SAR) focada em previsões de mutagenicidade bacteriana, de modo a obter a classificação das impurezas nas classes.

Deve ser realizada uma avaliação toxicológica computadorizada usando metodologias QSAR que estabeleçam uma previsão do outcome de um teste de mutagenicidade bacteriano. Nessa avaliação devem ser aplicadas duas metodologias QSAR complementares, uma baseada em regras de especialistas e outra baseada em estatística. Os modelos QSAR usados devem seguir os princípios gerais de validação da OCDE (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico)

Se o resultado das duas metodologias QSAR complementares for a ausência de estruturas de alerta pode concluir-se que as impurezas não levantam preocupações de mutagenicidade e não são necessários mais testes.

Tabela 1 - Classificação e ação correlata do ICH M7

Classe	Definição	Ação de controlo proposta
1	Carcinogéneos mutagénicos conhecidos	Controlar com um limite igual ou inferior ao limite específico do composto
2	Agentes mutagénicos com potencial carcinogénico desconhecido	Controlar com um limite igual ou inferior ao limite calculado com base no TTC apropriado
3	Estrutura de alerta não relacionada com a substância ativa e sem dados de mutagenicidade	Controlar com um limite igual ou inferior ao limite calculado com base no TTC apropriado ou realizar um teste de mutagenicidade bacteriana [Teste negativo (composto não mutagénico) = classe 5] [Teste positivo (composto mutagénico) = classe 2]
4	Estrutura de alerta também presente na substância ativa ou em substâncias aparentados (por exemplo, produtos intermédios do processo de síntese) com resultado negativo num teste de mutagenicidade.	Tratar como impureza não mutagénica
5	Sem estruturas de alerta, ou alertas estruturais com dados suficientes para demonstrar falta de mutagenicidade ou carcinogenicidade	Tratar como impureza não mutagénica

A ingestão aceitável de uma impureza mutagênica é 1,5 µg por dia é considerada associada a um risco negligenciável (risco teórico de câncer de <1 em 100.000 durante uma vida inteira de exposição) e pode, em geral, aplicada na maioria das situações como um limite aceitável para controle.

Essa abordagem normalmente seria usada para impurezas mutagênicas presentes em produtos farmacêuticos para tratamento a longo prazo (> 10 anos) e onde não existem dados de carcinogenicidade (classes 2 e 3). Tal valor pode ser ajustado em função da duração do tratamento e passa a assumir os valores da Tabela 2 a seguir.

Tabela 2 – Ingestões diárias aceitáveis para impurezas individuais

Duração do tratamento	≤ 1 mês	>1 - 12 meses	>1 - 10 anos	>10 anos
Dose diária ingerida (ug/dia)	120	20	10	1,5

2.9 PREDIÇÃO IN SÍLICO

Segundo a IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), a toxicologia computacional é definida como abordagem na qual são aplicados modelo computacionais e matemáticos para predição de efeitos adversos, e para melhor entendimento dos mecanismos pelos quais determinada substância provoca algum dano

Uma avaliação precoce das propriedades tóxicas de uma molécula não é importante somente apenas no campo da descoberta de novas drogas, mas também para os órgãos reguladores tais como Agência Europeia de Medicamentos (EMA), Administração de Alimentos e Drogas dos EUA (FDA), Agência de Proteção Ambiental dos EUA (EPA) e Agência Europeia do Ambiente (EEA) estipular parâmetros de controle em fármacos, cosméticos e alimentos.

A exposição pode ser benéfica ou prejudicial, dependendo da quantidade e duração da exposição química. Assim, é importante validar experimentalmente o potencial tóxico dos produtos químicos e sua combinação. No entanto, devido a vários desafios, como o tempo, custo e preocupações éticas com relação aos ensaios em animais, não é possível testar todos esses produtos químicos em plataformas experimentais. Assim, a toxicidade *in silico* é altamente necessária como uma plataforma integral para a previsão de toxicidade de produtos químicos que poderia ser prejudicial para seres humanos, animais, plantas e ambientes.

O objetivo dos modelos de toxicidade *in silico* é complementar os métodos existentes de toxicidade *in vitro* para prever os efeitos de toxicidade dos produtos químicos, minimizando tempo, a necessidade de testes em animais. O modelo de toxicidade *in silico* incorpora o conhecimento de vários campos, tais como toxicologia, bioestatística, biologia de sistemas, ciência da computação e muitas outras disciplinas relevantes.

A modelagem *in silico* (simulação computacional), é um avanço da Toxicologia no contexto da avaliação e predição da toxicidade, baseada em um conjunto de abordagens metodológicas que incluem:

- SAR (*Structure-activity Relationship*)
- QSAR (*Quantitative Structure-activity Relationship*)
- Formações de categorias com alertas estruturais definidos.
- Métodos de extrapolações e interpolações
- Redes neurais e árvores de decisão
- Outros.

SAR e QSAR Associação entre determinado fragmento molecular ou (sub) estrutura com a atividade biológica (toxicidade).

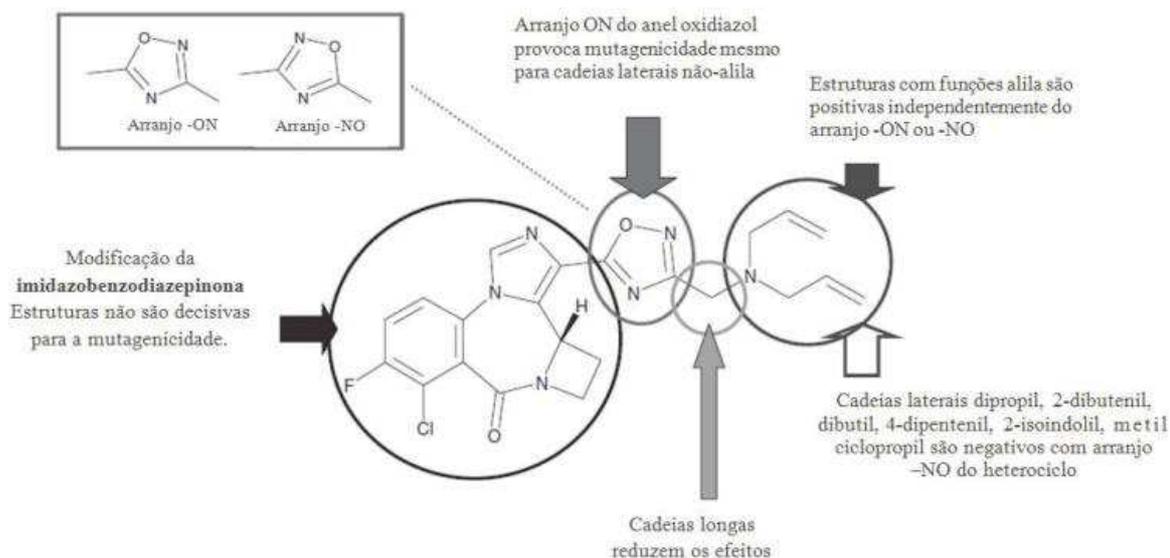


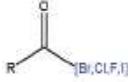
Figura 5 – Esquema exemplificado a associação de um fragmento molecular com a sua respectiva atividade biológica.

Na Figura 5 são apresentadas moléculas que apresentam propriedades físico-químicas, ecotoxicológicas ou de comportamento ambiental com provável semelhança, ou que seguem um padrão regular devido à similaridade estrutural como compostos que são conhecidamente envolvidos em reações com o DNA.

Desenvolvimentos de alertas estruturais, definição de alguns grupos que apresentam propriedades amplamente definidas inerentes a categoria química, são apresentadas na Figura 6

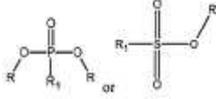
Alkylating, direct acting agents

SA_1: Acyl halides

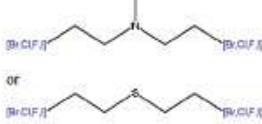


Alkylating, direct acting agents

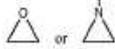
SA_2: alkyl (C<5) or benzyl ester of sulphonic or phosphonic acid



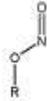
SA_5: S or N mustard



SA_7: Epoxides and aziridines



SA_9: Alkyl nitrite

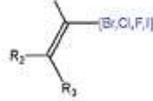


SA_11: Simple aldehyde

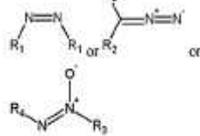


Alkylating, indirect acting agents

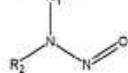
SA_4: Monohalalkene



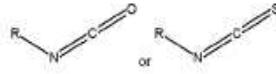
SA_14: Aliphatic azo and azoxy



SA_21: alkyl and aryl N-nitroso groups



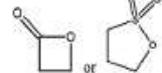
SA_15: isocyanate and isothiocyanate groups



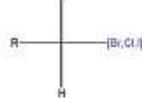
SA_3: N-methylol derivatives



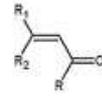
SA_6: Propiolactones or propiolactones



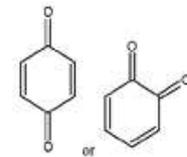
SA_8: Aliphatic halogens



SA_10: α , β unsaturated carbonyls



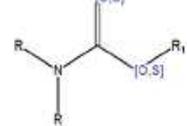
SA_12: Quinones



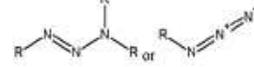
SA_13: Hydrazine



SA_16: alkyl carbamate and thiocarbamate

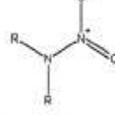


SA_22: azide and triazene groups

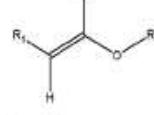


Alkylating, indirect acting agents

SA_23: aliphatic N-nitro group



SA_24: α , β unsaturated aliphatic alkoxy group

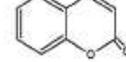


Intercalating and DNA-adducts forming, indirect acting agents

SA_18: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons

Three or more fused rings, not heteroaromatic

SA_30: Coumarins and Furocoumarins



SA_19: Heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons

Three or more fused rings, heteroaromatic

Aminoaryl DNA-adducts forming, indirect acting agents

SA_25: aromatic nitroso group



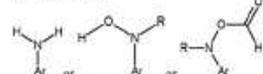
SA_26: aromatic ring N-oxide



SA_27: Nitro-aromatic



SA_28: primary aromatic amine, hydroxyl amine a its derived esters



or amine generating group:



SA_28bis: Aromatic mono- and dialkylamine



SA_28ter: aromatic N-acyl amine

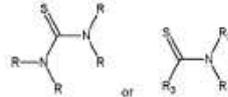


SA_29: Aromatic diazo



Nongenotoxic carcinogens

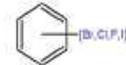
SA_17: Thiocarbonyl (nongenotoxic)



SA_20: (Poly) Halogenated Cycloalkanes (nongenotoxic)

Any cycloalkane skeleton with three or more halogens directly bound to the same ring

SA_31a: Halogenated benzene (nongenotoxic)



SA_31b: Halogenated PAH (nongenotoxic)



Ar = naphthalene, biphenyl, diphenyl

SA_31c: Halogenated dibenzodioxins (nongenotoxic)

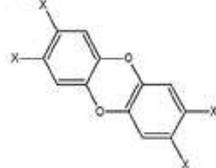


Figura 6 - Grupos funcionais relacionados a toxicidade do DNA

Nesse contexto, é de interesse demonstrar a necessidade de conhecer o perfil de degradação dos compostos que não são considerados fármacos, mas que de maneira análoga são ingeridas diariamente pela população.

3 METODOLOGIA

3.1 CARACTERIZAÇÃO E DEGRADAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

O material vegetal seco comercialmente disponível, foi submetido a extração por destilador a vapor em aço inoxidável. Secou-se circunstancialmente em um forno com circulação de vapor e troca de ar.

A Separação e identificação dos constituintes químicos do óleo essencial foram realizado por cromatografia gasosa com detector de espectrometria de massas GC-MS ,Thermo-Finnigam, modelo Focus DSQ II, equipado com coluna capilar Agilent DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), com gradiente temperatura: 60 ° C (2 min), 5 ° C / min a 110°C; 3 ° C / min a 150 ° C, 3 ° C / min a 15 ° C / min a 280 ° C (6 minutos). As amostras foram padronizadas para 0,001 g / L diclorometano como solvente e com injeção de 1 µL de solução. A temperatura da fonte de ionização foi de 220 ° C, o injetor a 220 ° C, modo de injeção 1/50. O gás de arraste usado foi hélio altamente puro a 1,0 mL / min.

O equipamento operado no modo EI (70 eV) com faixa espectral de massa 50-650 u. Os índices de retenção (IR), comparativos aos hidrocarbonetos, foram determinados adequadamente como descrito em literatura

A fotodegradação de óleo essencial foi promovida utilizando um foto reator equipado com uma lâmpada de mercúrio (125 W). O exterior bulbo foi removido para permitir que a luz ultravioleta emitida não fosse filtrada pelo vidro. As soluções contendo o óleo essencial foram expostos à radiação da lâmpada anteriormente descrita, a uma distância de 20 cm por cinco minutos, com leituras espectrofotômetro tomadas a cada minuto. As leituras foram realizadas usando cubetas de quartzo com caminho óptico de 10 mm e um espectrofotômetro UV-VIS GENESIS UV modelo 10, realizando uma varredura na faixa de 190-350 nm. O perfil de degradação foi testado em três solventes (diclorometano, etanol e hexano) e o óleo presente em concentrações de 80 µL / mL.

Para estudos de fotodegradação acelerada, uma lâmpada mais potente (250W) foi empregada. E a concentração das soluções de óleo essencial (30 µL / mL) em diclorometano e hexano foram expostas por 5 minutos a luz UV em cubetas de quartzo as mesmas condições descritas acima e amostras analisadas por GC-MS.

A identificação dos componentes do óleo essencial foi realizada por espectrometria de massa comparação de dados com a biblioteca NIST MS e os índices de retenção relacionados ao padrão de hidrocarbonetos foram determinados e os resultados comparados com a literatura ¹⁴

3.2 SOFTWARE PROTOXI II

ProTox-II, é um laboratório virtual para a previsão de toxicidades de pequenas moléculas, uma vez que a previsão de toxicidades de compostos é parte cada vez mais importante do processo de desenvolvimento e design de novas drogas assim como para compreensão da toxicidade dos produtos de degradação. Estimativas de toxicidade computacional não são apenas mais rápidas do que a determinação de doses tóxicas em animais, mas também são bem vistas pois diminui drasticamente a quantidade de experimentos com animais.

Incorpora similaridade molecular, propensão a fragmentos, característicos mais frequentes e cruzamento de informações via algoritmos (validação cruzada baseada em similaridade de fragmentos), com base em um total de 33 modelos para a previsão de vários desfechos de toxicidade, como toxicidade aguda, hepatotoxicidade, citotoxicidade, carcinogenicidade mutagenicidade, imunotoxicidade, vias de desfecho adverso (Tox21) e metas de toxicidade.

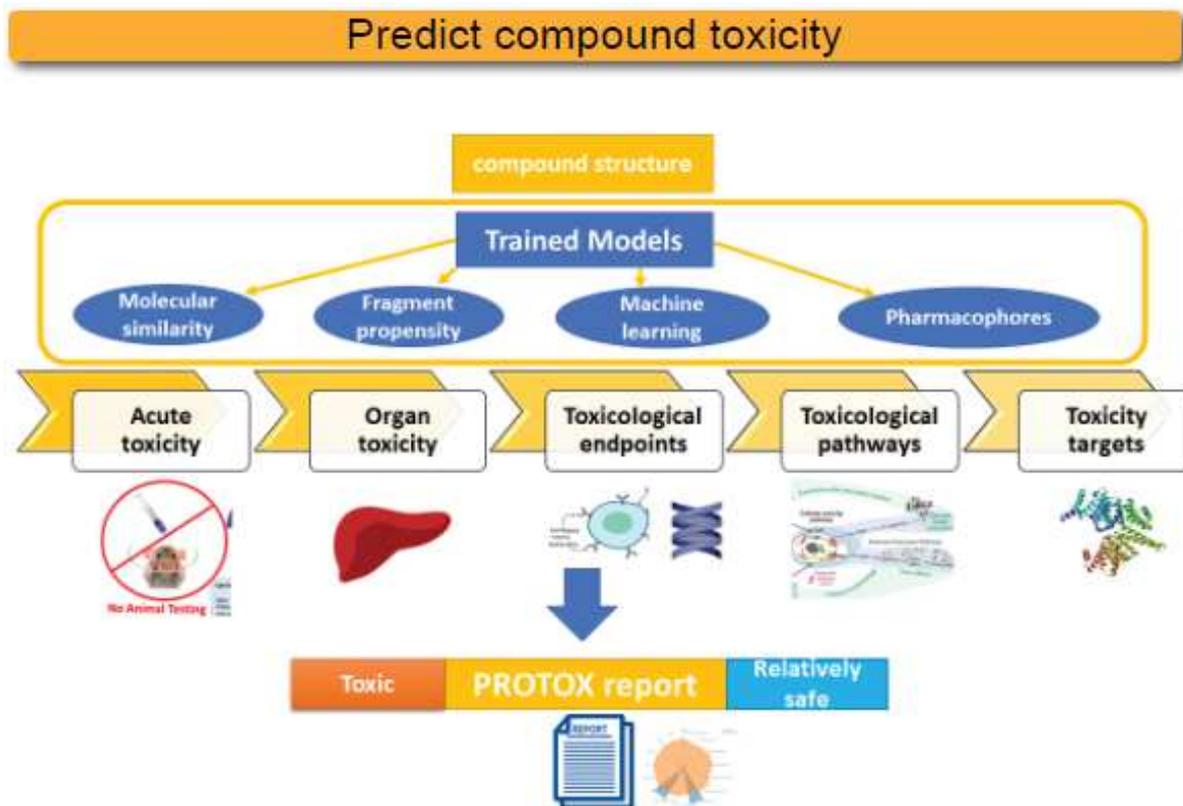


Figura 7 - Esquema representativo do modo operante do PROTOXI II

A toxicidade é frequentemente dada como valores de DL_{50} em mg / kg de peso corpóreo, ou seja, é a dose letal mediana significando a dose na qual 50% dos indivíduos de teste morrem por exposição a um composto.

As classes de toxicidade são definidas de acordo com o sistema globalmente harmonizado de classificação de rotulagem de produtos químicos (GHS), elaboradas pela Organização das Nações Unidas (ONU) e apresentadas a seguir

**Tabela 3 - Classificação da toxicidade aguda segundo ONU (GHS) –
(Adaptado)**

Via de exposição	Categoria 1	Categoria 2	Categoria 3	Categoria 4	Categoria 5
Oral (mg/kg) massa corpórea	5	50	300	2000	5000
Dermal (mg/kg) massa corpórea	50	200	1000	2000	
Gases (ppm V)	100	500	2500	20000	
Vapor (mg/l)	0,5	2	10	20	
Névoas e poeiras (mg/l)	0,05	0,5	1	5	

Classe I: fatal se ingerido ($DL_{50} \leq 5$)

Classe II: fatal por ingestão ($5 < DL_{50} \leq 50$)

Classe III: tóxico por ingestão ($50 < DL_{50} \leq 300$)

Classe IV: nocivo por ingestão ($300 < DL_{50} \leq 2000$)

Classe V: pode ser nocivo se ingerido ($2000 < DL_{50} \leq 5000$)

Classe VI: não tóxico ($DL_{50} > 5000$)

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e a discussão das propostas deste trabalho são apresentados a seguir.

4.1 CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DA MANJERONA

Beltrame et al, apresenta a caracterização do óleo essencial da manjerona, como observado na Tabela 4, caracterização está, baseada no índice de retenção da

literatura ou banco de dados do software.NIST Também é apresentado a composição percentual de cada componente identificado.

Tabela 4 - Índices de retenção (Coluna DB5) e percentual dos componentes principais do óleo essencial da manjerona. (Beltrame et al 2013)¹⁵

Substance	%	RI (Calculated)	RI (NIST or Adams, 2007)
terpinen-4-ol	26.0	1174	1182
cis-sabinene	13.3	1096	1097*
o-cymene	9.3	1022	1028
γ -terpinen	5.8	1056	1056
trans-sabinene	5.7	1064	1068*
p-menth-1-en-8-ol	5.1	1188	1195
β -thujene	4.9	971	971
α -terpinen	3.5	1015	1016
caryophyllene	2.3	1417	1418
estragole	2.3	1196	1195

Embora a composição química esteja sujeita a variação quanto a forma de extração e cultivo da planta, os extratos dos óleos essenciais da manjerona na sua grande maioria apresentam o composto 4-terpinol como componente majoritário juntamente com *cis* e *trans* sabineno e tal perfil é equivalente ao obtido experimentalmente

4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO OBSERVADOS NO ESTRESSE FOTOLÍTICO PARA O ÓLEO ESSENCIAL DA MANJERONA

Na Tabela 5, também obtida por Beltrame et al, apresentada a caracterização dos compostos observados após estresse fotolítico do óleo essencial da manjerona, caracterização está, baseada no índice de retenção da literatura ou banco de dados do software. Também é apresentado a composição percentual de cada componente identificado.

Tabela 5 - Índices de retenção (Coluna DB5) e percentual dos componentes principais do perfil de degradação por estresse fotolítico do óleo essencial da manjerona. (Beltrame et al 2013)

Substance	% (hexane)	% (dichloromethane)
2-undecanone	8.7	17.1
<i>p</i> -menthenol	0.70	5.1
<i>p</i> -diisopropyl-benzene	14.3	14.0
5- <i>t</i> -butyl- <i>m</i> -xylene	5.2	5.0
<i>m</i> -diisopropyl-benzene	8.5	7.8
terpineol	-	3.9
<i>o</i> -cimene	-	2.2
6-ethoxy-6-methyl-cyclohexanone	3.5	-
<i>t</i> -butyl-benzene	1.8	-
1,1-dimethylpropyl-benzene	1.6	-

Os resultados indicam que, em diclorometano houve uma razoável capacidade de proteção dos monoterpenos naturais da fotodegradação, uma vez que os compostos iniciais ainda foram observados após o período de estresse mesmo que em baixo percentual na composição final.

Quanto ao perfil de degradação obtido em hexano, houve diferença significativa com surgimento de produtos de degradação aromáticos em detrimento a cetonas.

4.3 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE IN SÍLICO DOS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS NO ÓLEO

Para efeito de comparação da toxicidade, os constituintes majoritários do óleo também foram submetidos a avaliação toxicológica *in silico*, e tais avaliações são apresentadas a seguir

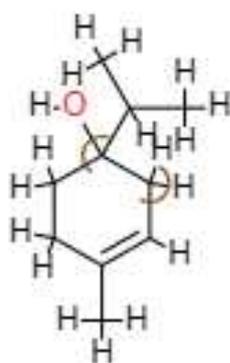
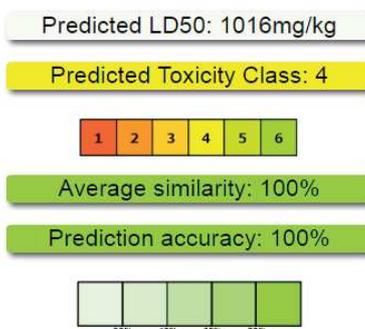
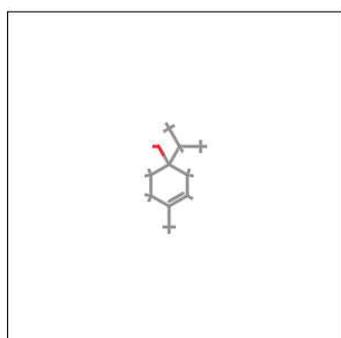


Figura 8 - 4- Terpineol

Oral toxicity prediction results for input compound



Name	terpinen-4-ol
Molweight	154.25
Number of hydrogen bond acceptors	1
Number of hydrogen bond donors	0
Number of atoms	11
Number of bonds	11
Number of rings	1
Number of rotatable bonds	1
Total charge	0
Molecular Polar Surface Area	20.23

Toxicity Model Report

Classification	Target	Shorthand	Prediction	Probability
Organ toxicity	Hepatotoxicity	dili	Inactive	0.80
Toxicity end points	Carcinogenicity	carcino	Inactive	0.72
Toxicity end points	Immunotoxicity	immuno	Inactive	0.99
Toxicity end points	Mutagenicity	mutagen	Inactive	0.83
Toxicity end points	Cytotoxicity	cyto	Inactive	0.88
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Aryl hydrocarbon Receptor (AhR)	nr_ahr	Inactive	1.0
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Androgen Receptor (AR)	nr_ar	Inactive	0.99
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Androgen Receptor Ligand Binding Domain (AR-LBD)	nr_ar_lbd	Inactive	0.99
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Aromatase	nr_aromatase	Inactive	0.99
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Estrogen Receptor Alpha (ER)	nr_er	Inactive	0.94
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Estrogen Receptor Ligand Binding Domain (ER-LBD)	nr_er_lbd	Inactive	0.99
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma (PPAR-Gamma)	nr_ppar_gamma	Inactive	0.99
Tox21-Stress response pathways	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2/antioxidant responsive element (nrf2/ARE)	sr_are	Inactive	0.96
Tox21-Stress response pathways	Heat shock factor response element (HSE)	sr_hse	Inactive	0.96
Tox21-Stress response pathways	Mitochondrial Membrane Potential (MMP)	sr_mmp	Inactive	0.94
Tox21-Stress response pathways	Phosphoprotein (Tumor Suppressor) p53	sr_p53	Inactive	0.99
Tox21-Stress response pathways	ATPase family AAA domain-containing protein 5 (ATAD5)	sr_atad5	Inactive	0.99

Como observado no modelo de relatório toxicológico, a molécula 4- Terpineol apresenta toxicidade moderada, com DL₅₀ predita de 1016 mg/kg, sendo assim é

caracterizada como classe 4 ($300 < DL_{50} < 2000$) mg/kg, e nenhum outro alerta toxicológico foi sinalizado.

Avaliação toxicológica para o cis-sabineno

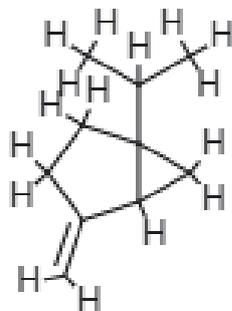
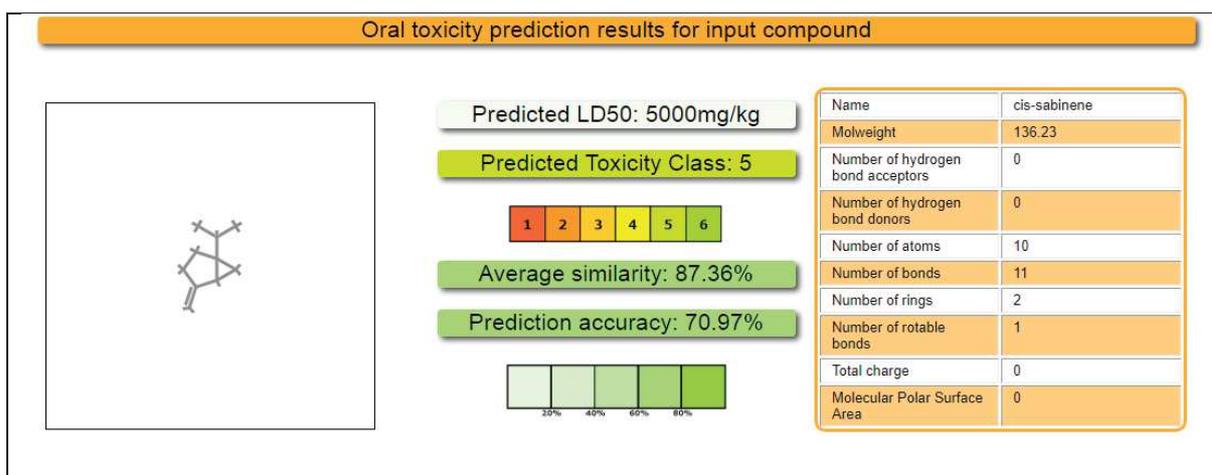


Figura 9 - cis-sabineno



Toxicity Model Report				
Classification	Target	Shorthand	Prediction	Probability
Organ toxicity	Hepatotoxicity	dili	Inactive	0.81
Toxicity end points	Carcinogenicity	carcino	Inactive	0.59
Toxicity end points	Immunotoxicity	immuno	Inactive	0.51
Toxicity end points	Mutagenicity	mutagen	Inactive	0.82
Toxicity end points	Cytotoxicity	cyto	Inactive	0.71
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Aryl hydrocarbon Receptor (AhR)	nr_ahr	Inactive	0.99
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Androgen Receptor (AR)	nr_ar	Inactive	0.99
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Androgen Receptor Ligand Binding Domain (AR-LBD)	nr_ar_lbd	Inactive	0.99
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Aromatase	nr_aromatase	Inactive	0.95
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Estrogen Receptor Alpha (ER)	nr_er	Inactive	0.95
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Estrogen Receptor Ligand Binding Domain (ER-LBD)	nr_er_lbd	Inactive	0.98
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma (PPAR-Gamma)	nr_ppar_gamma	Inactive	0.99
Tox21-Stress response pathways	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2/antioxidant responsive element (nr2/ARE)	sr_are	Inactive	0.89
Tox21-Stress response pathways	Heat shock factor response element (HSE)	sr_hse	Inactive	0.89
Tox21-Stress response pathways	Mitochondrial Membrane Potential (MMP)	sr_mmp	Inactive	0.96
Tox21-Stress response pathways	Phosphoprotein (Tumor Suppressor) p53	sr_p53	Inactive	0.99
Tox21-Stress response pathways	ATPase family AAA domain-containing protein 5 (ATAD5)	sr_atad5	Inactive	0.99

Como observado no modelo de relatório toxicológico, a molécula cis-sabineno apresenta toxicidade moderada, com DL₅₀ predita de 5000 mg/kg, sendo assim é caracterizada como classe 5 (2000 < DL₅₀ < 5000) mg/kg, e nenhum outro alerta toxicológico foi sinalizado.

Avaliação toxicológica para o-cimeno

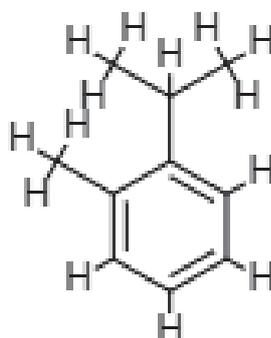
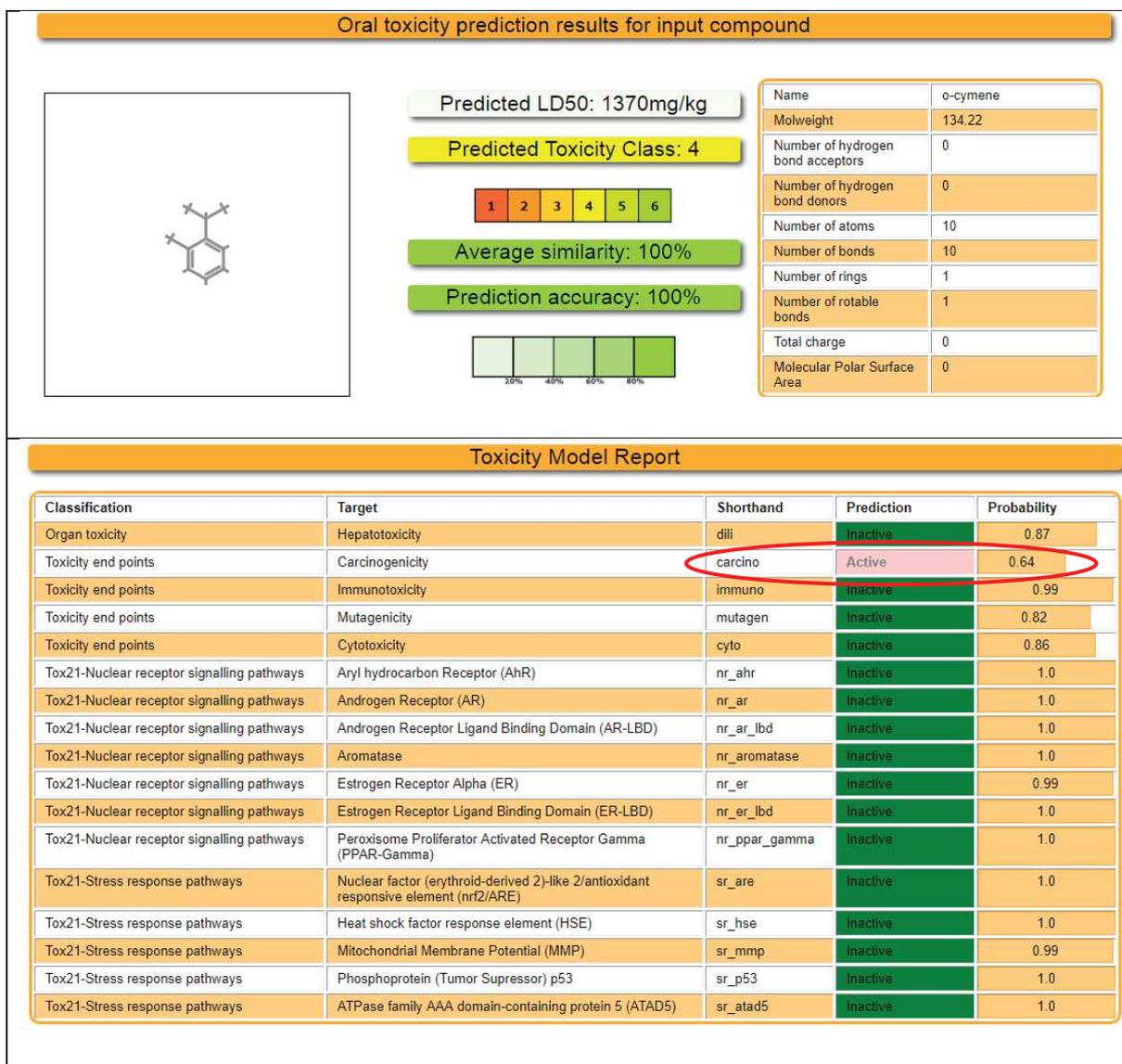


Figura 10 - o-cimeno



Como observado no modelo de reporte toxicológico, a molécula o-cimeno apresenta toxicidade oral moderada, sendo categorizada na classe 4 ($300 < DL_{50} < 200$) mg/kg com DL_{50} predita de 1370 mg/kg.

Outra conclusão de bastante impacto é que com probabilidade de 64 % a molécula foi categorizada como carcinogênica

Para conclusões sobre toxicidade aguda e carcinogenicidade o algoritmo apresentou exatidão de 100 %, e excelente similaridade na comparação com outras estruturas conhecidamente tóxicas.

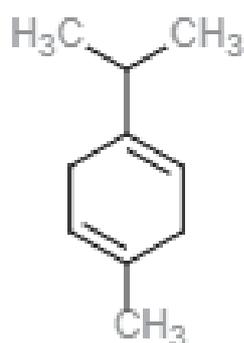
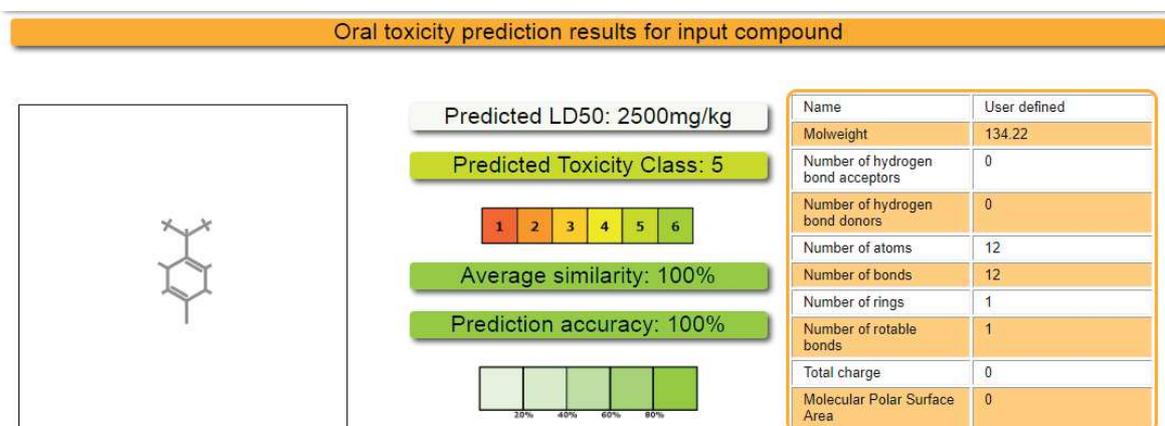


Figura 11 – γ - terpeno



Toxicity Model Report

Classification	Target	Shorthand	Prediction	Probability
Organ toxicity	Hepatotoxicity	dili	Inactive	0.83
Toxicity end points	Carcinogenicity	carcino	Inactive	0.60
Toxicity end points	Immunotoxicity	immuno	Inactive	0.98
Toxicity end points	Mutagenicity	mutagen	Inactive	0.92
Toxicity end points	Cytotoxicity	cyto	Inactive	0.82
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Aryl hydrocarbon Receptor (Ahr)	nr_ahr	Inactive	0.99
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Androgen Receptor (AR)	nr_ar	Inactive	1.0
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Androgen Receptor Ligand Binding Domain (AR-LBD)	nr_ar_lbd	Inactive	0.98
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Aromatase	nr_aromatase	Inactive	0.99
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Estrogen Receptor Alpha (ER)	nr_er	Inactive	0.88
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Estrogen Receptor Ligand Binding Domain (ER-LBD)	nr_er_lbd	Inactive	0.99
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma (PPAR-Gamma)	nr_ppar_gamma	Inactive	1.0
Tox21-Stress response pathways	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2/antioxidant responsive element (nrf2/ARE)	sr_are	Inactive	0.99
Tox21-Stress response pathways	Heat shock factor response element (HSE)	sr_hse	Inactive	0.99
Tox21-Stress response pathways	Mitochondrial Membrane Potential (MMP)	sr_mmp	Inactive	0.99
Tox21-Stress response pathways	Phosphoprotein (Tumor Suppressor) p53	sr_p53	Inactive	0.99
Tox21-Stress response pathways	ATPase family AAA domain-containing protein 5 (ATAD5)	sr_atad5	Inactive	1.0

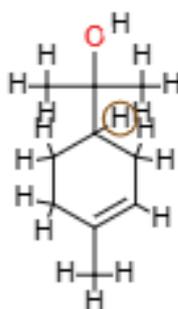
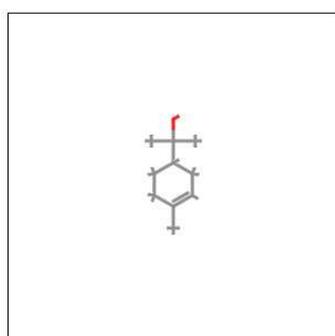


Figure 12 - p-mentha-1-en-8-ol

Oral toxicity prediction results for input compound



Predicted LD50: 2830mg/kg

Predicted Toxicity Class: 5

1 2 3 4 5 6

Average similarity: 100%

Prediction accuracy: 100%

30% 40% 60% 80%

Name	p-menth-1-en-8-ol
Molweight	154.25
Number of hydrogen bond acceptors	1
Number of hydrogen bond donors	0
Number of atoms	11
Number of bonds	11
Number of rings	1
Number of rotatable bonds	1
Total charge	0
Molecular Polar Surface Area	20.23

Toxicity Model Report

Classification	Target	Shorthand	Prediction	Probability
Organ toxicity	Hepatotoxicity	dili	Inactive	0.72
Toxicity end points	Carcinogenicity	carcino	Inactive	0.76
Toxicity end points	Immunotoxicity	immuno	Inactive	0.99
Toxicity end points	Mutagenicity	mutagen	Inactive	0.90
Toxicity end points	Cytotoxicity	cyto	Inactive	0.64
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Aryl hydrocarbon Receptor (AhR)	nr_ahr	Inactive	0.99
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Androgen Receptor (AR)	nr_ar	Inactive	0.99
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Androgen Receptor Ligand Binding Domain (AR-LBD)	nr_ar_lbd	Inactive	1.0
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Aromatase	nr_aromatase	Inactive	0.97
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Estrogen Receptor Alpha (ER)	nr_er	Inactive	0.93
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Estrogen Receptor Ligand Binding Domain (ER-LBD)	nr_er_lbd	Inactive	0.98
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma (PPAR-Gamma)	nr_ppar_gamma	Inactive	0.99
Tox21-Stress response pathways	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2/antioxidant responsive element (nrf2/ARE)	sr_are	Inactive	0.97
Tox21-Stress response pathways	Heat shock factor response element (HSE)	sr_hse	Inactive	0.97
Tox21-Stress response pathways	Mitochondrial Membrane Potential (MMP)	sr_mmp	Inactive	0.92
Tox21-Stress response pathways	Phosphoprotein (Tumor Suppressor) p53	sr_p53	Inactive	1.0
Tox21-Stress response pathways	ATPase family AAA domain-containing protein 5 (ATAD5)	sr_atad5	Inactive	1.0

4.4 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE *IN SÍLICO* DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO MAJORITÁRIOS DO ÓLEO

Os constituintes majoritários no perfil de degradação do óleo essencial foram submetidos a avaliação toxicológica *in silico*, e tais avaliações e discussões relacionadas são apresentadas a seguir

O composto 1,4-Diisopropilbenzeno ocorreu de forma majoritária 14,3% em hexano e como o segundo maior 14,0 % em diclorometano, indicando sofrer pouca influência do solvente uma vez que aparece em percentual constante nas duas condições

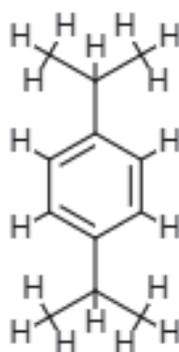
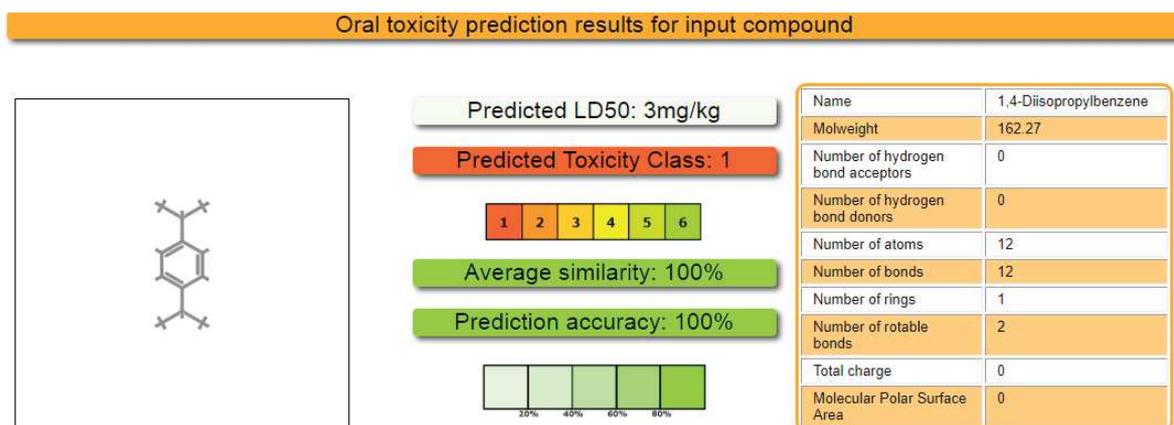


Figura 13 - 1,4-Diisopropil-benzeno



Toxicity Model Report

Classification	Target	Shorthand	Prediction	Probability
Organ toxicity	Hepatotoxicity	dili	Inactive	0.87
Toxicity end points	Carcinogenicity	carcino	Active	0.67
Toxicity end points	Immunotoxicity	immuno	Inactive	0.99
Toxicity end points	Mutagenicity	mutagen	Inactive	0.98
Toxicity end points	Cytotoxicity	cyto	Inactive	0.89
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Aryl hydrocarbon Receptor (AhR)	nr_ahr	Inactive	1.0
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Androgen Receptor (AR)	nr_ar	Inactive	1.0
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Androgen Receptor Ligand Binding Domain (AR-LBD)	nr_ar_lbd	Inactive	1.0
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Aromatase	nr_aromatase	Inactive	1.0
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Estrogen Receptor Alpha (ER)	nr_er	Inactive	1.0
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Estrogen Receptor Ligand Binding Domain (ER-LBD)	nr_er_lbd	Inactive	1.0
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma (PPAR-Gamma)	nr_ppar_gamma	Inactive	1.0
Tox21-Stress response pathways	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2/antioxidant responsive element (nrf2/ARE)	sr_are	Inactive	1.0
Tox21-Stress response pathways	Heat shock factor response element (HSE)	sr_hse	Inactive	1.0
Tox21-Stress response pathways	Mitochondrial Membrane Potential (MMP)	sr_mmp	Inactive	1.0
Tox21-Stress response pathways	Phosphoprotein (Tumor Suppressor) p53	sr_p53	Inactive	1.0
Tox21-Stress response pathways	ATPase family AAA domain-containing protein 5 (ATAD5)	sr_atad5	Inactive	1.0

Como observado no modelo de relatório toxicológico, a molécula 1,4-Diisopropil-benzeno apresenta elevada toxicidade oral, com DL₅₀ predita de 3mg/kg, sendo assim é caracterizada como classe 1 em toxicidade aguda, (Fatal se ingerida em concentrações acima de 5 mg/kg).

Outra conclusão de bastante impacto é que com probabilidade de 67 por cento a molécula foi categorizada como carcinogênica

Para conclusões sobre toxicidade aguda e carcinogenicidade o algoritmo apresentou exatidão de 100 %, e excelente similaridade na comparação com outras estruturas conhecidamente tóxicas.

Avaliação da toxicidade da 2-undecanona

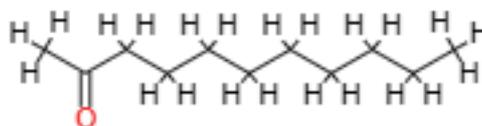
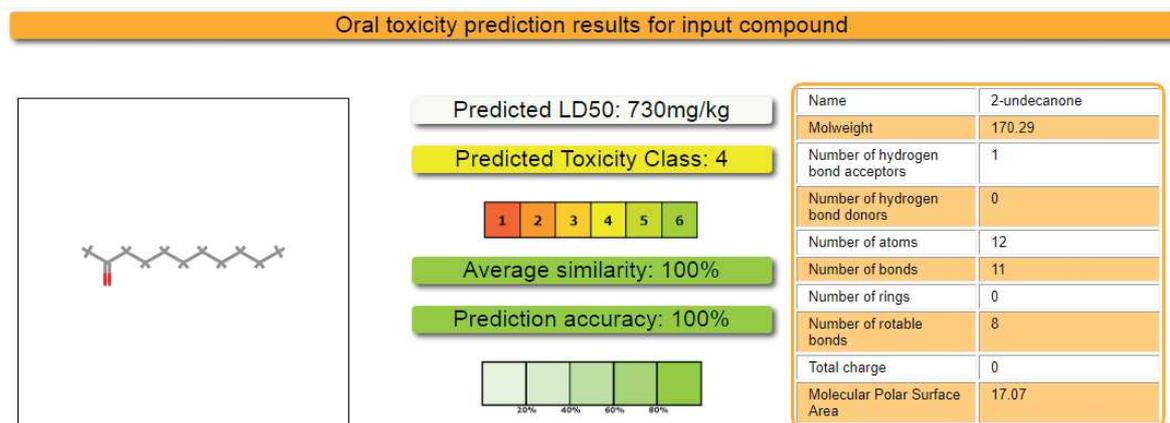


Figura 14 - 2-undecanona



Toxicity Model Report

Classification	Target	Shorthand	Prediction	Probability
Organ toxicity	Hepatotoxicity	dili	Inactive	0.69
Toxicity end points	Carcinogenicity	carcino	Inactive	0.63
Toxicity end points	Immunotoxicity	immuno	Inactive	0.99
Toxicity end points	Mutagenicity	mutagen	Inactive	0.97
Toxicity end points	Cytotoxicity	cyto	Inactive	0.73
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Aryl hydrocarbon Receptor (AhR)	nr_ahr	Inactive	0.99
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Androgen Receptor (AR)	nr_ar	Inactive	1.0
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Androgen Receptor Ligand Binding Domain (AR-LBD)	nr_ar_lbd	Inactive	1.0
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Aromatase	nr_aromatase	Inactive	1.0
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Estrogen Receptor Alpha (ER)	nr_er	Active	0.79
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Estrogen Receptor Ligand Binding Domain (ER-LBD)	nr_er_lbd	Inactive	1.0
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma (PPAR-Gamma)	nr_ppar_gamma	Inactive	0.99
Tox21-Stress response pathways	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2/antioxidant responsive element (nr2/ARE)	sr_are	Inactive	1.0
Tox21-Stress response pathways	Heat shock factor response element (HSE)	sr_hse	Inactive	1.0
Tox21-Stress response pathways	Mitochondrial Membrane Potential (MMP)	sr_mmp	Inactive	1.0
Tox21-Stress response pathways	Phosphoprotein (Tumor Suppressor) p53	sr_p53	Inactive	1.0
Tox21-Stress response pathways	ATPase family AAA domain-containing protein 5 (ATAD5)	sr_atad5	Inactive	1.0

Como observado no modelo de relatório toxicológico, a molécula 2-undecanona apresenta moderada toxicidade oral, com DL₅₀ predita de 730 mg/kg, sendo assim é caracterizada como classe 4 em toxicidade aguda, (com DL₅₀ entre 300 e 2000 mg/kg).

Outra conclusão significativa é que com probabilidade de 79% a molécula foi categorizada ativa para a toxicidade no receptor alfa de estrogênio. A consequência clínica de tal fato é a disfunção do tendão tibial posterior (DTTP) de maior ocorrência no gênero feminino e relacionado com a deficiência de operação dos receptores alfa de estrogênio.

Para conclusões sobre toxicidade aguda e carcinogenicidade o algoritmo apresentou exatidão de 100 %, e excelente similaridade na comparação com outras estruturas conhecidamente tóxicas.

Predição toxicológica para o 1,3-Diisopropil-benzeno

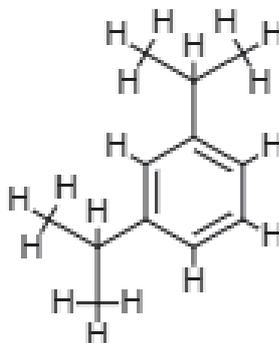
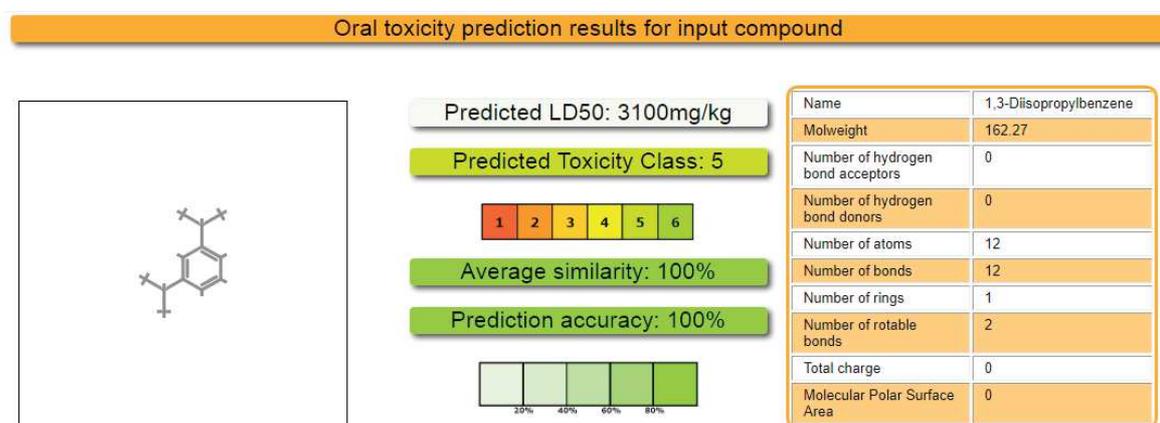


Figura 15 -1,3-Diisopropil-benzeno



Toxicity Model Report

Classification	Target	Shorthand	Prediction	Probability
Organ toxicity	Hepatotoxicity	dili	Inactive	0.87
Toxicity end points	Carcinogenicity	carcino	Active	0.67
Toxicity end points	Immunotoxicity	immuno	Inactive	0.98
Toxicity end points	Mutagenicity	mutagen	Inactive	0.98
Toxicity end points	Cytotoxicity	cyto	Inactive	0.89
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Aryl hydrocarbon Receptor (AhR)	nr_ahr	Inactive	1.0
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Androgen Receptor (AR)	nr_ar	Inactive	1.0
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Androgen Receptor Ligand Binding Domain (AR-LBD)	nr_ar_lbd	Inactive	1.0
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Aromatase	nr_aromatase	Inactive	1.0
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Estrogen Receptor Alpha (ER)	nr_er	Inactive	1.0
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Estrogen Receptor Ligand Binding Domain (ER-LBD)	nr_er_lbd	Inactive	1.0
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma (PPAR-Gamma)	nr_ppar_gamma	Inactive	1.0
Tox21-Stress response pathways	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2/antioxidant responsive element (nrf2/ARE)	sr_are	Inactive	1.0
Tox21-Stress response pathways	Heat shock factor response element (HSE)	sr_hse	Inactive	1.0
Tox21-Stress response pathways	Mitochondrial Membrane Potential (MMP)	sr_mmp	Inactive	1.0
Tox21-Stress response pathways	Phosphoprotein (Tumor Suppressor) p53	sr_p53	Inactive	1.0
Tox21-Stress response pathways	ATPase family AAA domain-containing protein 5 (ATAD5)	sr_atad5	Inactive	1.0

Como observado no modelo de relatório toxicológico, 1,3-Diisopropil-benzeno apresenta moderada toxicidade oral, com DL₅₀ predita de 3100 mg/kg, sendo assim é

caracterizada como classe 5 com toxicidade aguda, (DL_{50} acima de 5000 mg/kg) e para conclusões sobre toxicidade o algoritmo apresentou exatidão de 100%, e excelente similaridade na comparação com outras estruturas conhecidamente tóxicas.

No entanto é categorizada como carcinogênica com 67% de similaridade na comparação com outras estruturas conhecidamente tóxicas.

Uma vez que os três produtos majoritários de degradação apresentaram algum tipo de alerta quanto a sua toxicidade, abre se discussão sobre como tratar essa informação, discussão está que permite duas linhas de raciocínio a questão regulatória e a questão do risco e segurança do produto.

Assumindo o produto de degradação (1,4-Diisopropil-benzeno) seja oriundo diretamente da fotodegradação do composto majoritário (4 – terpineol), como sugere os mecanismos apresentados e o composto (4–terpineol) consideremos as duas hipóteses:

Situação 1. - Por apresentar uma serie de propriedades benéficas e ter sua eficiência comprovada para alguma aplicação, a molécula do (4–terpineol) agora passa a ser tratado com um insumo farmacêutico ativo (IFA) e administrado em 4 doses diárias de 600 mg, totalizando 2400 mg de ingestão diária. E devido ao baixo rendimento e nível de pureza após as extrações em plantas agora é obtido via sintética.

Com base na informação acima, a especificação de qualquer impureza já passa a ser 0,05 % no IFA e esses também são os valores para identificação e qualificação de impurezas no produto final.

Faz parte da documentação do registro do produto o dossiê de estudo de degradação forçada contendo os perfis de degradação obtidos nos estresses determinados pela legislação pertinente e são; fotolítico, por umidade, térmico, por hidrólise ácida, hidrólise básica, em meio oxidativo e por fim em meio a íons metálicos

Como observado no estresse fotolítico há formação de produtos de degradação classificados como carcinogênico e assim sendo, assume se imediatamente para essa impureza as especificações propostas no guia do ICH M7 mesmo sendo uma impureza em potencial, deverá ser monitorada e controlada durante todo o estudo de

estabilidade com uma especificação de 625 ppb considerando que o paciente fará uso continuado por mais de 10 anos.

Situação 2 -. Um determinado suplemento alimentar com aroma e odor desagradável para ter melhor receptividade no mercado passa a ter na sua formulação incremento de óleo essencial da manjerona.

No ato do registro do produto seria no máximo apresentado informações de algum estudo de estresse, mas com foco na manutenção das propriedades do suplemento e não sobre o perfil de degradação muito menos algum tratamento individual para alguma impureza. Nesse segundo cenário, a impureza tida como carcinogênica (1,4-Diisopropil-benzeno) poderia estar presentes sem ser controlada.

Com as hipóteses apresentadas fica mais fácil observar a questão legislação versus segurança do produto.

Nesse contexto visando segurança do produto final é de fundamental importância conhecer detalhadamente o perfil de degradação do produto gerado e disponibilizado a população, ainda que regulatoriamente nem todos os setores produtivos tenham o mesmo rigor da indústria farmacêutica.

5 CONCLUSÕES

Em conclusão aos resultados aqui apresentados para as avaliações de toxicidade *in silico* dos produtos de degradação do óleo essencial da manjerona, os dados apresentados e a discussão levantada deixam evidente a necessidade do conhecimento do perfil de degradação do óleo em questão assim como indica a necessidade de conhecer o perfil de degradação de compostos direcionados às indústrias alimentícia e também cosmética.

6 REFERÊNCIAS

1. Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008) Biological effects of essential oils-A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 446–475.
2. Akhila A., Tyagi B.R. and Naqvi A. 1987. Variation of essential oil constituents in *C. martinii* Wats var. *motia* at different stages of plant growth. *Ind. Perfumer*. 28: 126–128.
3. Masotti, V., Juteau, F., Bessie`re, J.M., Viano, J., 2003. Seasonal and phenological variations of the essential oil from the narrow endemic species *Artemisia molinieri* and its biological activities. *J. Agric. Food Chem.* 51, 7115–7121
4. Angioni, A., Barra, A., Coroneo, V., Dessi, S., Cabras, P., 2006. Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers. *J. Agric. Food Chem.* 54, 4364–4370.
5. Smith-Palmer A., Stewart J., Fyfe L. (2001). The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. *Food Microbiol.* 18 463–470 10.1006/fmic.2001.0415.
6. Silva, J., Abebe, W., Sousa, S.M., Duarte, V.G., Machado, M.I.L., Matos, F.J.A., 2003. Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of *Eucalyptus*. *J. Ethnopharmacol.* 89, 277–283.
7. Hasheminejad, G., Caldwell, J., 1994. Genotoxicity of the alkenylbenzenes *a*- and *b*-asarone, myristicin and elimicin as determined by the UDS assay in cultured rat hepatocytes. *Food Chem. Toxicol.* 32, 223–231.
8. Carson, C.F., Mee, B.J., Riley, T.V., 2002. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 1914–1920.
9. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Medicamentos – Guia n ° 4, versão 1, de 04 de dezembro de 2015. Guia para obtenção do perfil de degradação, e identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos. Vigente a partir de 08/12/2015. Disponível em: Acesso em: 06 jul. 2018. Rdc 53

10. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Medicamentos. Perguntas e Respostas – Assunto: RDC 53/2015 e Guia 4/2015. Edição 2.1, de 04 de outubro de 2017.
11. International Conference on Harmonisation (2006). Q3A(R2): Impurities in New Drug Substances.
12. International Conference on Harmonisation (2006). Q3B(R2): Impurities in New Drug Products.
13. ICH M7(R1) - Assessment and Control of DNA Reactive (Mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals to Limit Potential Carcinogenic Risk
14. Adams, R. P. (2007) Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 4th Edition. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL, USA.
15. Beltrame, J.M., Angnes, R.A., Lobo, V.S., 2013 Photodegradation of essential oil from marjoram (*origanum majoranal.*) Studied by gc-ms and uv-vis spectroscopy