

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**ESTUDO DE DEGRADAÇÃO FORÇADA DOS
AGROQUÍMICOS AZOXISTROBIM, AMICARBAZONA E
PICLORAM, PROCEDENDO-SE A ELUCIDAÇÃO
ESTRUTURAL DOS PRODUTOS GERADOS PELA TÉCNICA
DE RMN.**

Jéssica Fernanda Alves dos Santos

Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do título
de MESTRA PROFISSIONAL EM
QUÍMICA, área de concentração:
QUÍMICA TECNOLÓGICA.

Orientador: Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho
* Vínculo Empregatício: Empresa Eurofins – ASL

**São Carlos - SP
2019**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Jéssica Fernanda Alves dos Santos, realizada em 27/02/2019:

Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho
UFSCar

Prof. Dr. João Batista Fernandes
UFSCar

Prof. Dr. Nicholas Roberto da Silva Gobo
ACCERT

“Deus não teve tempo de fazer pessoas fracassadas, só pessoas brilhantes. Acredito que cada um de nós tem talentos que lhe foram dados por Deus e que estão dormentes em seu interior esperando para desabrochar.”

Mary Kay Ash.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por ser minha força, por me proporcionar esta oportunidade de aprendizado e me conduzir pelos caminhos éticos da academia e da vida.

À minha família, por me apoiar e me incentivar a chegar ao fim deste curso. Especialmente minha mãe Anisia, e meus irmãos, Julhiana, Érika e Leonardo, por disponibilizarem seu tempo sem reclamar. Amo vocês.

Ao meu namorado Bruno Antunes, por ser companheiro, paciente, e por não me deixar parar quando eu pensei em desistir. Amo você.

Ao meu orientador Edinho, que me aceitou sem julgamentos e acreditou na minha capacidade de realizar um bom trabalho.

À doutoranda Daiane Mirante, por disponibilizar tão amavelmente seu tempo e conhecimentos para me ajudar quando necessitei.

Ao meu colega de trabalho e doutor Sérgio Sartori, por me auxiliar nas primeiras correções e estrutura do texto.

Ao pós doutorando Eli Fernando Pimenta e ao Professor João Batista, por disponibilizarem seu tempo escasso para me ajudar com as correções.

Ao programa de pós graduação e a UFSCar, por terem funcionários extremamente competes e comprometidos com a causa do ensino, e equipamentos de boa qualidade a disposição dos alunos.

Aos meus colegas da empresa Merieux Nutrisciences Company, por me apoiar e participar da fase inicial deste projeto, cedendo equipamentos e reagentes.

Aos colaboradores da Empresa Eurofins Rio Claro, por me permitir finalizar este projeto e me dar suporte as necessidades imediatas.

E por fim, ao desconhecido Universo, que nos proporciona intrincadas coincidências e desafios que nos obrigam a crescer e cultivar somente o melhor de cada um dentro de nós.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura molecular do Azoxistrobim (e-Pesticide, 2017).....	5
Figura 2. Estrutura molecular do Amicarbazona (e-Pesticide Manual, 2017).	6
Figura 3. Estrutura molecular do Picloram (e-Pesticide Manual, 2017).	6
Figura 4. Relação entre perfil de degradação "potencial", obtido no estudo de estabilidade acelerada, e o perfil de degradação "real", obtido no estudo de estabilidade de longa duração. (Agência Nacional de Vigilância Sanitária Guia Prático nº 4/2015).....	8
Figura 5. Espectro de RMN ¹ H de Amicarbazona (CDCl ₃ , 400 MHz).	24
Figura 6. Simulação do espectro de RMN ¹³ C de Amicarbazona (Simulate and Predict NMR – adaptado).	25
Figura 7. Caracterização de Amicarbazona com marcação da posição de hidrogênio e carbono em preto.	26
Figura 8. Cromatograma da análise de Amicarbazona 1000 mg.L ⁻¹	26
Figura 9. Cromatograma do tratamento de Amicarbazona em incubação ácida- 10 dias - screening.....	27
Figura 10. A) Cromatograma de Amicarbazona analisada por LC/MS; B) Espectro de massas de Amicarbazona – analisada por LC/MS (MM = 241,295 g/mol).	28
Figura 11. A) Perfil cromatográfico da Impureza A de Amicarbazona analisada no LC/MS; B) Espectro de massas da Impureza A analisada por LC/MS – degradação ácida – tempo 10 dias.	29
Figura 12. Espectro de RMN ¹ H da Impureza A de Amicarbazona (CDCl ₃ , 400MHz).	30
Figura 13. Espectro de RMN ¹³ C da Impureza A de Amicarbazona.....	31
Figura 14. Espectro de RMN ¹ H- ¹ H COSY da Impureza A de Amicarbazona.....	32
Figura 15. Espectro de RMN ¹ H- ¹³ C HSQC da Impureza A de Amicarbazona.	33
Figura 16. Espectro de RMN ¹ H- ¹³ C HMBC da Impureza A de Amicarbazona.	34
Figura 17. Espectro de RMN ¹ H- ¹³ C HMBC da Impureza A de Amicarbazona – ampliado.	35
Figura 18. Estrutura proposta para a Impureza A de Amicarbazona com marcação da numeração de hidrogênio e carbono em preto.....	36
Figura 19. Mecanismo de degradação para o produto de degradação A de Amicarbazona....	36
Figura 20. A) Perfil cromatográfico da Impureza B de Amicarbazona analisada por LC/MS; B) Espectro de massas da Impureza B de Amicarbazona analisada por LC/MS.	37
Figura 21. Espectro de RMN ¹ H da Impureza B de Amicarbazona.	38
Figura 22. Espectro de RMN ¹³ C da Impureza B de Amicarbazona.	39

Figura 23. Espectro de RMN ^1H - ^1H COSY da Impureza B de Amicarbazona.....	41
Figura 24. Espectro de RMN ^1H - ^1H COSY da Impureza B de Amicarbazona – ampliado.....	41
Figura 25. Espectro de RMN ^1H - ^{13}C HSQC da Impureza B de Amicarbazona.....	43
Figura 26. Espectro de RMN ^1H - ^{13}C HSQC da Impureza B de Amicarbazona – ampliado....	44
Figura 27. Espectro de RMN ^1H - ^{13}C HMBC da Impureza B de Amicarbazona.....	45
Figura 28. Espectro de RMN ^1H - ^{13}C HMBC da Impureza B de Amicarbazona – ampliado...	46
Figura 29. Espectro de RMN ^1H - ^{13}C HMBC da Impureza B de Amicarbazona – ampliado...	47
Figura 30. Espectro de RMN ^1H - ^{13}C HMBC da Impureza B de Amicarbazona – ampliado...	48
Figura 31. Espectro de RMN ^1H - ^{13}C HMBC da Impureza B de Amicarbazona – ampliado...	49
Figura 32. Estrutura proposta para a Impureza B de Amicarbazona com marcação do carbono e hidrogênio em preto.	50
Figura 33. Mecanismo de degradação para a Impureza B de Amicarbazona.....	50
Figura 34. Espectro de RMN ^1H de Azoxistrobim (CDCl_3 , 400 MHz).	51
Figura 35. Espectro de RMN ^{13}C de Azoxistrobim (CDCl_3 , 100 MHz).	52
Figura 36. Estrutura de Azoxistrobim com indicação dos números atribuídos aos hidrogênios e carbonos.	54
Figura 37. A) Perfil cromatográfico da análise de Azoxistrobim por LC/MS; B) Espectro de massas obtido na análise por LC/MS de Azoxistrobim – 1000 ppm (MM = 403,394 g/mol).	54
Figura 38. Cromatograma do tratamento de Azoxistrobim em incubação ácida- 10 dias - screening.	55
Figura 39. A) Perfil cromatográfico da análise da Impureza A de Azoxistrobim por LC/MS; B) Espectro de massas obtido na análise da Impureza A de Azoxistrobim por LC/MS.	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Condições de estresse para o estudo de degradação forçada. (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, RESOLUÇÃO - RDC Nº 45/2012 – adaptado).....	8
Tabela 2. Parâmetros para notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação segundo a dose diária (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, RESOLUÇÃO - RDC Nº 53/2015).....	10
Tabela 3. Núcleos atômicos e seus spins. (Introdução à Espectrometria - Tradução da 5ª ed. norte americana, 2015 - adaptado).	12
Tabela 4. Variáveis e níveis a serem estudados no planejamento.	19
Tabela 5. Condições cromatográficas do azoxistrobim.	21
Tabela 6. Condições cromatográficas do amicarbazona.	22
Tabela 7. Condições cromatográficas do picloram.	23
Tabela 8. Dados de RMN ¹ H e ¹³ C de Amicarbazona (CDCl ₃ / 400MHz).	25
Tabela 9. Dados de RMN ¹ H e ¹³ C da Impureza A de Amicarbazona (CDCl ₃ / 400 MHz e 100 MHz).....	31
Tabela 10. Dados de RMN ¹ H- ¹ H COSY da Impureza A de Amicarbazona.	33
Tabela 11. Dados de RMN ¹ H- ¹³ C HSQC da Impureza A de Amicarbazona.	34
Tabela 12. Dados de RMN ¹ H- ¹³ C HMBC da Impureza A de Amicarbazona.....	35
Tabela 13. Dados de RMN ¹ H e ¹³ C da Impureza B de Amicarbazona (CDCl ₃ / 400MHz e 100MHz).....	40
Tabela 14. Dados de RMN ¹ H- ¹ H COSY da Impureza B de Amicarbazona.	42
Tabela 15. Dados de RMN ¹ H- ¹³ C HSQC da Impureza B de Amicarbazona.	44
Tabela 16. Dados de RMN ¹ H- ¹³ C HMBC da Impureza B de Amicarbazona.	49
Tabela 17. Dados de RMN ¹ H e ¹³ C de Azoxistrobim (CDCl ₃ / 400MHz e 100 MHz).	53
Tabela 18. Dados de RMN ¹³ C de Picloram.....	59
Tabela 19. Dados de ¹³ C da Impureza A de Picloram (CDCl ₃ /100MHz)	62
Tabela 20. Dados de RMN ¹³ C da Impureza B de Picloram (CDCl ₃ /100MHz)	65
Tabela 21. Dados de RMN ¹³ C da Impureza C de Picloram (CDCl ₃ / 100MHz).	68
Tabela 22. Dados de RMN ¹³ C da Impureza D de Picloram (CDCl ₃ / 100MHz).	71
Tabela 23. Dados de RMN ¹³ C da Impureza E de Picloram (CDCl ₃ / 100MHz).....	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

HPLC: high pressure liquid chromatography.

Ibama : Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis.

ICH: International Conference on Harmonisation

LC/MS: Liquid chromatography on mass spectrometry

MAPA : Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

PDA: Photodiode Array.

RMN: Ressonância Magnética Nuclear.

UV-Vis: Ultra violeta na faixa do visível.

J: momento angular

I: Momento angular de spin

Z: Número atômico

A: número de massa

B: Campo magnético

T: Temperatura de amostra

TMS: Tetrametilsilano

RF: Radiofrequência

FID: Free Induction Decay

TF: Transformada de Fourier

1D: Unidimensional

2D: Bidimensional

RESUMO

ESTUDO DE DEGRADAÇÃO FORÇADA DOS AGROQUÍMICOS AZOXISTROBIM, AMICARBAZONA E PICLORAM, PROCEDENDO-SE A ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DOS PRODUTOS GERADOS PELA TÉCNICA DE RMN.

O consumo crescente de alimentos pela população, tanto no Brasil como no mundo, leva ao uso intensificado de agroquímicos nas grandes e pequenas lavouras. Segundo a Lei 7802/1989, agroquímicos são materiais resultantes de processos físicos, químicos ou biológicos destinados ao uso nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas. Dentre os principais problemas envolvendo agroquímicos, a falta de conhecimento sobre seu potencial poluidor e efeitos nocivos à saúde humana e meio ambiente são os mais preocupantes, além dos efeitos causados pelas impurezas destes compostos. Portanto, este trabalho visa evidenciar a formação e identificação das impurezas formadas - pela exposição do produto a diversos fatores como radiação UV, umidade, temperatura, pH do solo e sazonalidade da região de aplicação - a partir dos agroquímicos contendo os princípios ativos de Azoxistrobim, Amicarbazona e Picloram, a partir de estudos de degradação forçada preconizados pela ANVISA na RDC 045/ 2012. Após um estudo preliminar, identificaram-se as melhores condições de degradação, o tempo limite de incubação e montou-se o planejamento fatorial dos experimentos. Realizou-se triplicata de cada condição degradante e também triplicata dos tempos de coleta. As impurezas formadas foram isoladas, secas por rotoevaporação e analisadas por técnicas analíticas de cromatografia (LC e LC-MS) e ressonância magnética nuclear (1D e 2D). Para Azoxistrobim e Amicarbazona, foram geradas duas impurezas; para Picloram cinco. Estes resultados evidenciam que a formação de impurezas na degradação de agroquímicos é algo passível de ocorrer frequentemente, demandando maior atenção no seu uso, aplicação e estudo.

Palavras-chave: Degradação. Agroquímicos. Impurezas. Identificação. RMN.

ABSTRACT

FORCED DEGRADATION STUDY OF THE AGROCHEMICALS AZOXISTROBIM, AMICARBAZONA AND PICLORAM, THE STRUCTURAL ELUCATION OF THE PRODUCTS GENERATED BY THE NMR TECHNIQUE IS PROCESSED.

The growing consumerism of food by the population, both in Brazil and worldwide, leads to the intensified use of agrochemicals in large and small farms. In Brazil, according to Law 7802/1989, agrochemicals are materials resulting from physical, chemical or biological processes intended for use in the production, storage and processing of agricultural products. Among the main problems involving agrochemicals, the lack of knowledge about its polluting potential and harmful effects on human health and the environment are the most worrisome, besides the effects caused by the impurities of these compounds. Therefore, this work aims to show the formation and identification of the impurities formed - by exposing the product to several factors such as UV radiation, humidity, temperature, soil pH and seasonality of the application region - from the agrochemicals containing the active principles of Azoxistrobim, Amicarbazona and Picloram, from studies of forced degradation recommended by ANVISA in DRC 045 / 2012. After a preliminary study, the best degradation conditions, the incubation time-out, and the factorial design of the experiments were set up. Triplicate of each degrading condition was also performed, as well as triplicate of collection times. The impurities formed were isolated, dried by rotoevaporation and analyzed by chromatographic (LC and LC-MS) and nuclear magnetic resonance (1D and 2D) techniques. For Azoxistrobim and Amicarbazona, two impurities were generated; to Picloram five. These results show that the formation of impurities in the degradation of agrochemicals is something that can occur frequently, demanding greater attention in its use, application and stud.

Key words: Degradation. Agrochemicals. Impurities. Identification. NMR.

Sumário

1. Introdução.....	1
1.1. Panorama brasileiro	2
1.2 Substâncias de interesse.....	5
1.2.1 Azoxistrobim	5
1.2.2 Amicarbazona	6
1.2.3 Picloram.....	6
1.3 Ensaio de degradação forçada.....	7
1.4 Técnicas analíticas	11
1.4.1. A técnica de RMN	11
1.4.2 Deslocamento químico	12
1.4.3 Pulso de radio frequência	13
1.4.4 RMN bidimensional	14
2. Objetivo geral	17
2.1 Objetivo específico	17
3. Material e Métodos.....	18
3.3 Condução dos experimentos.....	20
3.4 Condições cromatográficas utilizadas	21
3.4.1 Azoxistrobim	21
3.4.2 Amicarbazona	22
3.4.3 Picloram.....	22
4. Resultados e Discussão.....	23
4.1 Amicarbazona.....	24
4.1.1 Amicarbazona – Impureza A.....	26
4.1.2 Amicarbazona – Impureza B	37
4.2 Azoxistrobim	51
4.2.1 Azoxistrobim – Impureza A	54
4.3. Picloram.....	58

4.3.1 Picloram – Impureza A.....	59
4.3.1 Picloram – Impureza B.....	63
4.3.2 Picloram – Impureza C.....	66
4.3.4 Picloram – Impureza D.....	69
4.3.5 Picloram – Impureza E.....	72
4.3.6 Rotas de degradação do Picloram.....	74
5. Conclusões.....	77
6. Referências Bibliográficas.....	79

1. Introdução

Vivemos atualmente em uma sociedade cuja demografia aumenta ano a ano, tornando-se necessário adaptar o meio ambiente ao redor para comportar as necessidades dos indivíduos.

A agricultura brasileira cresce e se moderniza anualmente, se tornando extremamente competitiva com o mercado estrangeiro. Isso requer expansão de terras cultiváveis, manejo do solo e a utilização eficaz de defensivos agrícolas. Este fato fica claro ao perceber-se a expansão crescente das indústrias produtoras de agroquímicos e na enorme gama de produtos patenteados anualmente para comércio no Brasil (GASQUES, 1997).

Os defensivos agrícolas ou agroquímicos são essenciais para garantir a produção elevada de grãos, além de garantir safras grandes e produtos com maior durabilidade. Porém, estes compostos podem apresentar diversos efeitos tóxicos e nocivos para o meio ambiente em que são aplicados e para o consumidor final, tornando-se então, um problema à saúde pública. Dentre estes problemas, pode-se citar, como alguns dos motivos responsáveis pela intoxicação tanto dos trabalhadores quanto do ambiente, o uso imprudente e descontrolado destes compostos, o medo da perda da produtividade da safra, a não utilização de equipamentos de proteção individual e o pouco conhecimento dos riscos. A aplicação descontrolada pode levar ao aparecimento de espécies resistentes ou até mesmo eliminar uma espécie definitivamente. Além disso, os resíduos das aplicações atingem os mananciais de água, solo e ar, podendo chegar aos alimentos comercializados nas cidades (GOMES, 2002).

De acordo com o Decreto nº 4.074/2002, os agrotóxicos, seus componentes e afins só podem ser produzidos, manipulados, importados, exportados, comercializados e utilizados no território nacional se previamente registrados no órgão federal competente, atendendo as diretrizes e exigências dos órgãos federais responsáveis pelos setores de agricultura, saúde e meio ambiente (BRASIL, 2002).

Por lei, os defensivos agrícolas devem obter a certificação de três órgãos do governo federal: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa), Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (Ibama) e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

Cada um desses órgãos realiza um determinado tipo de avaliação do produto, de modo independente do outro. Cabe ao Ibama a realização de um dossiê ambiental, no qual é avaliado o potencial poluidor do produto. Ao Mapa é atribuída a responsabilidade de avaliar a eficiência e o potencial de uso na agricultura, por meio de um dossiê agrônômico. Já a ANVISA realiza o dossiê toxicológico, avaliando o quão tóxico é o produto para a população e em quais condições o seu uso é seguro (ANVISA, 2008).

No Estado de São Paulo, nas culturas de cana-de-açúcar, café, milho, soja, algodão, cebola, feijão, tomate e outros, são utilizados comumente agroquímicos cuja base de ingrediente ativo são Azoxistrobim, Amicarbazona e Picloram. Esses produtos são comercializados a vários anos no Brasil, são patenteados e portanto sabe-se sobre seus efeitos toxicológicos, porém, pouco se sabe sobre a formação de impurezas após a aplicação e contato com fatores externos, como solo, temperatura, radiação e outros.

Os estudos de degradação forçada já são exigidos pela ANVISA para a comercialização de fármacos no território brasileiro. Espera-se que o mesmo aconteça com os agroquímicos de caráter técnico (produto com elevada pureza – acima de 96%) e de caráter formulado (produto com composição variável de acordo com a síntese), visto que assim como os fármacos, os agroquímicos são produtos poluentes, mutáveis e recalcitrantes nos organismos em que entra em contato (SILVA, 2009).

Neste sentido, faz-se necessário a condução dos estudos de degradação forçada para os agroquímicos, estudos que ainda não são realizados de modo obrigatório no Brasil, para avaliar a estabilidade dos produtos e como as impurezas possivelmente formadas podem afetar ainda mais a qualidade dos alimentos e da saúde humana, além dos efeitos nocivos causados no meio ambiente em que se formam e após serem lixiviados ou bioacumulados.

Assim, foram escolhidos três agroquímicos devido ao grande uso na agricultura para um estudo de degradação forçada de seus ingredientes ativos, visando identificar os produtos gerados através de técnicas analíticas, como cromatografia, infravermelho e RMN.

1.1. Panorama brasileiro

Devido a extensão territorial do país, a agricultura brasileira é um setor próspero e desenvolvimento que proporciona o crescimento das fronteiras agrícolas e a expansão da produção de alimentos tanto para o mercado interno quanto para o mercado internacional (ARAÚJO, 2005). A modernização de técnicas de plantio, manejo e colheita no campo são fatores decisivos para a competitividade do Brasil frente a outros países, garantindo o aumento da importância estratégica da produção de alimentos (NEGRI, 2005).

Além de máquinas e equipamentos de ponta, a agricultura se utiliza de uma grande diversidade de defensivos agrícolas para o manejo de suas culturas.

Defensivos agrícolas, ou agrotóxicos, são produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, sejam elas nativas ou

plantadas, e de outros ecossistemas de ambientes urbanos, hídricos e industriais. Têm a finalidade de alterar a composição da flora ou fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias de produtos empregados como desfolhantes, desseccantes, estimuladores e inibidores de crescimento (BRASIL, 2002). Podem ser classificados de acordo com seu uso (desfolhantes, repelentes e disseccantes); o organismo-alvo atingido (inseticidas, herbicidas, acaricidas, e outros); sua estrutura química (piretróides, atrazinas, organofosforados, organoclorados); mecanismo tóxico de ação (anticolinesterásicos, anticoagulantes) e toxicidade (referência no LD50 oral ou dérmico em ratos, recomendada pela Organização Mundial da Saúde) (HENAO & COREY, 1986).

Os agroquímicos são amplamente difundidos no Brasil e seu uso cresce ano a ano sendo os compostos de procedência nacional e chinesa os mais utilizados. No Brasil, mais de 300 princípios ativos e mais de 4.000 produtos comerciais e formulações de pesticidas estão no mercado e é grande e a demanda de novos pedidos de patentes junto aos órgãos competentes como ANVISA e Ministério da Agricultura.

Em 2009, o Brasil respondia por 15% (US\$ 7,2 bilhões) das vendas de agrotóxicos no planeta. Hoje, este número já está em US\$ 15 bilhões, com perspectiva de aumento para os próximos anos. Neste montante incluem-se produtos destinados à grãos, verduras, madeira, pastagens, árvores frutíferas e a silvicultura (PELAEZ, 2012).

A permanência dos agrotóxicos nas diversas matrizes (água, ar, solo) depende diretamente de variáveis provenientes do próprio agroquímico ou da mistura de compostos, como estrutura, tamanho, forma molecular, orientação no espaço e também a presença ou ausência de grupos funcionais (MANAHAN, 1994). Os fatores ambientais que mais afetam a absorção e a biodistribuição dos agroquímicos nos diversos organismos envolvidos são: flutuações na temperatura, interações com poluentes, composição da matéria orgânica (tipo de solo ou sedimento), pluviosidade, pH e salinidade (MOREIRA, 2002).

Estes compostos, apesar de serem formulados com o propósito de ação contra organismos prejudiciais à agricultura, podem também afetar direta ou indiretamente outros organismos, em função da toxicidade do ingrediente ativo e/ou das substâncias que compõem a formulação comercial. Na maioria dos casos, afeta principalmente pequenos agricultores, que muitas vezes não possuem informações suficientes sobre dosagem, forma de aplicação, repetibilidade da dose, equipamentos de proteção e descarte da embalagem, fatos preocupantes ao que tange o aplicador, o produto final e principalmente a contaminação do meio ambiente.

Três classes de produtos concentram 90% do volume de vendas no país: inseticidas, herbicidas e fungicidas. Em relação à toxicidade, 49% dos produtos comercializados são

classificados como risco ambiental classe III (produto perigoso), 38% como classe II (muito perigoso), 12% como classe IV (pouco perigoso) e 1% como classe I (altamente perigoso), devendo constar em suas embalagens advertências e instruções de manejo, bem como o receituário agronômico (IBAMA, 2010).

Os agroquímicos constituem a principal classe de poluentes nas agriculturas da atualidade. Eles atingem o solo por aplicação direta ou por transferência de resíduos lixiviados das plantas. A disponibilidade do composto depende da sua formulação, como produto técnico (elevada pureza) ou produto formulado; disposto em grânulo, partícula ou gotícula. A decomposição e transporte dos agrotóxicos no solo estão relacionados às propriedades físico-químicas das moléculas, como pressão de vapor, coeficiente de partição (K_{ow}) e estabilidade química (LACORTE, 1995).

Geralmente, a decomposição leva a uma diminuição significativa da toxicidade do agroquímico. Porém, em alguns casos, tal processo pode levar a um aumento da toxicidade, por isomerização ou pela formação de novos compostos, conhecidos como impurezas. Algumas impurezas já são conhecidas da rota de síntese do agroquímico, porém com o processo de decomposição, elas podem elevar sua concentração no solo, tornando-se extremamente nocivas. Compostos com baixa solubilidade em água (elevado K_{ow}) tendem a ser fortemente absorvidos pela superfície da argila e acumulados na matéria orgânica do solo, sendo disponibilizada apenas uma pequena concentração na água infiltrada no solo (KAVLOCK, 1996).

Embora sejam prejudiciais à saúde e recalcitrantes nos alimentos, o uso de agroquímicos se faz necessário para garantir a qualidade do produto comercial e por possibilitarem a produção de grande quantidade de alimentos, necessários para atender a demanda cada vez maior. A translocação do agroquímico pode ser considerada como de contato ou sistêmico. Os de contato agem nos tecidos onde entrou em contato, enquanto os sistêmicos agem em diferentes sítios através do floema e xilema. Já a classificação, é de acordo com o mecanismo de ação que o agroquímico desempenha na planta (SILVA; SILVA, 2007; LORENZI, 2006).

A eficácia de um herbicida está estreitamente relacionada à magnitude do processo de absorção, que é limitada pela quantidade de produto que atravessa a cutícula da folha e condições ambientais, como temperatura, umidade do solo e umidade relativa do ar (DEVINE et al., 1983).

É imprescindível o conhecimento do mecanismo de ação de cada herbicida para se trabalhar com segurança o rodízio e a mistura de herbicidas, quando necessários, prevenindo assim o aparecimento de novas espécies ou plantas resistentes (FERREIRA et.al., 2005).

1.2 Substâncias de interesse

1.2.1 Azoxistrobim

O azoxistrobim (N° CAS: 131860-33-8). Nome químico: metil (E)-2-{2-[6-(2-cianofenóxi)piridina-4-oxi]fenil}-3-metacrilato. Fórmula molecular: $C_{22}H_{17}N_3O_5$, Massa molar: 403,394 g/mol, é um fungicida geralmente aplicado nas folhas das culturas e é utilizado numa gama de alimentos, como alface, algodão, alho, amendoim, arroz, aveia, banana, batata, beterraba, café, cebola, cenoura, cevada, citros, couve-flor, feijão, figo, goiaba, mamão, manga, melancia, melão, milho, morango, pepino, pêsego, pimentão, soja, tomate, trigo e uva (ANVISA, 2008). Sua estrutura molecular está exemplificada na Figura 1.

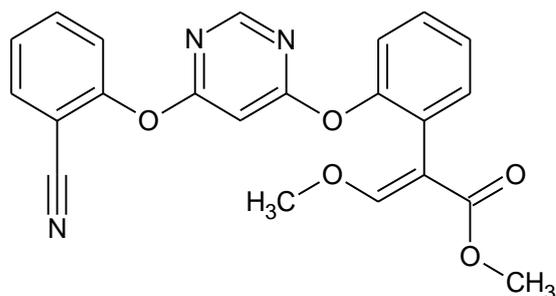


Figura 1. Estrutura molecular do Azoxistrobim (e-Pesticide, 2017).

Atua inibindo a respiração mitocondrial, ao bloquear o fluxo de elétrons do citocromo b para o citocromo c1. Os inibidores de respiração mitocondrial privam o organismo de seu principal produto, o ATP. A cadeia transportadora de elétrons é uma das etapas respiratórias para produção de ATP e pode ser fracionada em quatro componentes, cada um associado com uma atividade característica: Complexo I: NADH Coenzima Q; Complexo II: Succinato Coenzima Q; Complexo III: Coenzima Q Citocromos (b c1 c) e Complexo IV: Citocromos (b c1 c) Citocromos (a a3) O_2 (VENÂNCIO et al, 1999).

O Azoxistrobim também inibe a germinação de esporos e o crescimento micelial (E-Pesticide Manual, 2017).

Em humanos, o contato com azoxistrobim pode causar irritação nas mucosas e ardência nos olhos.

1.2.2 Amicarbazona

O amicarbazona (Nº CAS: 129909-90-6). Nome químico: 4-amino-N-terc-butil-4,5-dihidro-3-isopropil-5-oxo-1H-1,2,4-triazol-1-carboxamida. Fórmula molecular: $C_{10}H_{19}N_5O_2$, Massa molar: 241,295 g/mol, é um herbicida absorvido pelas raízes e folhas das plantas, pertencente ao grupo dos inibidores da fotossíntese bioquímica (matando a planta daninha por falta de alimento e nutrientes). O Amicarbazona é utilizado principalmente nas culturas de cana-de-açúcar e milho, como pré e pós emergência de plantas daninhas.

Em humanos, o contato com Amicarbazona pode causar irritação nas mucosas e ardência nos olhos. Sua estrutura molecular está exemplificada na Figura 2.

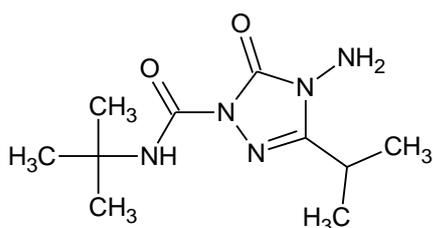


Figura 2. Estrutura molecular do Amicarbazona (e-Pesticide Manual, 2017).

1.2.3 Picloram

O picloram (Nº CAS: 1918-02-1). Nome químico: ácido 4-amino-3,5,6-tricloropiridina. Fórmula molecular: $C_6H_3Cl_3N_2O_2$. Massa molar: 241,46 g/mol, é um herbicida sistêmico seletivo, absorvido rapidamente pelas raízes e folhas, usado principalmente para o manejo de vegetação indesejada em plantações, pastagens, silvicultura e até mesmo terrenos não cultivados. O Picloram também é utilizado nas culturas de cana-de-açúcar, arroz e trigo. Por ser um herbicida utilizado em pastagens, ocorre contaminação do leite das vacas por este agroquímico (ANVISA, 2007).

Em humanos, o contato com Picloram pode causar irritação nas mucosas, ardência nos olhos, dificuldade para respirar e descamação das mãos. Sua estrutura molecular está exemplificada na Figura 3.

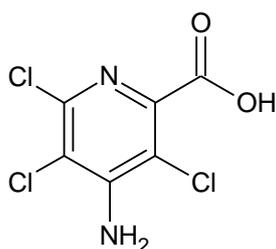


Figura 3. Estrutura molecular do Picloram (e-Pesticide Manual, 2017).

1.3 Ensaios de degradação forçada

No Brasil, não há legislação vigente acerca de estudos de degradação em agroquímicos. Em alguns casos, é exigido apenas o teste de degradação em luz (fotolítico), fato preocupante visto a demanda crescente de uso dos mesmos no país.

Neste sentido, optou-se por seguir as condições de degradação de fármacos preconizadas pela ANVISA nos testes de degradação forçada dos agroquímicos, com alterações, quando pertinente. Em vigor no Brasil atualmente estão a RDC 53/2015, o Guia Prático nº4/2015, e mais atualmente a RDC 166/2017.

O teste de degradação forçada é definido como ensaio de estabilidade para fármacos e medicamentos sob condições extremas, muito mais do que aquelas utilizadas para o estudo de estabilidade acelerada (KLICK et al., 2005; SILVA et al., 2009; BRASIL, 2012). O principal objetivo do teste de degradação forçada é a previsão do prazo de validade e as condições de estocagem do medicamento.

Embora o conceito do estudo de degradação forçada não seja novo para a indústria farmacêutica, o procedimento para sua realização nunca foi claramente definido pelo guia de estabilidade do ICH, nem pelas resoluções da ANVISA. Devido à falta dessas informações detalhadas, a realização do teste sofre variações extremas nos procedimentos utilizados pelas companhias farmacêuticas e pelos centros de estudos independentes para a obtenção dos resultados, sendo observada a condução dos estudos sem respaldo científico, levando a resultados muitas vezes duvidosos e/ou errôneos (SILVA, 2009).

A Tabela 1 abaixo apresenta as condições de estresse especificadas pela ANVISA, que devem ser aplicadas na forma farmacêutica final.

Estas condições são empregadas para retratar o mais fiel possível as condições em que um medicamento pode ser exposto, contemplando todas as etapas da vida útil do medicamento, como manufatura, disposição no blister, transporte, estocagem, distribuição / venda e armazenagem final.

Tabela 1. **Condições de estresse para o estudo de degradação forçada.** (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, RESOLUÇÃO - RDC Nº 45/2012 – adaptado).

Aquecimento	60°C
Umidade	75% UR ou >
Solução ácida	0,1M HCl
Solução básica	0,1M NaOH
Solução oxidativa	3% H ₂ O ₂
Fotolítica	UV-B fluorescente
Íons metálicos	0,05M Fe ²⁺ ou Cu ²⁺

Para cada região do globo terrestre há uma tabela específica com os valores das condições ideais para os medicamentos naquele local. O Brasil é classificado como país de clima quente e úmido, com intensa luminosidade, portanto, as condições são moldadas de acordo com o clima dominante da região.

Os testes devem degradar o analito em no máximo 10% de sua concentração inicial, promovendo suporte para o desenvolvimento e validação da metodologia de análise dos produtos de degradação formados e para análise crítica do perfil de degradação do medicamento, que deve ser passível de verificação da pureza cromatográfica do pico de interesse (BRASIL, 2012). Assim, espera-se o mínimo de degradação dos agroquímicos de 10%, visto que são produtos técnicos, de elevada pureza e estabilidade (Figura 4).



Figura 4. Relação entre perfil de degradação "potencial", obtido no estudo de estabilidade acelerada, e o perfil de degradação "real", obtido no estudo de estabilidade de longa duração. (Agência Nacional de Vigilância Sanitária Guia Prático nº 4/2015).

A Figura 4 exemplifica as etapas que um material deve atender para obter certificação. Nota-se que a Degradação Forçada engloba todas as demais, pois oferece um resultado estimado preciso acerca da vida útil do material, e pode ser obtido em apenas 20 dias. A Estabilidade acelerada permite o conhecimento mais profundo dos materiais e a assertividade nos dados referentes a teor e atividade biológica; nesta etapa, o tempo de estudo é prolongado por volta de 3 meses. A Degradação Real é realizada em casos raros, devido ao custo oneroso e a elevada demanda do mercado consumidor.

Os estudos de degradação geram as impurezas que podem ter origem na degradação do ingrediente ativo durante a estocagem ou provenientes da rota de síntese. Essas impurezas podem ser tóxicas ao organismo humano e extremamente danosas à cadeia trófica (REYNOLDS, 2002).

Em 2013, a ANVISA publicou a Resolução RDC nº 58, que estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos e similares. Estes parâmetros são estipulados considerando o limite de identificação como o valor acima do qual um produto de degradação deverá ter sua estrutura química identificada; limite de notificação como o valor acima do qual um produto de degradação deverá ser reportado no estudo de estabilidade e limite de qualificação como o valor acima do qual um produto de degradação deverá ser avaliado biologicamente.

A Tabela 2 contempla os limites para cada uma das definições de acordo com a dose diária. De acordo com a dose máxima diária há a porcentagem de impurezas que podem ser formadas ao término do estudo de degradação. Quando este limite é excedido, se o produto ainda não estiver disponível para comercialização, a empresa formuladora é contata para tomada de decisão acerca de como proceder; se o produto já estiver para comercialização, a Anvisa é notificada e na maioria dos casos o produto é retirado do mercado.

A legislação permite a análise dos resultados em porcentagem e em unidade de massa, o que permite uma alternativa aos fabricantes, sem precisar recorrer a alterações na formulação para atender aos parâmetros exigidos na norma.

Tabela 2. **Parâmetros para notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação segundo a dose diária** (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, RESOLUÇÃO - RDC Nº 53/2015).

	Dose máxima diária¹	Limites ²
Limites de notificação	≤ 1 g	0,10%
	> 1 g	0,05%
Limites de identificação	< 1 mg	1,0% ou 5µg ITD, o que for menor
	1 mg – 10 mg	0,5% ou 20 µg ITD, o que for menor
	>10 mg – 2 mg	0,2% ou 2mg ITD, o que for menor
	>2g	0,10%
Limites de qualificação	<10 mg	1,0% ou 50µg ITD, o que for menor
	10 mg – 100 mg	0,5% ou 200µg ITD, o que for menor
	>100 mg – 2g	0,2% ou 3mg ITD, o que for menor
	>2g	0,15%

1-Quantidade máxima do insumo farmacêutico ativo administrado por dia

2-Limites dos produtos de degradação são expressos como a porcentagem do insumo farmacêutico ativo ou como ingestão total diária (ITD) de um produto de degradação.

Na literatura há diversos artigos sobre degradação de fármacos, que evidenciam a importância destas análises para controle de qualidade de fármacos, segurança, eficácia, nova patente ou renovação de licença para comércio (MOREIRA, et. al, 2017). Os trabalhos abordam as técnicas analíticas em conjunto, onde uma serve para complementar o resultado da outra e ajudar na elucidação da estrutura final da impureza, reforçando a importância crucial da técnica de RMN para tal (MAGGIO, et. al, 2014).

Fármacos para tratamento de tumores são os mais estudados como os fármacos vimblastina e bicalutamida. Por se tratarem de remédios que matam células dentro do organismo humano, os fármacos antitumorais são expostos a condições mais severas de degradação, como elevadas temperaturas (acima de 120°C), a fim de obter o máximo de impurezas e em boa quantidade para caracterização (SINGH, et. al, 2013). Nestes casos, as próprias impurezas são estudadas como agentes antitumorais (GOROG, 2015).

Para os agroquímicos, será considerado neste trabalho somente o limite de identificação e utilizando a maior dose (acima de 2g), já que a dosagem depende de fatores como extensão da área, grau de contaminação, entre outros.

Com os resultados obtidos, espera-se mensurar os efeitos toxicológicos acrescidos nos agroquímicos quando estes passam para a fase de degradação in loco e assim chamar atenção para um problema antigo e recorrente.

1.4 Técnicas analíticas

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) vem sendo amplamente utilizada nos estudos de estabilidade, pois frequentemente é necessária a separação de múltiplos componentes na mesma amostra. Quando lidamos com uma molécula nova ou uma cuja patente não esteja vigente, o perfil de degradação não é de conhecimento público, sendo necessária a análise por HPLC, geralmente acoplado a um detector Photodiode Array (PDA), para a obtenção dos espectros UV-Vis de todos os componentes presentes na amostra. Este detector permite fazer uma varredura de todos os comprimentos de onda em que o analito absorve a radiação Ultravioleta, o que permite identificar a região de melhor absorção e resposta analítica do mesmo. Também é possível trabalhar com a técnica de LC-MS, para obter a massa molecular dos componentes formados e, também, estimar a quantidade de impurezas de degradação (ALCÂNTARA, et AL, 2013).

Entretanto, um fator limitante da técnica de cromatografia líquida é que a molécula original e seus produtos de degradação devem ser solúveis nos solventes compatíveis com tal técnica. Além disso, se deve proceder a um pré-tratamento das amostras quando as mesmas estiverem em meio ácido ou básico, para preservação da coluna cromatográfica. (HOTHHA, 2013).

Os produtos de degradação de estrutura desconhecida são quantificados a partir de uma curva de calibração do próprio ingrediente ativo, considerando-se que estas impurezas possuem estrutura química muito parecida com a estrutura do ativo. É possível obter o analito correto por meio de técnicas de extração e purificação, porém, estes processos são longos e onerosos para as indústrias (HOTHHA, 2013). Uma alternativa para solucionar estes problemas é o uso da técnica de ressonância magnética nuclear (RMN), pois é versátil e não é uma técnica dependente de uma matriz sólida.

A técnica de RMN se faz extremamente útil e eficaz nas diversas indústrias devido ao fato de em pouco espaço de tempo, serem lançados nos mercados diversas moléculas novas, como medicamentos, ração, vacinas, com substâncias químicas diferentes e novas, o que prejudica as metodologias existentes, que muitas vezes não se aplicam aos novos produtos. O RMN permite o conhecimento da estrutura química da molécula, fato que ajuda na elucidação de mecanismos e entendimento de fatores como toxicidade, afinidade, partição e outros. Assim, a técnica de RMN é aplicável aos perfis de impurezas sem a necessidade de separação prévia (quando em matriz limpa), fato que facilita e otimiza os estudos de degradação forçada (ISLER, 2014).

1.4.1. A técnica de RMN

Ressonância Magnética Nuclear é um fenômeno que ocorre quando o núcleo de certos átomos está imerso em um campo magnético estático e exposto a um segundo campo magnético

oscilante. Alguns núcleos experimentam este fenômeno, e outros não, dependendo se eles possuem uma propriedade chamada spin nuclear, que pode ser pensado como um pequeno campo magnético, e que irá fazer com que o núcleo passe a produzir um sinal de RMN, ou seja, é capaz de interagir diretamente com campos magnéticos (SILVERSTEIN, 1995).

Prótons, elétrons desemparelhados e nêutrons possuem spin com uma rotação de $1/2$. Quase todos os elementos na tabela periódica tem um isótopo com uma rotação diferente do zero nuclear e portanto, podem ser analisados pela técnica de RMN.

Alguns dos núcleos rotineiramente utilizados no RMN estão listados abaixo na Tabela 3 (SILVERSTEIN, 1995).

Tabela 3. **Núcleos atômicos e seus spins.** (Introdução à Espectrometria - Tradução da 5ª ed. norte americana, 2015 - adaptado).

Núcleo	Prótons desemparelhados	Nêutrons desemparelhados	Spin	γ (MHz/T)
^1H	1	0	$1/2$	42.58
^2H	1	1	1	6.54
^{31}P	1	0	$1/2$	17.25
^{23}Na	1	2	$3/2$	11.27
^{14}N	1	1	1	3.08
^{13}C	0	1	$1/2$	10.71
^{19}F	1	0	$1/2$	40.08

Núcleos que possuem número atômico (Z) e número de massa (A) pares, por exemplo, o $^{12}\text{C}_6$ e o $^{16}\text{O}_8$, sempre apresentam I nulo e por isso não são detectados em RMN. Núcleos que têm Z ímpar e A par, por exemplo, o $^{14}\text{N}_7$ e o $^2\text{H}_1$, possuem I inteiro. Núcleos que possuem A ímpar possuem $I=1/2$, $I=3/2$ ou $I=5/2$, por exemplo, o $^1\text{H}_1$, $^{23}\text{Na}_{11}$ e o $^{17}\text{O}_8$ respectivamente (SILVERSTEIN, 1995).

1.4.2 Deslocamento químico

O deslocamento químico representa a dependência de uma frequência de absorção característica de um núcleo com a nuvem eletrônica que o cerca. Quando uma molécula é inserida em um campo magnético, os elétrons que a rodeiam protegem o núcleo dos efeitos do campo. Essa proteção é chama de blindagem e varia de acordo com a posição e a densidade eletrônica sob este núcleo na molécula. Assim, tudo que afeta a densidade eletrônica na molécula, também altera o efeito de blindagem (SILVERSTEIN, 1995).

Portanto, quanto maior for o valor da blindagem, menor será o valor do deslocamento químico, pois quanto maior a densidade eletrônica próxima do núcleo em estudo, maior é a blindagem, ou seja, maior é a proteção em relação ao campo aplicado. Portanto, cada átomo apresentará um valor único de deslocamento, e distinto do deslocamento dos demais átomos presentes na molécula (SILVERSTEIN, 1995).

A grandeza deslocamento químico é a maneira mais comum de representar a influência da constante de blindagem, σ , para que os dados de frequência não tenham que ser relacionados com o campo magnético utilizado.

Comumente analisa-se um espectro de RMN usando um material de referência como padrão, medindo-se o deslocamento químico dos núcleos da amostra de interesse em relação ao padrão interno. Em RMN de ^1H e ^{13}C o padrão mais utilizado é o Tetrametilsilano (TMS), pois é uma molécula simétrica e mais blindada que a maioria dos compostos orgânicos existentes, é solúvel na maior parte dos solventes orgânicos, é relativamente inerte, estável, tem baixo custo, além de apresentar um único sinal intenso e agudo no espectro, marcado geralmente como o zero da escala (SILVERSTEIN, 1995).

1.4.3 Pulso de radio frequência

Na condução de um experimento de RMN é necessário que a magnetização através da molécula saia do estado de equilíbrio. Isto ocorre quando um segundo campo magnético é aplicado perpendicular ao campo magnético estático B_0 e oscilante no plano transversal com uma frequência igual à frequência de Larmor. Assim, esse segundo campo é chamado de campo de radiofrequência (Br). Dessa forma, é gerado um campo magnético B resultante da aplicação simultânea dos campos magnéticos estáticos e de radiofrequência (RF). Aplicando-se um pulso de RF durante um curto período de tempo (da ordem de mili ou μs) ou alterando-se a orientação da magnetização, pode-se alterar a população dos níveis de energia e assim retirar o sistema de spins do estado de equilíbrio (SILVERSTEIN, 1995).

A livre precessão após o pulso de RF faz surgir o sinal conhecido como FID (Free Induction Decay) que após o tratamento matemático da Transformada de Fourier (TF) gera um espectro cuja intensidade de sinal é proporcional ao número de spins que formam a magnetização resultante em função da frequência (SILVERSTEIN, 1995).

Para o estudo de degradação, espera-se uma mistura de componentes na amostra, devido a elevada quantidade de compostos presentes e que podem ser gerados. Assim, a técnica de RMN é extremamente útil na identificação de tais compostos.

A espectroscopia de RMN ^1H é bastante sensível devido a abundância natural do isótopo (99,98%) e alta razão giromagnética [26,75 rad (sT)], porém a faixa espectral onde se observam os sinais são de aproximadamente 20 ppm, enquanto os sinais da maior parte dos compostos orgânicos apresentam-se entre 0 e 8 ppm. Para o núcleo de ^{13}C , as frequências de ressonância são obtidas na faixa de 0 a 220 ppm, com sinais mais dispersos entre si, porém a abundância isotópica e a razão giromagnética são baixas (1,1% e 0,25% da razão giromagnética do ^1H), deixando a espectroscopia de ^{13}C bem menos sensível (SILVERSTEIN, 1995).

Aplicando-se campos magnéticos altos pode ser possível alcançar a sensibilidade e resolução adequada ao estudo de interesse, mas em espectros de RMN de amostras muito complexas e “suja”, os sinais podem continuar sobrepostos mesmo utilizando um equipamento de 800 MHz.

A técnica de RMN passa por inúmeros avanços tecnológicos desde sua criação, como o aumento do campo magnético, permitindo melhorias significativas na sensibilidade, o que é excelente para o estudo de impurezas que geralmente estão presentes nas amostras em concentrações extremamente baixas. Também houve melhorias com a introdução de funções de apodização no processamento do FID, melhorias na eletrônica da sonda de RMN, melhorias nos pré-amplificadores, melhorias nos detectores de quadratura, digitalização em alta frequência, entre outros (INKEMIA BRASIL, 2016).

1.4.4 RMN bidimensional

Não tão difundida quanto a técnica unidimensional (1D), outro recurso para a elucidação estrutural quando há sinais sobrepostos são os espectros bidimensionais (2D), que traçam mapas da correlação entre os núcleos envolvidos e através da correlação obtém-se o deslocamento químico que não seria obtido em um mesmo campo magnético se o espectro fosse unidimensional (SILVERSTEIN, 1995).

As técnicas 2D permitem correlacionar hidrogênios e/ou carbonos que possuam alguma relação escalar ($^n\text{J}_{\text{H,H}}$, $^n\text{J}_{\text{C,H}}$, $^n\text{J}_{\text{C,C}}$) ou espacial (H,H- ou H,C-NOE) entre si. Desta forma é possível fazer um mapeamento estrutural mais preciso do que utilizando somente as técnicas 1D e dados de possíveis compostos similares na literatura (SILVERSTEIN, 1995).

As técnicas 2D mais difundidas são: COSY (homonuclear COrrelation SpectroscopY) – com esta técnica pode-se estabelecer as correlações entre os hidrogênios que estão acoplados por 2-3 $\text{J}_{\text{H,H}}$ (acoplamentos geminais e vicinais, mensuráveis no espectro 1D) e assim discernir a multiplicidade dos sinais observados no espectro de RMN ^1H . Eventualmente, sinais devidos a 4-6 $\text{J}_{\text{H,H}}$ são também visíveis (acoplamentos a longa distância, raramente mensuráveis no espectro 1D) (CROASMUN, 1994).

COSYLR (COSY for Long Range couplings) – uma variante do COSY, mas neste caso, evidenciando as correlações devido a acoplamentos à longas distâncias. Em geral, as correlações devidas a acoplamentos 2-3 $J_{H,H}$ também estão presentes no espectro, mas consideravelmente minimizadas (BRAUM, 1996).

DQF-COSY (Double Quantum Filter-COSY) – outra variante do COSY, sendo que neste caso os sinais da diagonal estão ausentes ou, no mínimo, bastante minimizados. É muito útil para observar correlações de hidrogênios com δH muito próximos uns dos outros. Outro fator positivo é o de que muitas correlações devido a acoplamentos à longas distâncias 4- 6 $J_{H,H}$ ficam visíveis (SILVERSTEIN, 1995).

TOCSY (TOtal Correlation SpectroscopY) – tem o aspecto de um COSY, mas as correlações envolvem a condição HOmonuclear HArtmann-Hahn (HOHAHA). Em uma visão simplificada, revela correlações entre hidrogênios não necessariamente acoplados, mas que possuem um hidrogênio vizinho comum ao qual ambos estão acoplados. É uma técnica muito útil na análise de compostos que possuem um carbono sem hidrogênios ou um heteroátomo, separando dois subsistemas na mesma molécula (CROASMUN, 1994).

NOESY (Nuclear Overhauser Enhancement SpectroscopY) – também tem o aspecto de um COSY, contudo as correlações envolvem interações devidas ao NOE entre os hidrogênios que estão espacialmente próximos (em geral, menor do que 4 Å). Através desta técnica é possível estabelecer a configuração relativa de cada hidrogênio na molécula e geralmente a geometria molecular como um todo. A mesma informação pode ser obtida da difração de Raio-X, mas apenas para compostos na forma de um sólido cristalino (SILVERSTEIN, 1995).

HETCOR (HETeronuclear CORrelation spectroscopy) – com este experimento pode-se assinalar os carbonos que contém hidrogênios. O espectro é apresentado com o eixo horizontal (dimensão F2) correspondendo aos δC e o eixo vertical (dimensão F1) correspondendo aos δH (DEROME, 1994).

COLOC (CORrelation spectroscopy for LONg-range Couplings) – o espectro é apresentado como um HETCOR contudo as correlações referem-se aos acoplamentos de carbono-hidrogênio ($n > 2$). Infelizmente os sinais devidos aos acoplamentos via 1 ligação estão invariavelmente presentes, o que torna imprescindível um experimento HETCOR prévio. As informações obtidas das correlações carbono-hidrogênio são muito importantes em uma determinação estrutural, principalmente para estabelecer a posição de carbonos não hidrogenados (HARRIS, 1997).

Apesar das vantagens em termos de informações estruturais que as técnicas 2D tradicionais oferecem, o tempo necessário para executar certos experimentos, principalmente os heteronucleares, sempre foi uma grande limitação. Por exemplo, para obter um espectro HETCOR e

um COLOC em um equipamento de 7.05 Tesla (300 MHz para o ^1H), de uma amostra de 10 mg com massa molecular $\sim 500\text{u}$, o pesquisador necessitaria dispor de 48h/máquina! (SILVERSTEIN, 1995).

Assim, neste trabalho serão utilizadas as técnicas de RMN ^1H e ^{13}C 1D, COSY, HMBC, HSQC.

2. Objetivo geral

O presente estudo teve como objetivo realizar a degradação forçada dos agroquímicos contendo os princípios ativos de azoxistrobim, amicarbazona e picloram, avaliar as possíveis impurezas geradas e proceder-se a caracterização estrutural.

2.1 Objetivo específico

- Planejar um método de degradação que atenda aos agroquímicos;
- Realizar os ensaios de degradação forçada nas melhores condições previamente definidas;
- Coletar e purificar as impurezas geradas;
- Proceder na elucidação estrutural utilizando as técnicas de LC/MS, RMN e outras, caso seja necessário;
- Capacitar o mestrando na avaliação e identificação dos espectros de massas e RMN, prevendo com assertividade a estrutura molecular em questão.

3. Material e Métodos

3.1 Equipamentos e reagentes utilizados

Para realização deste trabalho foram utilizados os seguintes equipamentos:

- Cromatógrafo líquido com bomba quaternária – Agilent – Modelo 1260.
- Cromatógrafo líquido acoplado ao espectrômetro de massas triplo quadrupolo Triple Quad – Agilent – Modelo 1260 / 5500.
- Incubadora específica para luz UV- Nova Ética - Modelo 424/CF.
- Câmara climática - American Lab – Modelo AL 5000.
- Evaporador rotativo – Marconi - Modelo MA 120.
- Ressonância magnética nuclear 400 MHz – Bruker - Modelo DRX40.

Reagentes e soluções:

- Ácido clorídrico 1M – Merck – Concentração: 37%
- Solução de hidróxido de sódio – Merck – Concentração: 0,1N
- Água ultra pura produzida no laboratório
- Peróxido de hidrogênio – Synth- Concentração: 30%.
- Sulfato de cobre hidratado – Anidrol – Concentração: 98%
- Cloreto de ferro hidratado – Synth – Concentração: 97%
- Acetonitrila – Merck - Concentração: grau HPLC.
- Ácido fórmico – Synth – Concentração: PA.
- Metanol – Merck – Concentração: grau HPLC.
- Acetona – Merck – Concentração: grau HPLC.
- Clorofórmio – Merck - Concentração: grau HPLC.

Os métodos adotados para degradação forçada foram baseados nas Resoluções da ANVISA, RDC n°45 e RDC n° 53 para o tratamento das amostras sob as condições preconizadas nas mesmas. À medida que os experimentos foram realizados, os espectros de massas e RMN obtidos foram utilizados para monitorar a proporção dos sinais relativos dos produtos de degradação em relação à molécula original.

O processo de degradação foi mantido no intervalo de 10% a 30% de degradação da molécula original, para se evitar degradações múltiplas ou degradação total da amostra.

Para todos os tipos de tratamento 3g de amostra foram incubadas em balão volumétrico de 20 mL. Para os estudos de degradação fotolítica e umidade/temperatura, a amostra foi incubada seca. Para os demais testes, adicionou-se 10% do volume final do balão volumétrico do solvente degradante e então, incubou-se à temperatura ambiente de 20°C.

Para todos os testes, realizou-se inicialmente um experimento para a certificação dos parâmetros cromatográficos com uma solução de 1000 ppm (10 mg de amostra em 10 mL de solvente) da amostra diluída em acetonitrila.

Os reagentes utilizados nas condições ácidas e básicas foram ácido clorídrico 1M e solução de hidróxido de sódio 0,1N respectivamente. O ácido clorídrico foi diluído em água ultra pura gerar solução com concentração final de 0,1 M.

Como meio de reação oxidante utilizou-se peróxido de hidrogênio diluído em água ultra pura para a concentração de 3%.

Para a reação com íons metálicos, utilizou-se solução 50:50 (v/v) de sulfato de cobre hidratado e cloreto de ferro hidratado.

3.2 Planejamento Fatorial

Realizou-se um planejamento fatorial (Tabela 4) com as condições de degradação preconizadas pela ANVISA (RDC N° 45/2012) descritas na Tabela 1, com o intuito de avaliar as melhores variáveis para a eficácia do processo de degradação para cada composto.

Para cada princípio ativo, realizou-se triplicata dos ensaios para as variáveis e para os tempos, sendo o tempo zero considerado como branco da análise.

Tabela 4. **Variáveis e níveis a serem estudados no planejamento.**

Variáveis	Níveis
Aquecimento	60°C
Umidade	75% UR ou >
Solução ácida	0,1M HCl
Solução básica	0,1M NaOH
Solução oxidativa	3% H ₂ O ₂
Fotolítica	UV-B fluorescente
Íons metálicos	0,05M Fe ²⁺ ou Cu ²⁺

Assim, foram gerados um total de 189 experimentos, sendo 63 de cada princípio ativo no total, com duração de 10 dias cada, realizando-se coletas nos tempos 0, 5 e 10 dias.

Os experimentos fotolíticos foram realizados em incubadora específica, com potência de luz 10000 luz/hora, por um total de 240 horas.

3.3 Condução dos experimentos

Para cada agroquímico e cada condição experimental, foram realizados todos os experimentos em triplicata.

Nos experimentos de solução ácida, básica, oxidativa e íons metálicos, adicionou-se 10% do volume final da solução em questão e deixou-se em repouso até as datas das coletas em sala com temperatura controlada de 20°C.

Também preparou-se experimentos controles (brancos) de cada condição degradante, pesando-se 3g de amostra para balão volumétrico de 20 mL. Após a mistura de cada solvente (de acordo com a condição degradante), os experimentos controles foram filtrados em PVDF 0,22 µm e transferidos para vial, para injeção no cromatógrafo.

Ao término do período de incubação, completou-se o volume do balão com a solução neutralizante da inicial, nos casos das degradações ácida e básica (por exemplo, se havia 10% de ácido clorídrico no balão volumétrico, completou-se o volume com solução de hidróxido de sódio). Para as demais degradações, completou-se o volume com Acetonitrila.

Após a neutralização da reação, o extrato foi filtrado em Filtro Millex PVDF 0,22 µm, e coletou-se as impurezas formadas com o auxílio de um HPLC.

Em seguida, as mesmas foram tratadas com clorofórmio e rotoevaporadas para a obtenção do pó da impureza.

Procedeu-se então, as análises por HPLC/MS, e RMN. Para análise no equipamento de RMN, as impurezas foram diluídas em metanol e clorofórmio deuterados, de acordo com sua melhor solubilidade.

Para o cálculo da quantidade de impureza formada, utilizou-se a equação abaixo:

$$\text{Degradação (m/m)} = \frac{(\% \text{ impureza formada x massa do ativo})}{\% \text{ do ativo na amostra}} \quad (1)$$

3.4 Condições cromatográficas utilizadas

As amostras foram eluídas de acordo com as tabelas abaixo e analisadas inicialmente em cromatógrafo líquido e posteriormente em cromatógrafo líquido acoplado a um espectrômetro de massa.

3.4.1 Azoxistrobim

Para o agroquímico Azoxistrobim, as condições cromatográficas estão na Tabela 5, onde é descrito o equipamento utilizado, tipo de detector, comprimento de onda selecionado, informações de tempo de corrida, temperatura do forno, fluxo, volume de injeção e fase móvel. Também são contemplados os parâmetros da espectrometria de massas.

Tabela 5. **Condições cromatográficas do azoxistrobim.**

Equipamento	Cromatógrafo líquido (Agilent)
Detector	UV-DAD/MS
Comprimento de onda	220 nm
Coluna	Luna Phenomenex C18 (250 mm x 2,1 mm x 5µm)
Tempo de análise	50 min – Post time: 15 min
Temperatura da coluna	25°C
Fluxo	0,25 mL.min ⁻¹
Volume de injeção	1,0 µL
Fase móvel	A) água ultra pura B) Acetonitrila *Gradiente 50:50 (v/v) – 0 a 8 min 80:20 (v/v) – 25 a 50 min 90:10 (v/v) – após 50 min

Condições EM	Valores	Condições EM	Valores
Modo de aquisição	SCAN	Temperatura N2 (°C)	300
Modo de ionização	Positivo	Fluxo N2 (L.min-1)	12
Interface	API-ES	Pressão Nebulizador (psi)	60
Intervalo de massas Scan	100-1000 m/z	Voltagem capilar (V)	4000
Fragmentador	120 V	Ganho	1,0

3.4.2 Amicarbazona

Para o agroquímico Amicarbazona, as condições cromatográficas estão na Tabela 6, onde é descrito o equipamento utilizado, tipo de detector, comprimento de onda selecionado, informações sobre tempo de corrida, temperatura do forno, fluxo, volume de injeção e fase móvel. Também são contemplados os parâmetros da espectrometria de massas.

Tabela 6. **Condições cromatográficas do amicarbazona.**

Equipamento	Cromatógrafo líquido (Agilent)
Detector	UV-DAD/MS
Comprimento de onda	210 nm
Coluna	Luna Phenomenex C18 (250 mm x 2,1 mm x 5µm)
Tempo de análise	35 min – Post time: 10 min
Temperatura da coluna	35°C
Fluxo	0,30 mL.min ⁻¹
Volume de injeção	3,0 µL
Fase móvel	A) água ultra pura + 0,1% ácido fórmico (v/v) B) Acetonitrila *Gradiente 95:5 (v/v) – 0 a 1 min 10:90 (v/v) – 18 a 25 min

Condições EM	Valores	Condições EM	Valores
Modo de aquisição	SCAN	Temperatura N2 (°C)	300
Modo de ionização	Positivo	Fluxo N2 (L.min-1)	9
Interface	API-ES	Pressão Nebulizador (psi)	50
Intervalo de massas Scan	800-1000 m/z	Voltagem capilar (V)	3000
Fragmentador	120 V	Ganho	1,0

3.4.3 Picloram

Para o agroquímico Picloram, as condições cromatográficas estão na Tabela 7, onde é descrito o equipamento utilizado, tipo de detector, comprimento de onda selecionado, informações sobre tempo de corrida, temperatura do forno, fluxo, volume de injeção e fase móvel. Também são contemplados os parâmetros da espectrometria de massas.

Tabela 7. **Condições cromatográficas do picloram.**

Equipamento	Cromatógrafo líquido (Agilent)
Detector	UV-DAD/MS
Comprimento de onda	225 nm
Coluna	ACE C18 (250 mm x 2,0 mm x 5µm)
Tempo de análise	50 min – Post time: 10 min
Temperatura da coluna	30°C
Fluxo	0,30 mL.min ⁻¹
Volume de injeção	5,0 µL
Fase móvel	A) água ultra pura + 0,1% ácido fórmico (v/v) B) Acetonitrila *Gradiente 15:85 (v/v) – 0 a 10 min 60:40 (v/v) – 11 a 25 min 65:35 (v/v) – 25 a 27 min 90:10 (v/v) – 27 a 50 min

Condições EM	Valores	Condições EM	Valores
Modo de aquisição	SCAN	Temperatura N2 (°C)	300
Modo de ionização	Positivo	Fluxo N2 (L.min-1)	11
Interface	API-ES	Pressão Nebulizador (psi)	40
Intervalo de massas Scan	10-1000 m/z	Voltagem capilar (V)	3000
Fragmentador	110 V	Ganho	1,0

4. Resultados e Discussão

Após a condução dos experimentos preliminares, notou-se que apenas aquecimento e umidade separados, não promoveram um resultado satisfatório. Decidiu-se unir as duas variáveis para equiparar a condição criada no laboratório a real condição da lavoura, onde os fatores agem em conjunto. A união resultou na variável 50°C com 75% de umidade em câmara climática. Não sofreram variações as amostras tratadas com solução oxidativa, e íons metálicos, e, portanto, decidiu-se pela não continuidade destes estudos. Assim, foi gerado um segundo conjunto de análises (visto que o número de variáveis passou de 7 para 4), onde foi gerado um número total de 108 experimentos, sendo 36 de cada princípio ativo.

Amostras de experimentos controle de cada princípio ativo foram injetadas no cromatógrafo logo após sua preparação, e os resultados mostraram que os agroquímicos inicialmente não continham nenhuma impureza.

A degradação atingiu seu máximo (30%) no tempo 10 dias, onde as amostras foram neutralizadas e imediatamente analisadas no cromatógrafo, a fim de evitarem-se múltiplas degradações.

Os melhores resultados (intensidade de sinal e massa seca obtida após rotoevaporação) foram obtidos para as degradações ácidas e básicas, de todos os princípios ativos.

4.1 Amicarbazona

A molécula do ativo inicial foi caracterizada conforme os espectros abaixo. Aproximadamente 5,23 mg de amostra foram utilizadas, diluídas em clorofórmio deuterado, conforme ilustrado nas Figura 5.

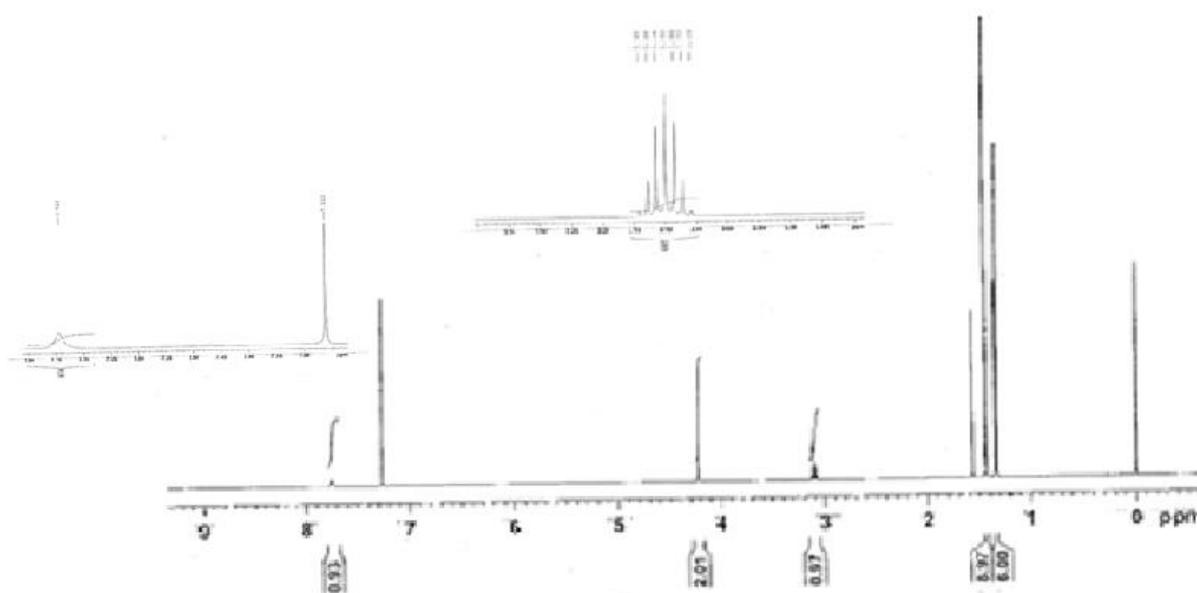


Figura 5. Espectro de RMN ^1H de Amicarbazona (CDCl_3 , 400 MHz).

A Figura 5 mostra o espectro geral com as ampliações aos sinais pertinentes para melhor visualização. Nota-se que para os deslocamentos em torno de 3,0 ppm temos um septeto bem definido. Em 1,43 ppm há um simpleto bem agudo, e em 1,33 pode-se observar um duplete.

A Figura 6 apresenta o espectro de RMN ^{13}C simulado para Amicarbazona. Notam-se deslocamentos na faixa de 20 a 160 ppm, sinalizando que a molécula pode conter grupos metila, carbono quaternário, carbonila, CH e ligação carbono com nitrogênio.

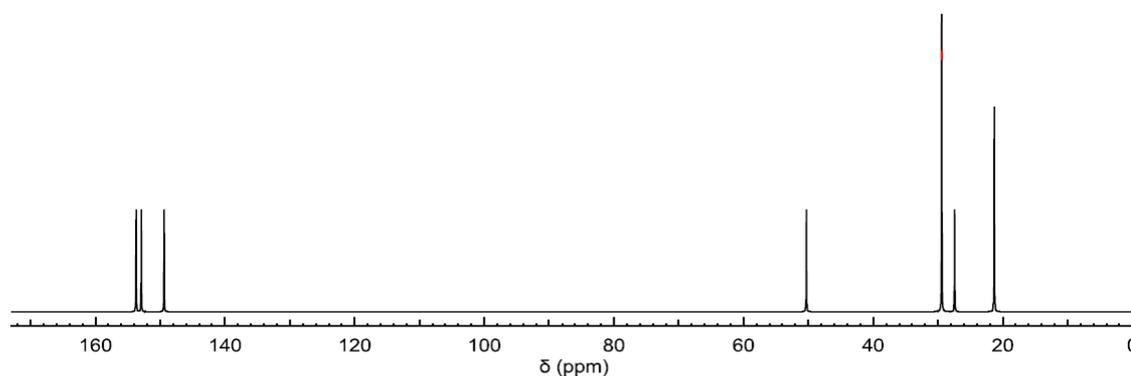


Figura 6. Simulação do espectro de RMN ^{13}C de Amicarbazona (Simulate and Predict NMR – adaptado).

A Tabela 8 mostra os resultados obtidos nos espectros das Figuras 5 e 6, comparando com dados da literatura.

Tabela 8. Dados de RMN ^1H e ^{13}C de Amicarbazona (CDCl_3 / 400MHz).

Número	Deslocamento ^1H (ppm) Lit*.	Deslocamento ^1H (ppm) Obt.	Deslocamento (ppm) ^{13}C Lit*.	Deslocamento ^{13}C (ppm) Obt.
$\text{NH}_2 - 4$	4,43 brr	4,22	***	***
$\text{NH} - 2'$	7,75 s	7,74	***	***
$4', 5', 6'$	1,42 s	1,43	28,6	29,4
$1''$	3,11 hep - 7Hz	3,10	25,4	27,4
$2'', 3''$	1,33 d - 7 Hz	1,33	19,0	21,3
3	***	***	153,1	152,9
5	***	***	153,1	152,9
$1'$	***	***	147,1	149,4
$3'$	***	***	51,3	50,3

(*LING et al., 2010).

Portanto, com base nos espectros apresentados e nas correlações exemplificadas nas tabelas, a estrutura para o agroquímico de Amicarbazona é mostrada na Figura 7.

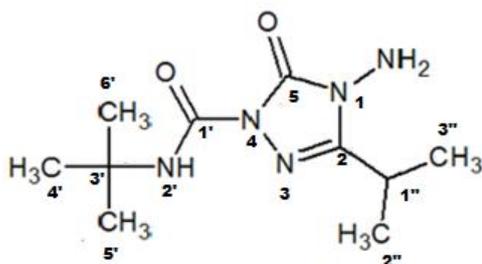


Figura 7. Caracterização de Amicarbazona com marcação da posição de hidrogênio e carbono em preto.

A caracterização condiz com os valores de deslocamentos obtidos, evidenciando a adequação na atribuição dos sinais.

4.1.1 Amicarbazona – Impureza A

A Figura 8 apresenta o cromatograma do teste preliminar de amicarbazona. O teste foi realizado para a observação do melhor comprimento de onda, condições cromatográficas e a verificação de possíveis impurezas provenientes da síntese.

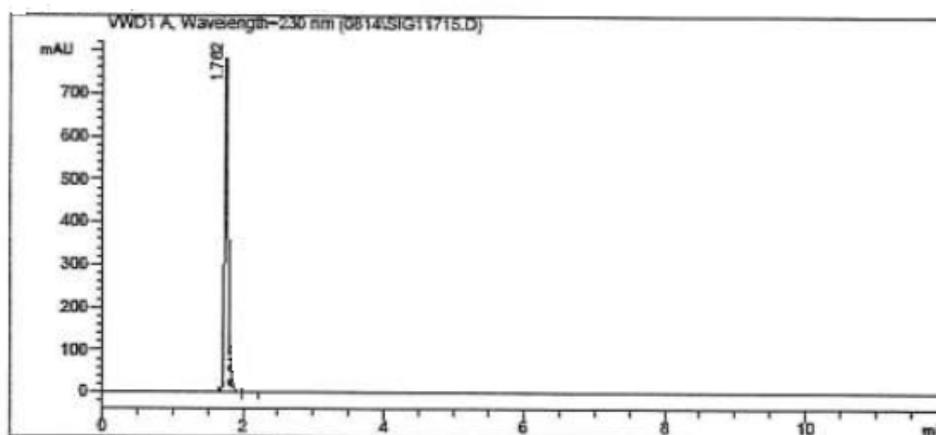


Figura 8. Cromatograma da análise de Amicarbazona 1000 mg.L⁻¹.

Pode-se notar que o comprimento de onda de 230 nm é apropriado para o analito, e nenhuma impureza é observada.

Em seguida, procedeu-se a realização dos itens 4, 4.1, 4.2, 4.3 e 4.3.3. Para todas as variáveis do experimento os cromatogramas foram parecidos, porém o melhor foi para a condição de degradação ácida, tempo 10 dias, conforme ilustra a Figura 9. Esta condição foi a que ofereceu maior quantidade de massa (4,54 mg), que foi utilizada para os testes de RMN.

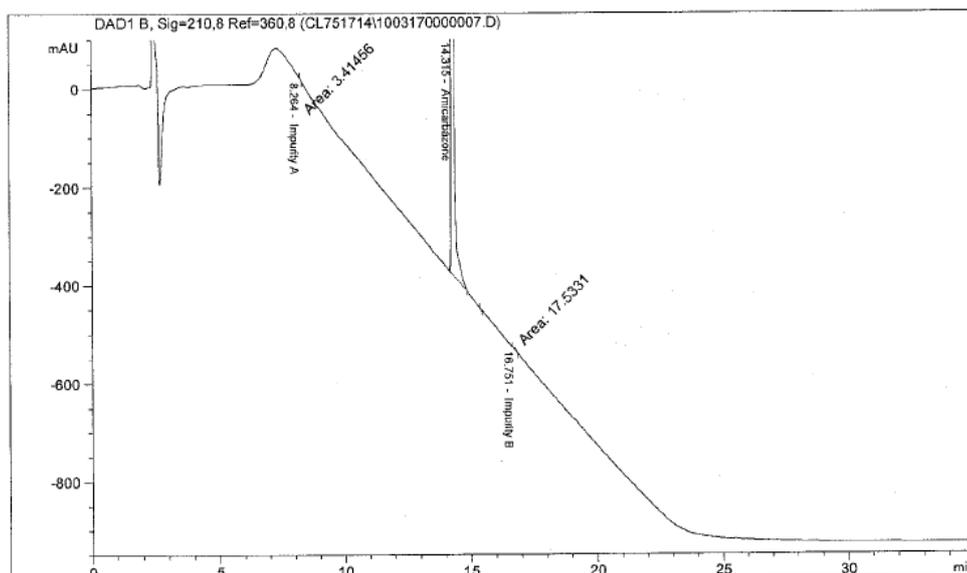


Figura 9. Cromatograma do tratamento de Amicarbazona em incubação ácida- 10 dias - screening.

Observando a análise representada na Figura 9, nota-se a presença de duas impurezas distintas, chamadas de Impureza A (RT=8,264 min) e B (RT= 16,751 min) respectivamente. O comprimento de onda foi alterado para 210 nm, pois oferece melhor intensidade dos picos das impurezas em detrimento do pico do ingrediente ativo. Transferiu-se a solução da amostra do tempo 10 dias para o cromatógrafo líquido acoplado a espectrômetro de massas, para obter o perfil do íon e possíveis interferentes (Figura 10).

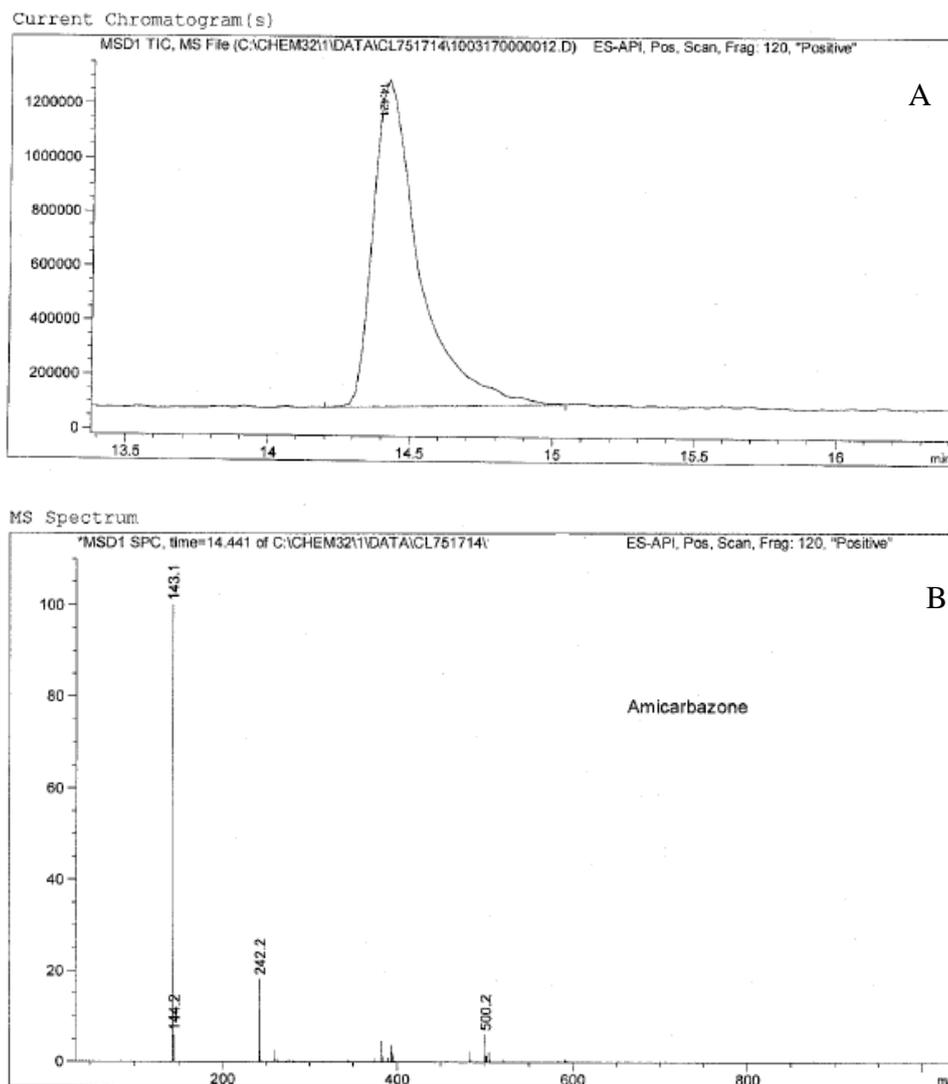


Figura 10. A) Cromatograma de Amicarbazona analisada por LC/MS; B) Espectro de massas de Amicarbazona – analisada por LC/MS (MM = 241,295 g/mol).

É possível observar que o íon molecular corresponde ao fragmento em m/z 242,2 [(M+H)⁺] referente a massa molecular de amicarbazona, e o pico base corresponde ao fragmento em m/z 143,1 [(M+H)⁺], confirmando que é o analito de interesse e que possui impurezas. Os demais íons observados podem ser sujeira do analisador ou outro composto não relevante para este trabalho, e portanto, foram descartados.

Após a coleta e secagem de cada impureza, preparou-se uma solução de 1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e analisou-se no LC/MS para obter o perfil das massas de cada impureza (Figura 11).

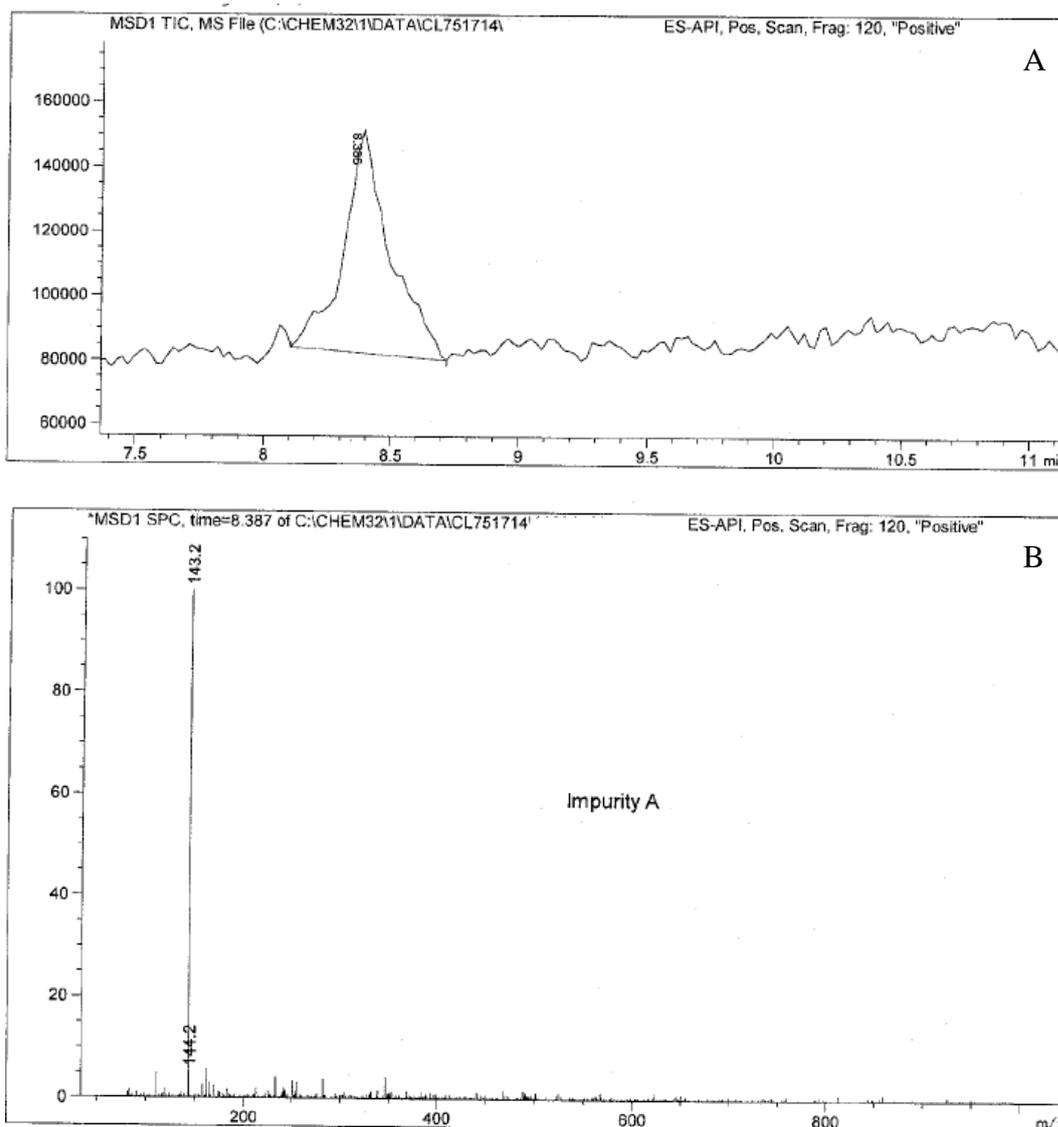


Figura 11. A) Perfil cromatográfico da Impureza A de Amicarbazona analisada no LC/MS; B) Espectro de massas da Impureza A analisada por LC/MS – degradação ácida – tempo 10 dias.

Nota-se que o pico base correspondente ao fragmento em m/z 143,1 $[(M+H)^+]$ é referente a Impureza A, com algum interferente, que resulta no fragmento menor em m/z 144,2 $[(M+H)^+]$. Esse fragmento é o pico do agroquímico de Amicarbazona, ou seja, representa a quebra principal da molécula.

Em seguida, as impurezas foram analisadas em espectrômetro de RMN.

O espectro de RMN 1H apresentou 4 deslocamentos distintos de hidrogênio, com multiplicidades diferentes, conforme observado na Figura 12.

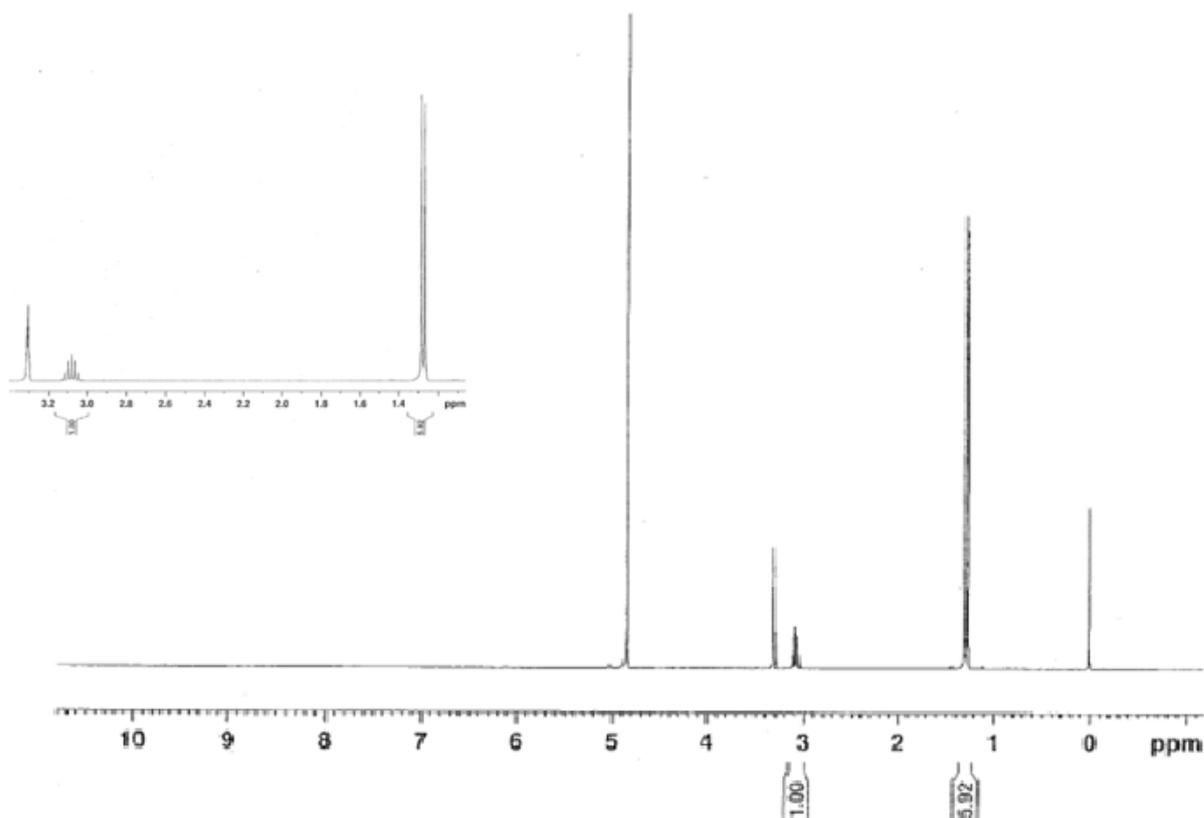


Figura 12. Espectro de RMN ^1H da Impureza A de Amicarbazona (CDCl_3 , 400MHz).

A ampliação permite observar que o sinal em 3,30 ppm é um multipeto e o sinal em 1,30 ppm é na verdade um dupeto, e não um simpleto como aparenta inicialmente.

O espectro de RMN ^{13}C exemplificado na Figura 13 foi obtido com solvente metanol deuterado e os valores dos deslocamentos na faixa de 20 ppm a 200 ppm sugerem a presença de grupos metilas, carbonila e ligação carbono com nitrogênio.

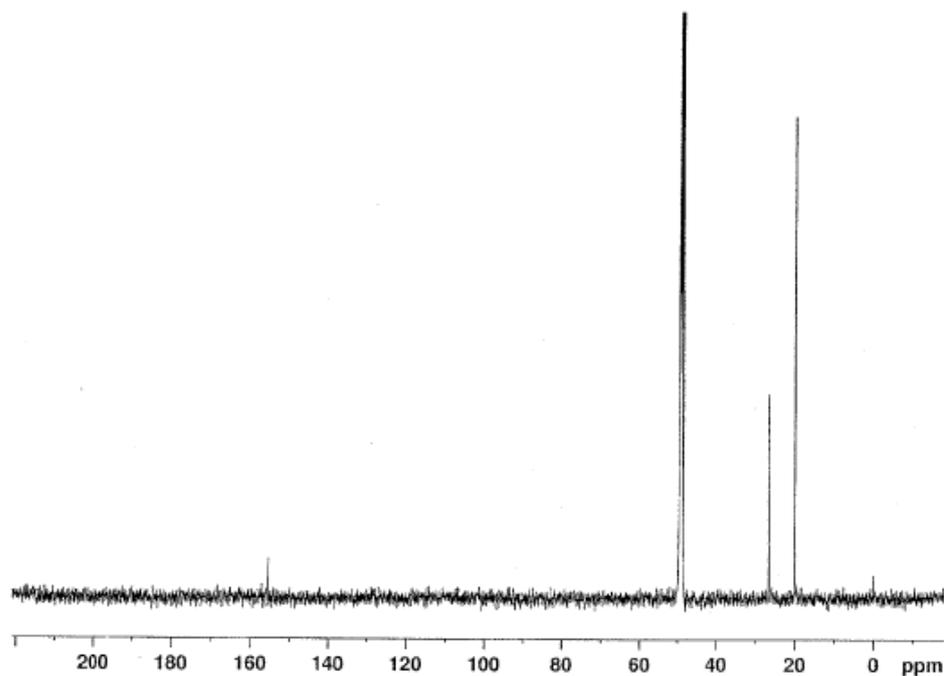


Figura 13. Espectro de RMN ^{13}C da Impureza A de Amicarbazona.

A Tabela 9 exemplifica os deslocamentos, correlacionado com os possíveis números de hidrogênio e tipos de carbono esperados para cada deslocamento.

Tabela 9. Dados de RMN ^1H e ^{13}C da Impureza A de Amicarbazona (CDCl_3 / 400 MHz e 100 MHz).

Número	Deslocamento ^1H (ppm) Obt.	Deslocamento ^{13}C (ppm) Obt.
NH_2 - 4	4,90	152,9
1'	3,10 hep - 7 Hz	27,4
2', 3'	1,30 d - 7 Hz	21,3

Após a análise dos espectros de RMN unidimensional, procedeu-se a análise das moléculas a partir das técnicas de RMN bidimensional disponíveis na UFSCar.

Com o espectro 2D de RMN ^1H - ^1H COSY na Figura 14, podemos ver os hidrogênios que acoplam entre si, no centro da figura, formando um quadrado sequencial. Na diagonal pode-se observar todos os hidrogênios da molécula.

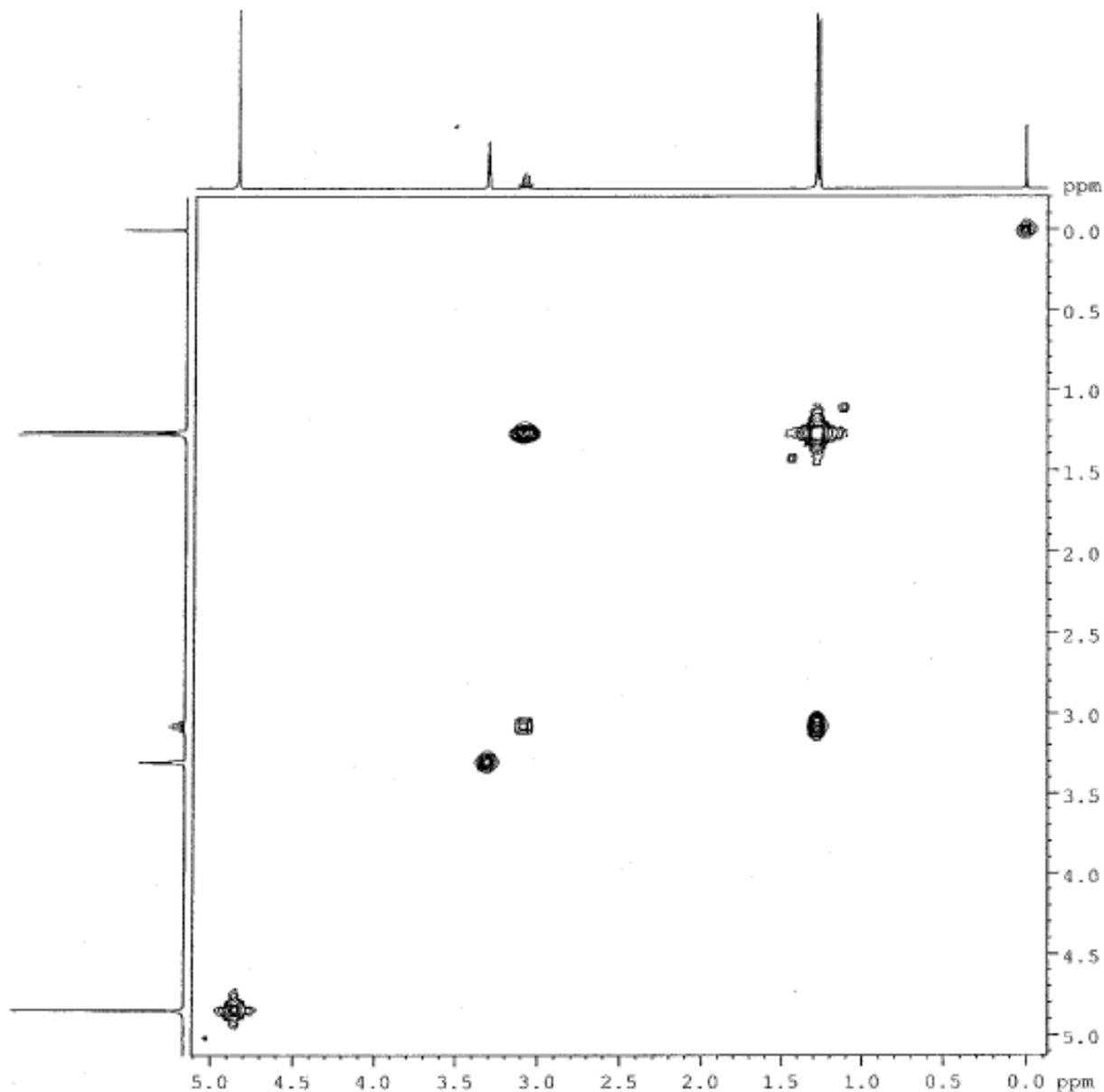


Figura 14. Espectro de RMN ^1H - ^1H COSY da Impureza A de Amicarbazona.

A Tabela 10 correlaciona os deslocamentos de hidrogênios que acoplam entre si.

Tabela 10. Dados de RMN ^1H - ^1H COSY da Impureza A de Amicarbazona.

Deslocamento ^1H - ^1H (ppm)	1,30	3,10	3,30	4,90
1,30	x	x		
3,10	x	x		
3,30			x	
4,90				X

Nota-se que apenas os hidrogênios com deslocamentos de 1,30 ppm e 3,10 ppm acoplam entre si. O hidrogênio em 3,40 ppm pode estar ligado a um carbono terciário e o hidrogênio em 4,90 ppm está altamente desblindado.

Com o espectro de RMN ^1H - ^{13}C HSQC na Figura 15, podemos ver as ligações diretas entre carbono e hidrogênio, via uma ligação. Os deslocamentos de hidrogênio estão representados no plano horizontal e os deslocamentos de carbono estão no plano vertical a direita. Assim, já é possível montar o “esqueleto” da molécula.

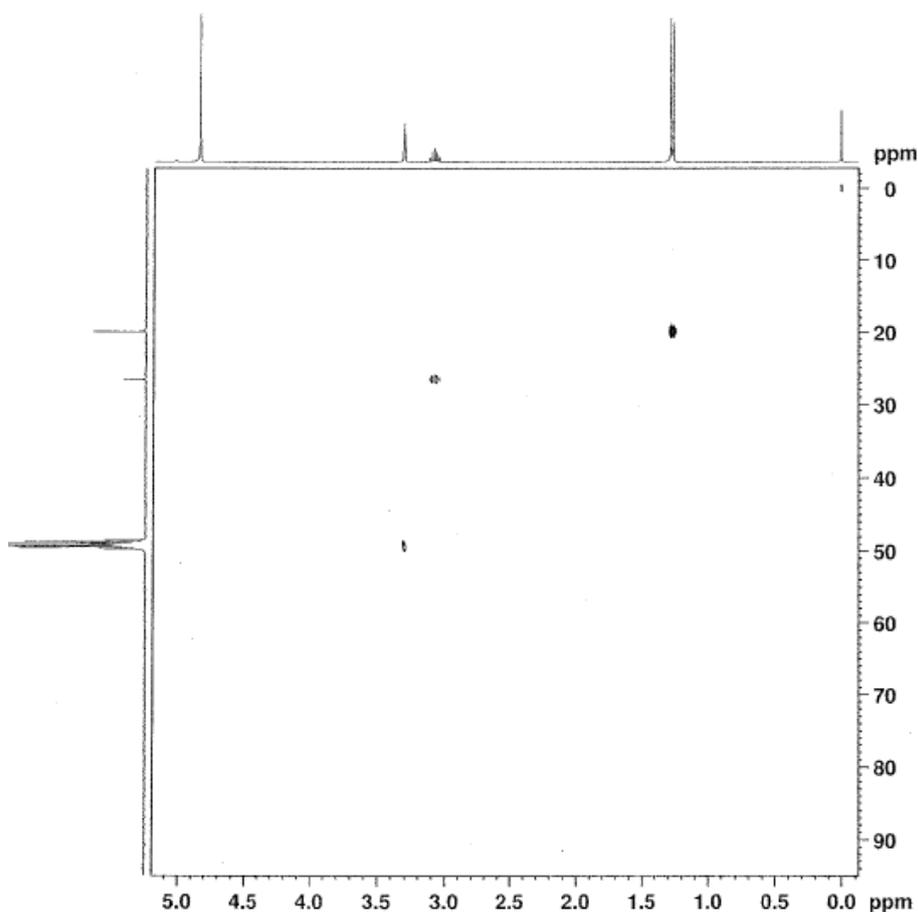


Figura 15. Espectro de RMN ^1H - ^{13}C HSQC da Impureza A de Amicarbazona.

A Tabela 11 relaciona os deslocamentos de hidrogênio com os deslocamentos de carbono, evidenciando especificamente as ligações entre carbono e hidrogênio diretas.

Tabela 11. Dados de RMN ^1H - ^{13}C HSQC da Impureza A de Amicarbazona.

Deslocamento H (ppm)	1,30	3,10	3,30	4,90
Acopla com C (ppm)	20,1	28,2	***	***

Os espectros de RMN ^1H - ^{13}C HMBC nas Figuras 16 e 17 abaixo evidenciam as demais ligações entre carbono e hidrogênio, via duas, três ou mais ligações. A ampliação permite ver melhor os deslocamentos e diferenciar um resultado de um não resultado. Os deslocamentos de hidrogênio estão representados no plano horizontal e os deslocamentos de carbono estão representados no plano vertical a direita.

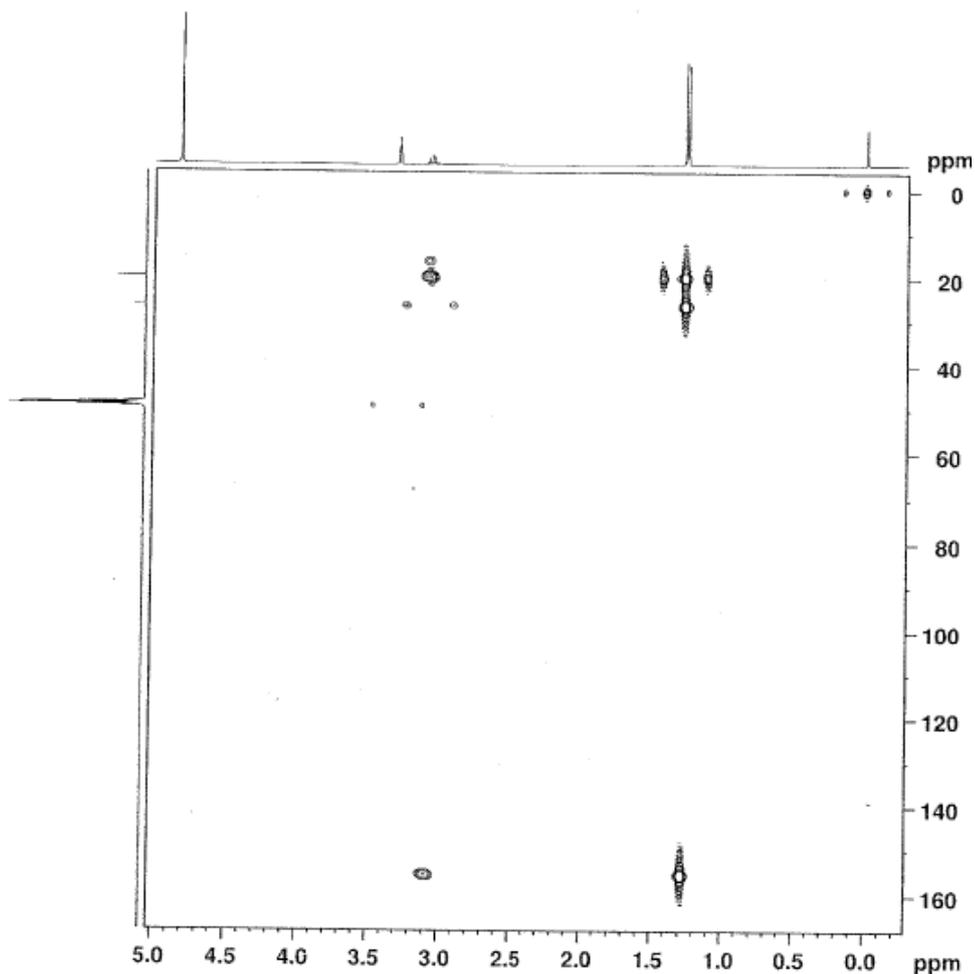


Figura 16. Espectro de RMN ^1H - ^{13}C HMBC da Impureza A de Amicarbazona.

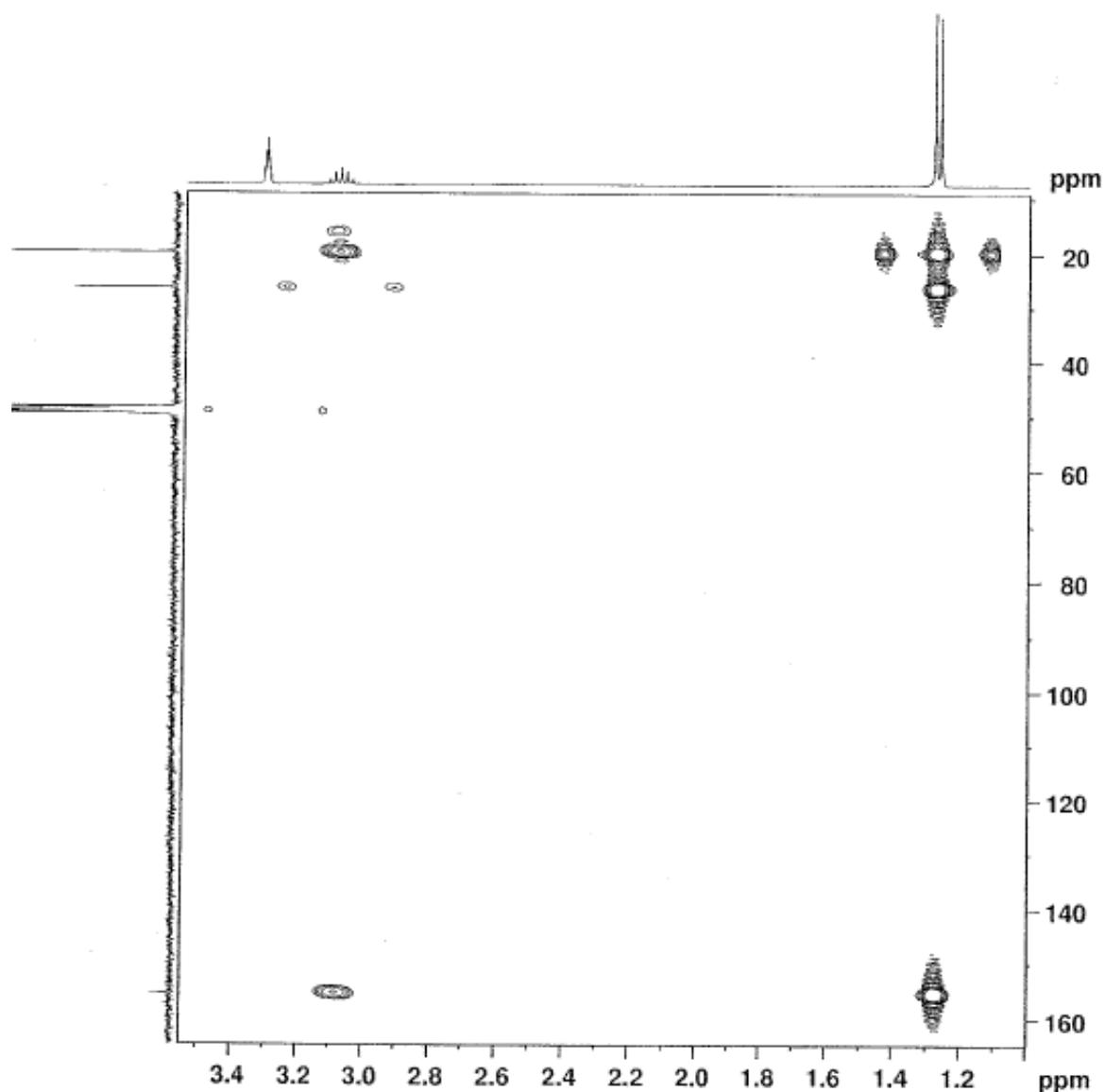


Figura 17. Espectro de RMN ^1H - ^{13}C HMBC da Impureza A de Amicarbazona – ampliado.

A Tabela 12 correlaciona dos deslocamentos observados nas Figuras 16 e 17, exemplificando as ligações que ocorrem, o que contribui para a definição e confirmação da estrutura final.

Tabela 12. Dados de RMN ^1H - ^{13}C HMBC da Impureza A de Amicarbazona.

Deslocamento H (ppm)	1,30	3,10	3,40	4,90
Acopla com C (ppm)	21,3/ 27,4 / 152,9	21,3/ 152,9	***	***

Assim, com base nos espectros e nas tabulações dos resultados, a estrutura proposta para a Impureza A de Amicarbazona é mostrada na Figura 18.

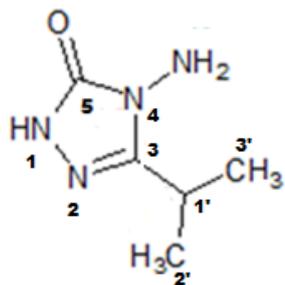


Figura 18. Estrutura proposta para a Impureza A de Amicarbazona com marcação da numeração de hidrogênio e carbono em preto.

A caracterização condiz com os valores de deslocamentos obtidos, evidenciando a adequação na atribuição dos sinais.

O mecanismo proposto de degradação é mostrado na Figura 19, onde ocorre a lise da molécula inicial pelo ataque nucleofílico da dupla ligação da carbonila ao ácido em excesso, gerando 2 moléculas distintas. A molécula $C_5H_{11}NO$ não foi detectada como impureza, e portanto, espera-se que ela seja volátil.

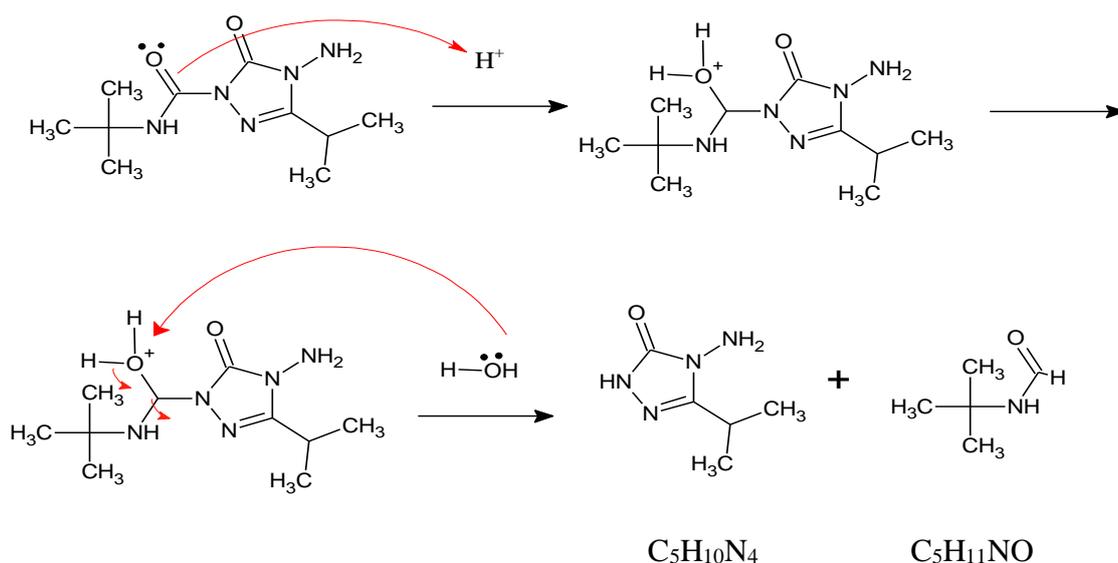


Figura 19. Mecanismo de degradação para o produto de degradação A de Amicarbazona.

A estrutura condiz com os dados analisados e é coerente com a molécula inicial. Sua massa molecular é 142 Da.

Esta impureza já é conhecida da indústria, chamada de Aminotriazolinone (nome químico: 4-amino-3-(2-propanil)-4,5-dihidro-1,2,4-triazol-5-one. Número CAS: 96240-10-7).

Não foi encontrado nenhum estudo na literatura com esta molécula acerca de sua toxicidade, interação com organismos vivos ou meios de diminuir a formação da mesma após a aplicação do produto in loco.

4.1.2 Amicarbazona – Impureza B

De maneira análoga a Impureza A, injetou-se a solução da amostra do tempo 10 dias de incubação ácida no cromatógrafo líquido acoplado à espectrometria de massas para obtenção do perfil da Impureza B, como mostrado na Figura 20. Obteve-se uma massa de 3,02 mg da Impureza B, quantidade razoável para a condução dos experimentos de RMN.

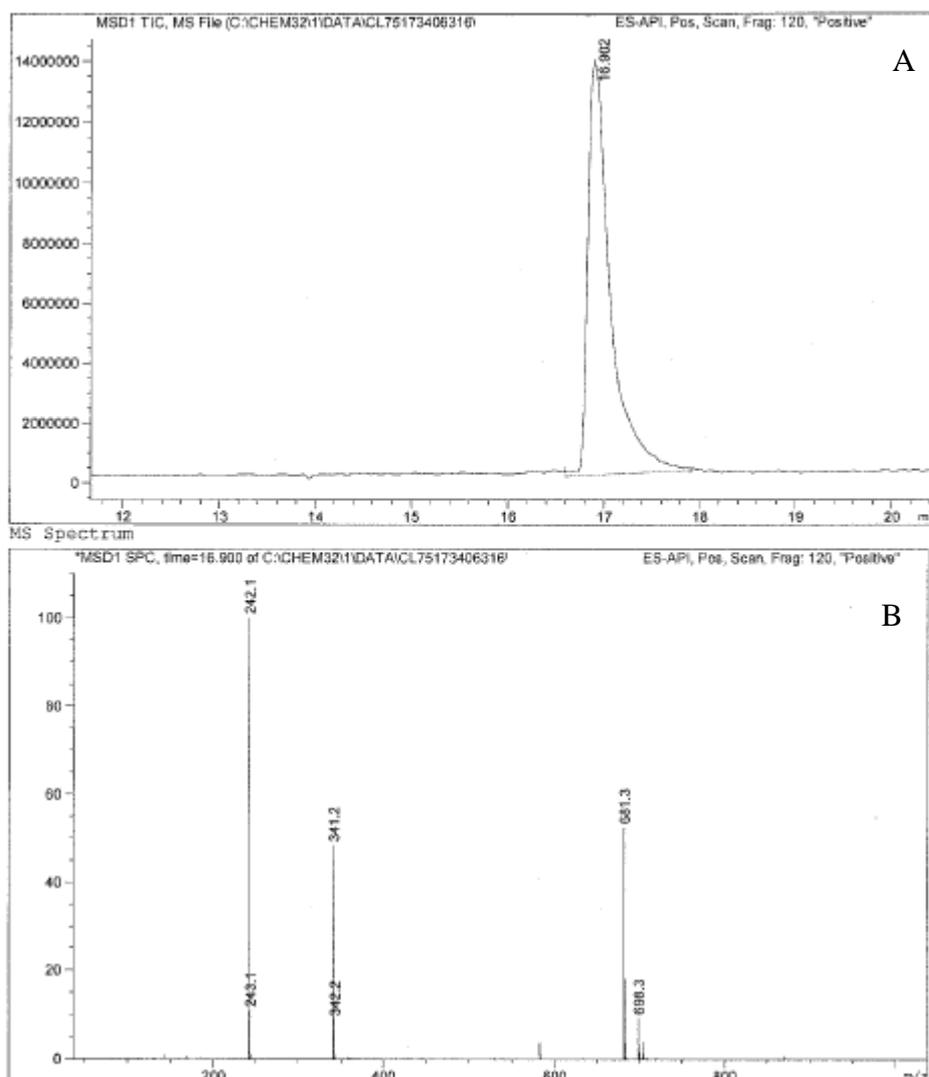


Figura 20. A) Perfil cromatográfico da Impureza B de Amicarbazona analisada por LC/MS; B) Espectro de massas da Impureza B de Amicarbazona analisada por LC/MS.

É possível observar que o íon molecular corresponde ao fragmento em m/z 342,2 $[(M+H)^+]$, pico base em m/z 242,2 $[(M+H)^+]$ e a presença dos fragmentos m/z 341,2 $[(M+H)^+]$, 641,3 $[(M+H)^+]$ e 516,3 $[(M+H)^+]$. Pelas massas, é possível inferir que a molécula da Impureza A está presente na Impureza B, visto que o íon molecular é exatamente o pico base da impureza A somado 200 unidades.

O espectro de RMN 1H é exemplificado na Figura 21. Nota-se a presença de 9 sinais, mostrando que a molécula é grande.

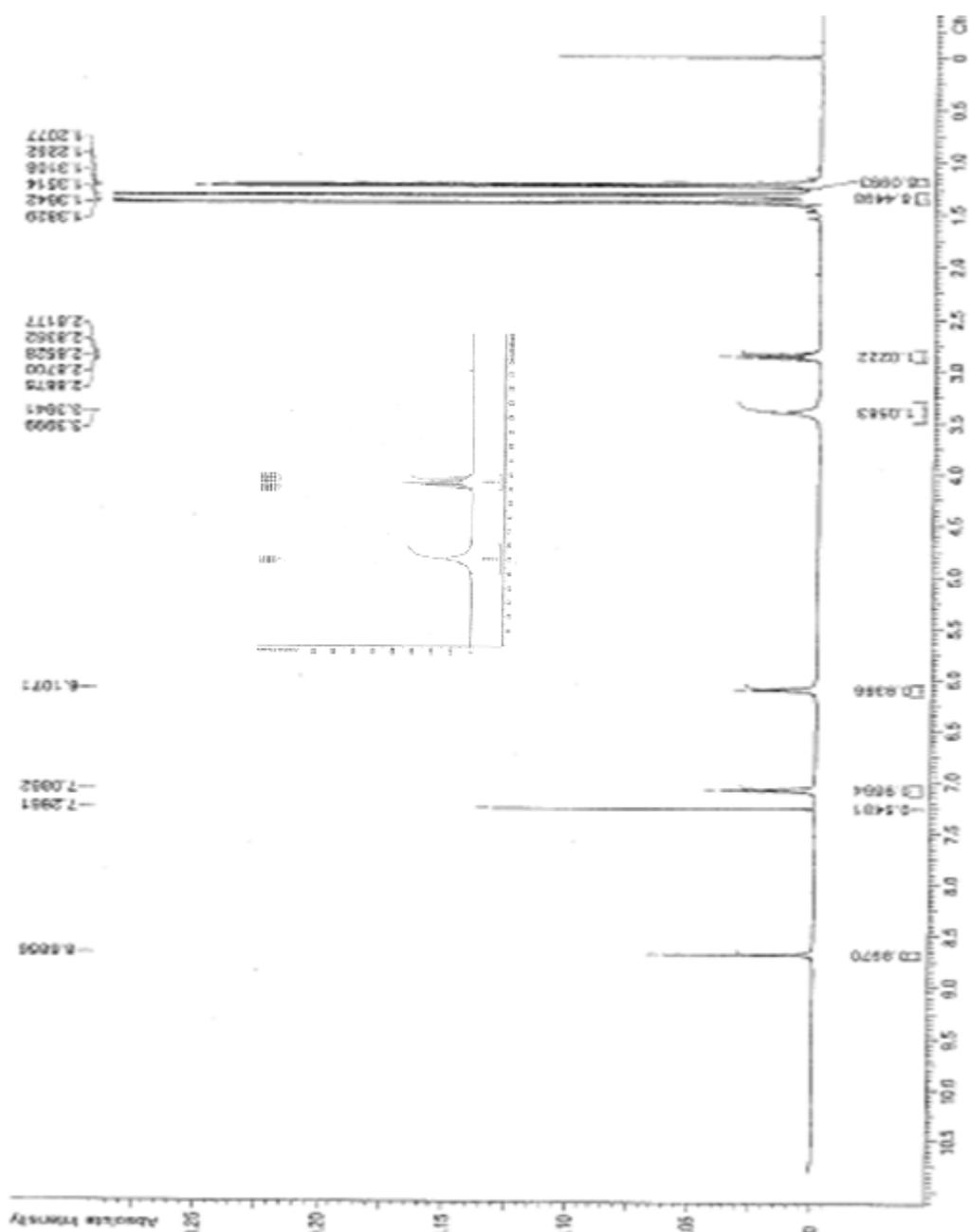


Figura 21. Espectro de RMN 1H da Impureza B de Amicarbazona.

Nos valores de deslocamento 1,3 ppm, temos um tripleto bem definido, em 2,86 ppm nota-se um multipletto pouco definido, com difícil identificação do número de hidrogênios. Os demais sinais referem-se a simpletos.

O espectro de RMN ^{13}C foi obtido com solvente metanol e registrou 9 deslocamentos distintos, associados aos carbonos respectivos, conforme indica a Figura 22.

Podemos observar deslocamentos na faixa de 20 ppm a 160 ppm, indicando a presença de grupos metilas e carbonilas. O solvente metanol apresenta sinal em torno de 50 ppm.

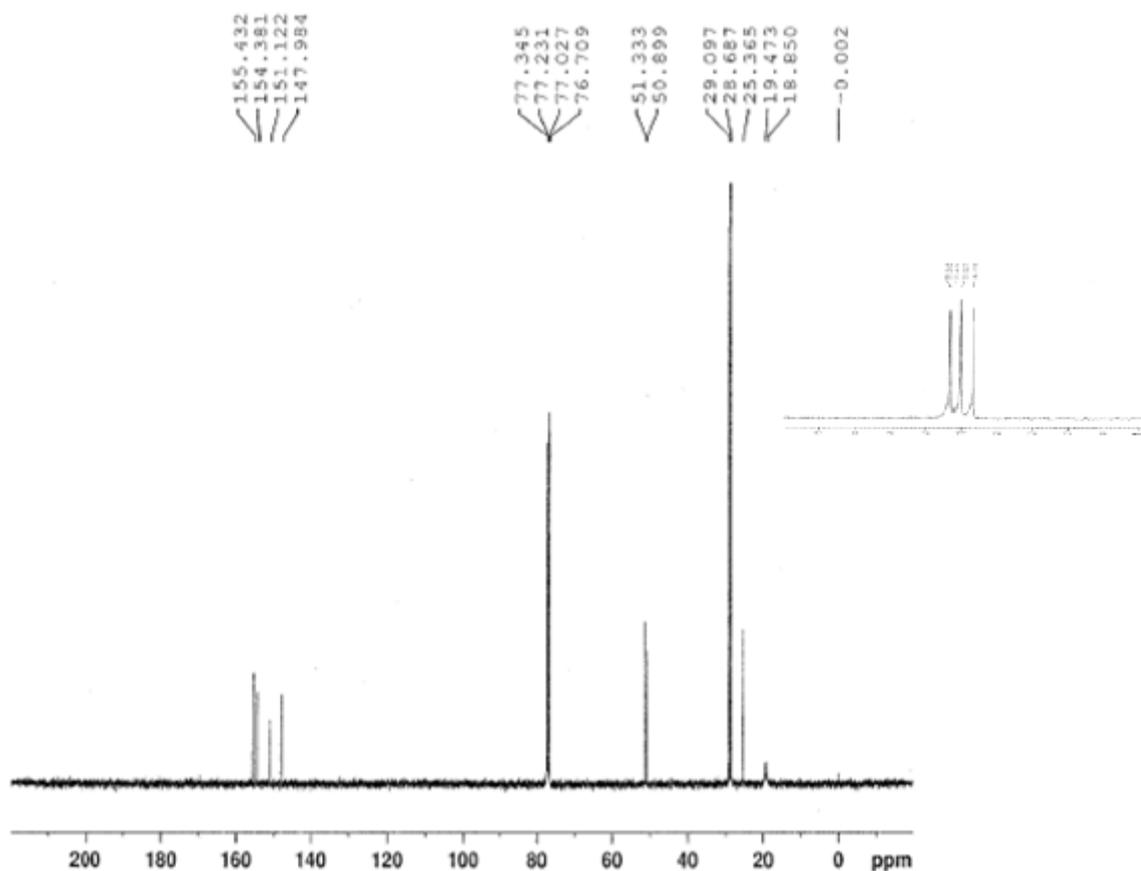


Figura 22. Espectro de RMN ^{13}C da Impureza B de Amicarbazona.

A Tabela 13 exemplifica os deslocamentos obtidos nas Figuras 21 e 22.

Tabela 13. Dados de RMN ^1H e ^{13}C da Impureza B de Amicarbazona ($\text{CDCl}_3/ 400\text{MHz}$ e 100MHz).

Número	Deslocamento ^1H (ppm) Obtido	Deslocamento ^{13}C (ppm) Obtido
1', 5', 6'	1,35*	25,4*
5''', 6''', 7'''	1,38*	28,6*
2'', 3''	1,20	19,4
1''	2,86	25,4
2'	3,31	21,3
3'''	7,02	152,9
1'''	8,44	***
2''	***	154,5
3	***	155,1
1'	***	149,1
5	***	150,0

O espectro de RMN ^1H - ^1H COSY na Figura 23 apresenta-se de difícil distinção, mostrando que possivelmente o equipamento não foi ajustado corretamente, por isso ampliou-se seu sinal na Figura 24, onde foi possível notar que apenas os hidrogênios de menores deslocamentos se acoplam.

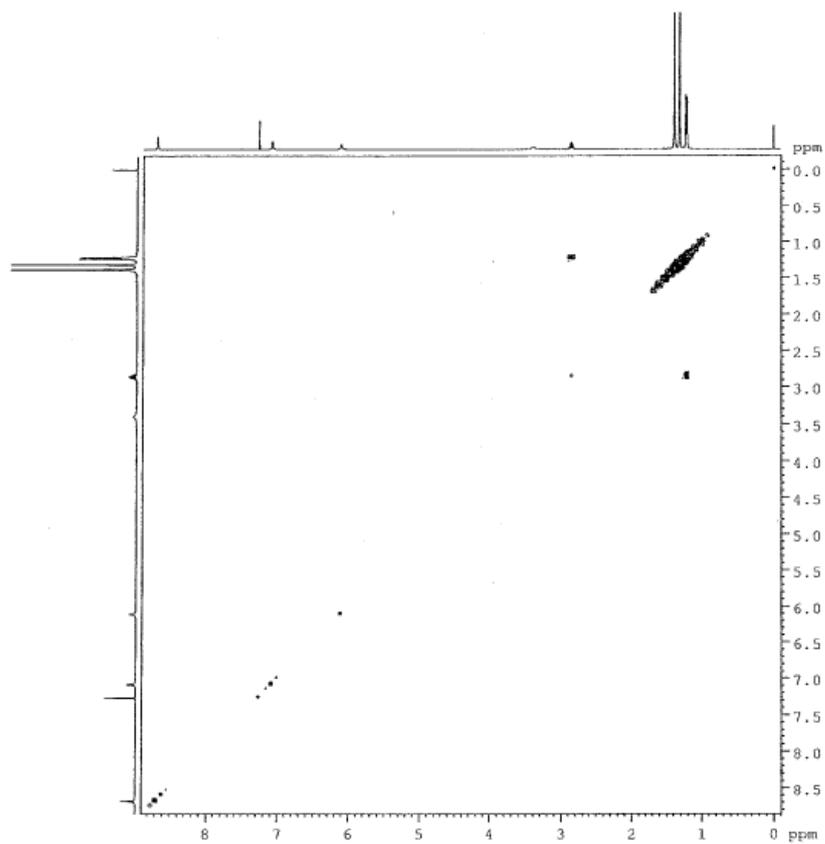


Figura 23. Espectro de RMN ¹H-¹H COSY da Impureza B de Amicarbazona.

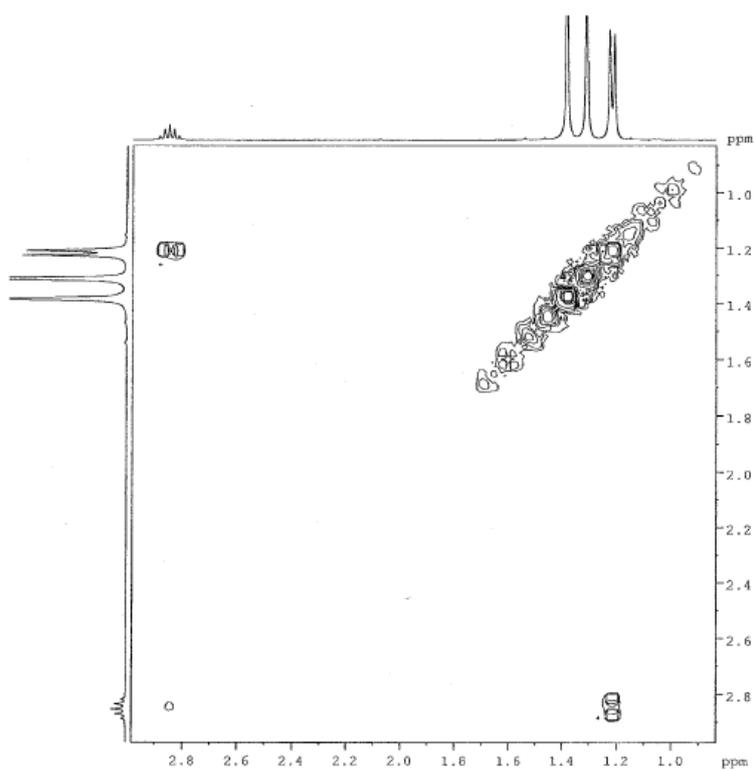


Figura 24. Espectro de RMN ¹H-¹H COSY da Impureza B de Amicarbazona – ampliado.

A Tabela 14 exemplifica os resultados do espectro de COSY. É possível inferir que os hidrogênios estão relativamente próximos uns dos outros, o que gera este sinal grosseiro de difícil interpretação.

Tabela 14. **Dados de RMN ^1H - ^1H COSY da Impureza B de Amicarbazona.**

Deslocamento ^1H - ^1H (ppm)	1,35	2,86	3,31	4,10	7,02	7,25	8,44
1,21/1,35/1,51	x	x					
2,86	x	x					
3,31							
4,10							
7,02							
7,25							
8,44							

É possível que aumentando-se a intensidade dos sinais, o espectro melhore a separação.

As Figuras 25 e 26 mostram os resultados para o espectro de RMN ^1H - ^{13}C HSQC. Notam-se poucos acoplamentos carbono com hidrogênio (pela quantidade elevada de carbonos, esperava-se mais acoplamentos via uma ligação) o que pode sugerir uma molécula simétrica ou equivalente em algum ponto. Os deslocamentos de hidrogênio estão representados no plano horizontal e os deslocamentos de carbono estão representados no plano vertical à direita.

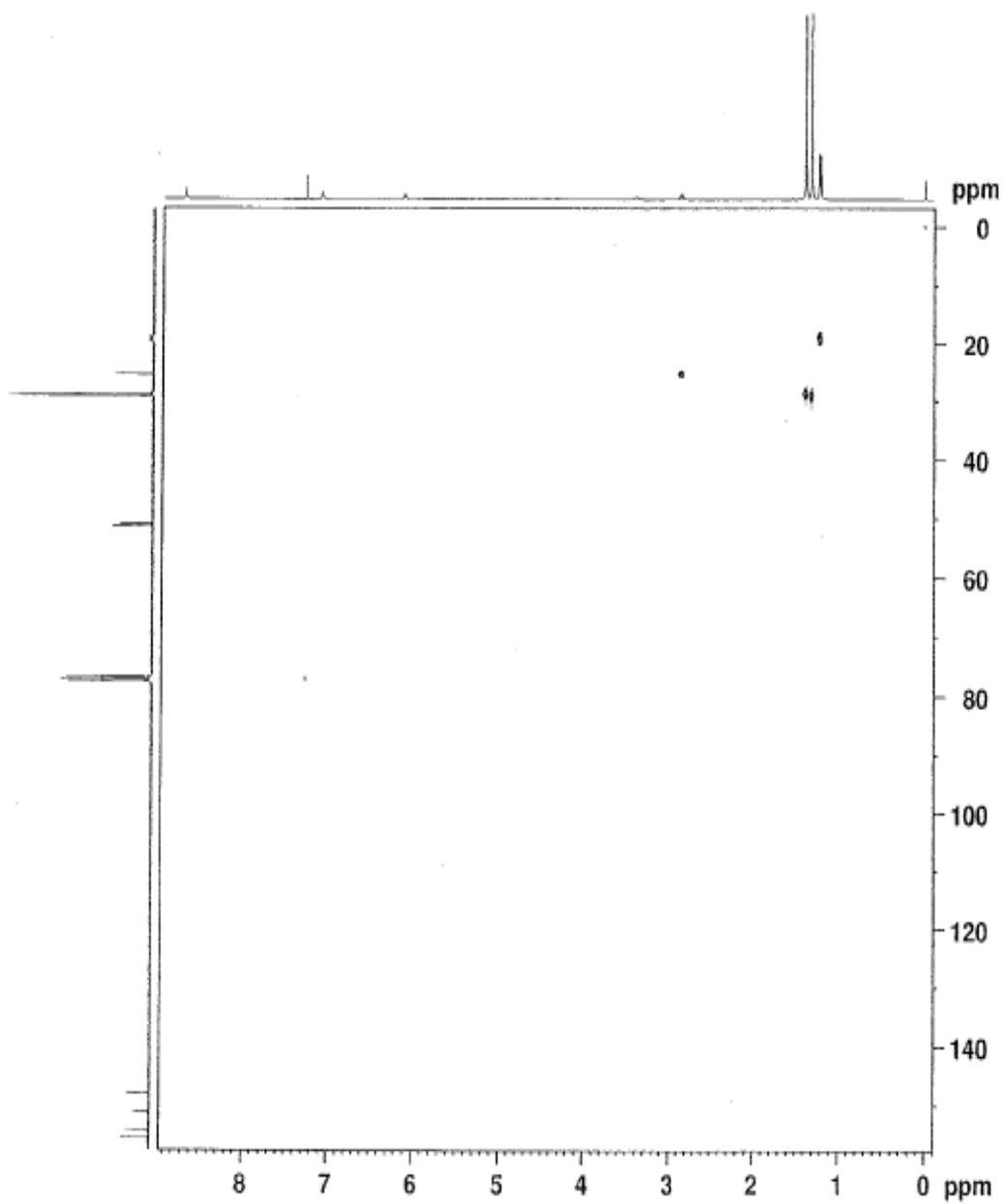


Figura 25. Espectro de RMN ^1H - ^{13}C HSQC da Impureza B de Amicarbazona.

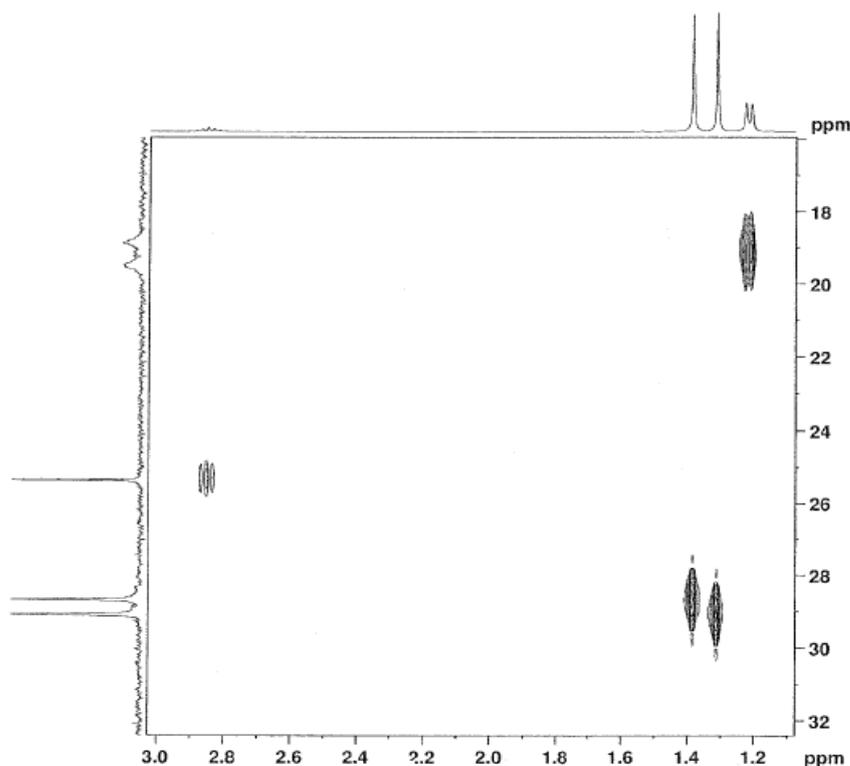


Figura 26. Espectro de RMN ^1H - ^{13}C HSQC da Impureza B de Amicarbazona – ampliado.

A Tabela 15 exemplifica os acoplamentos específicos de carbono com hidrogênio. A partir das figuras, podemos notar que o hidrogênio em 1,2 ppm acopla com os carbonos em 19,4 ppm e 21,3 ppm. O hidrogênio em 1,3 ppm acopla com os carbonos em 28,6 ppm e 29,1 ppm. O hidrogênio em 1,5 ppm acopla com os carbonos em 25,4 ppm e 28,6 ppm e o hidrogênio em 2,86 ppm acopla com o carbono em 25,4 ppm.

Tabela 15. Dados de RMN ^1H - ^{13}C HSQC da Impureza B de Amicarbazona.

Deslocamento H (ppm)	1,21	1,35	1,51	2,86
Acopla com C (ppm)	19,4 / 21,3	28,6/29,1	25,4/28,6	25,4

Os espectros de RMN ^1H - ^{13}C HMBC das Figuras 27 a 31 também se apresentam de maneira difícil, evidenciando que múltiplos acoplamentos ocorrem na molécula. Os deslocamentos de

hidrogênio estão representados no plano horizontal e os valores dos deslocamentos de carbono estão representados no plano vertical à direita.

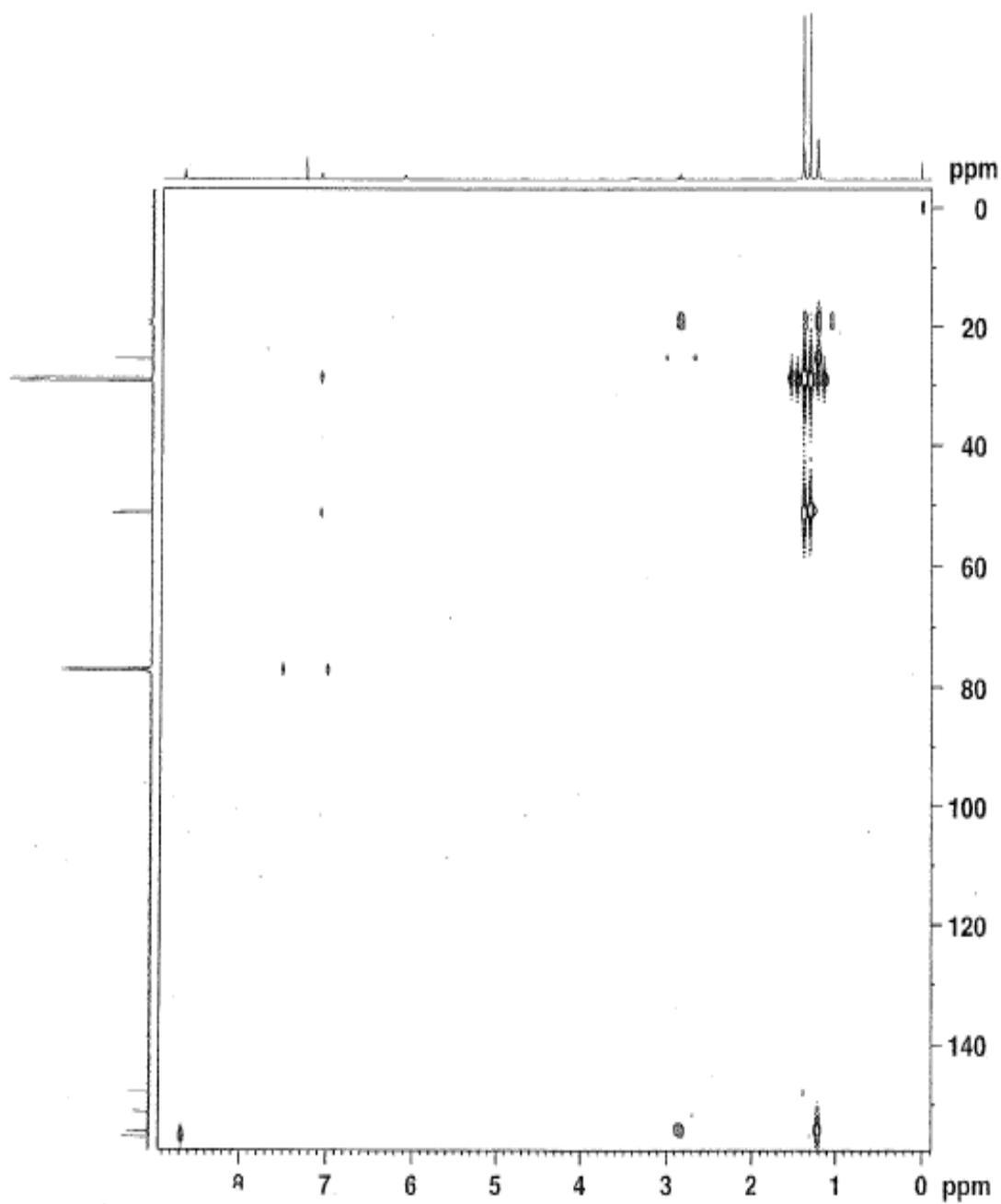


Figura 27. Espectro de RMN ^1H - ^{13}C HMBC da Impureza B de Amicarbazona.

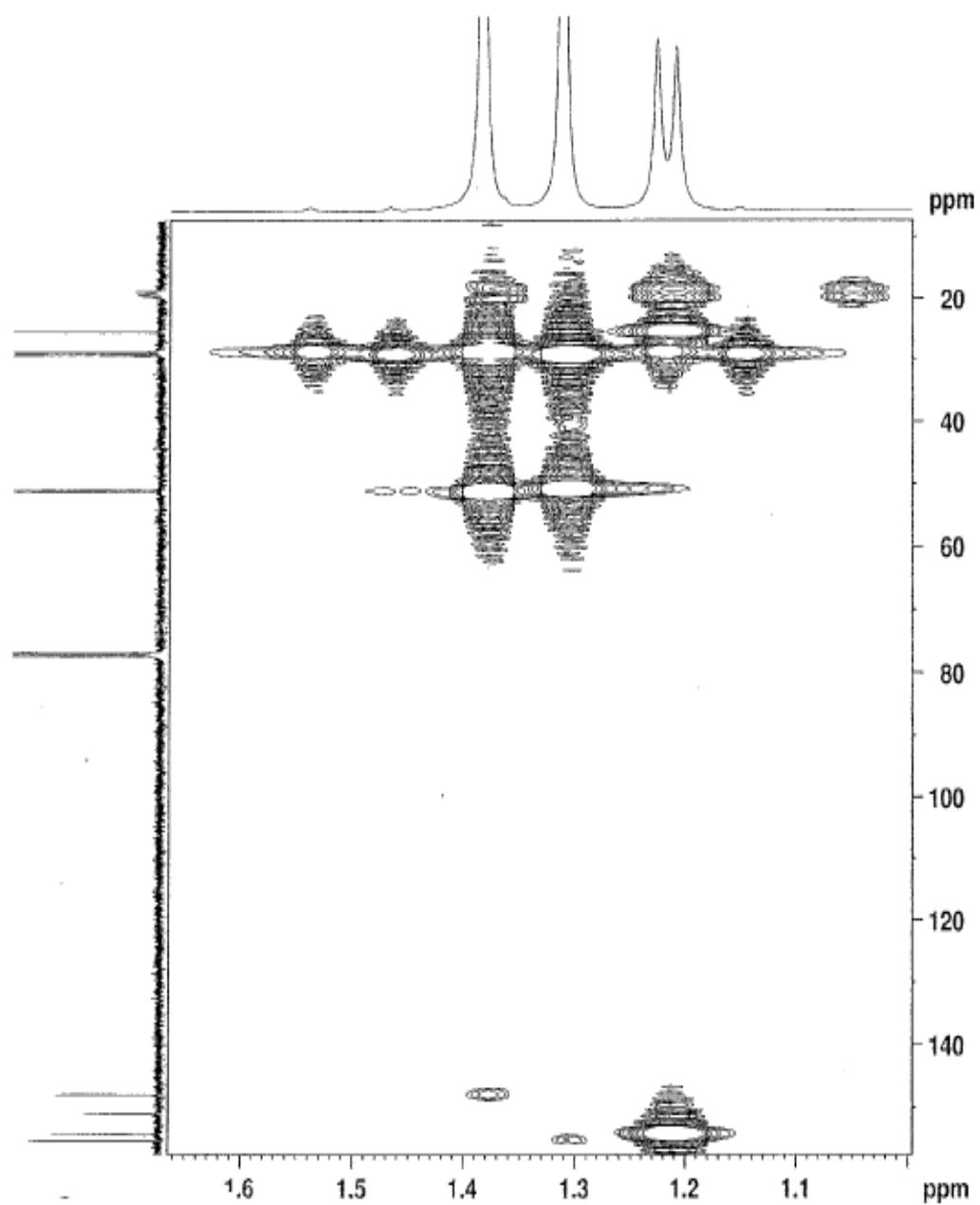


Figura 28. Espectro de RMN ^1H - ^{13}C HMBC da Impureza B de Amicarbazona – ampliado.

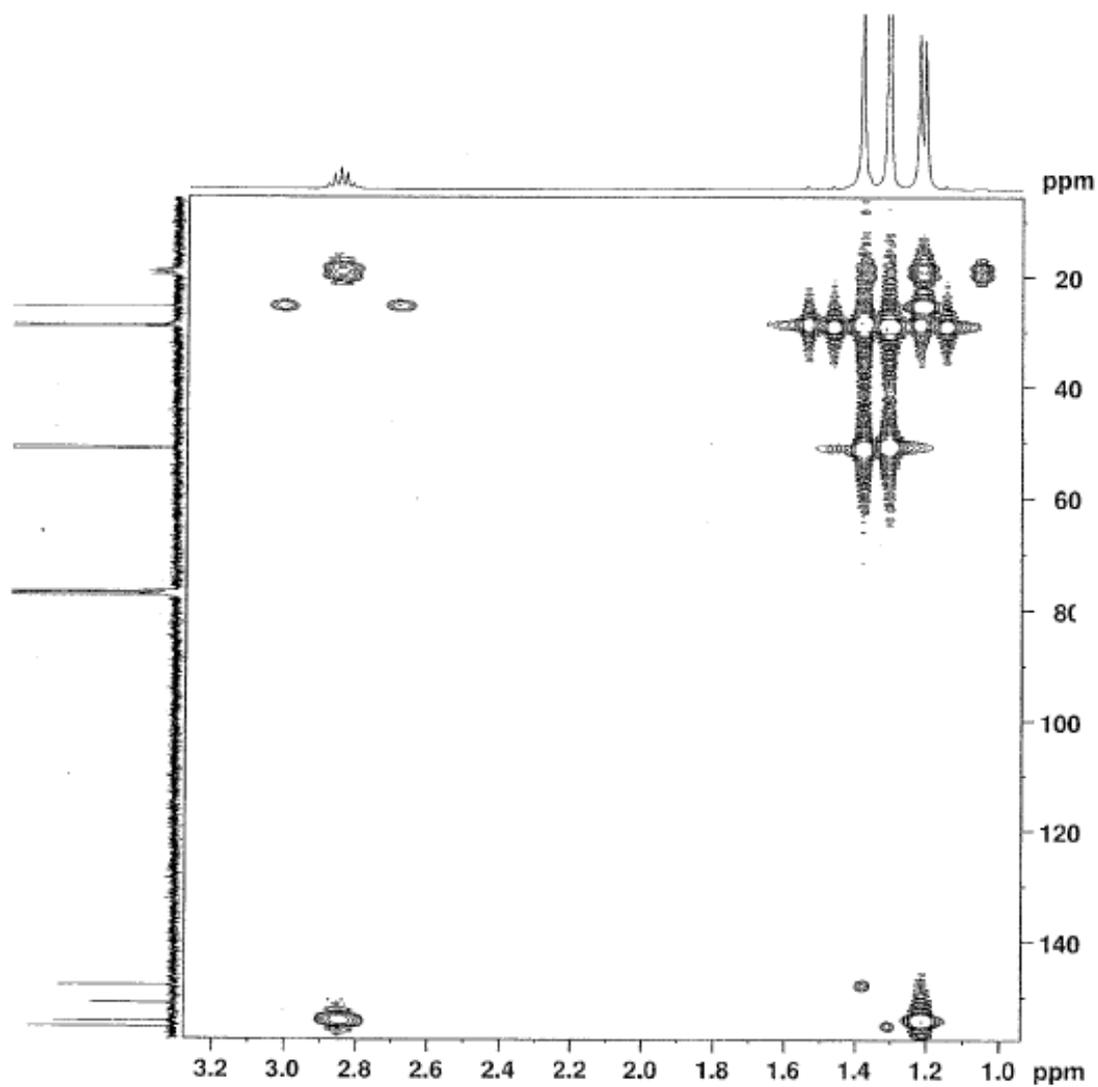


Figura 29. Espectro de RMN ^1H - ^{13}C HMBC da Impureza B de Amicarbazona – ampliado.

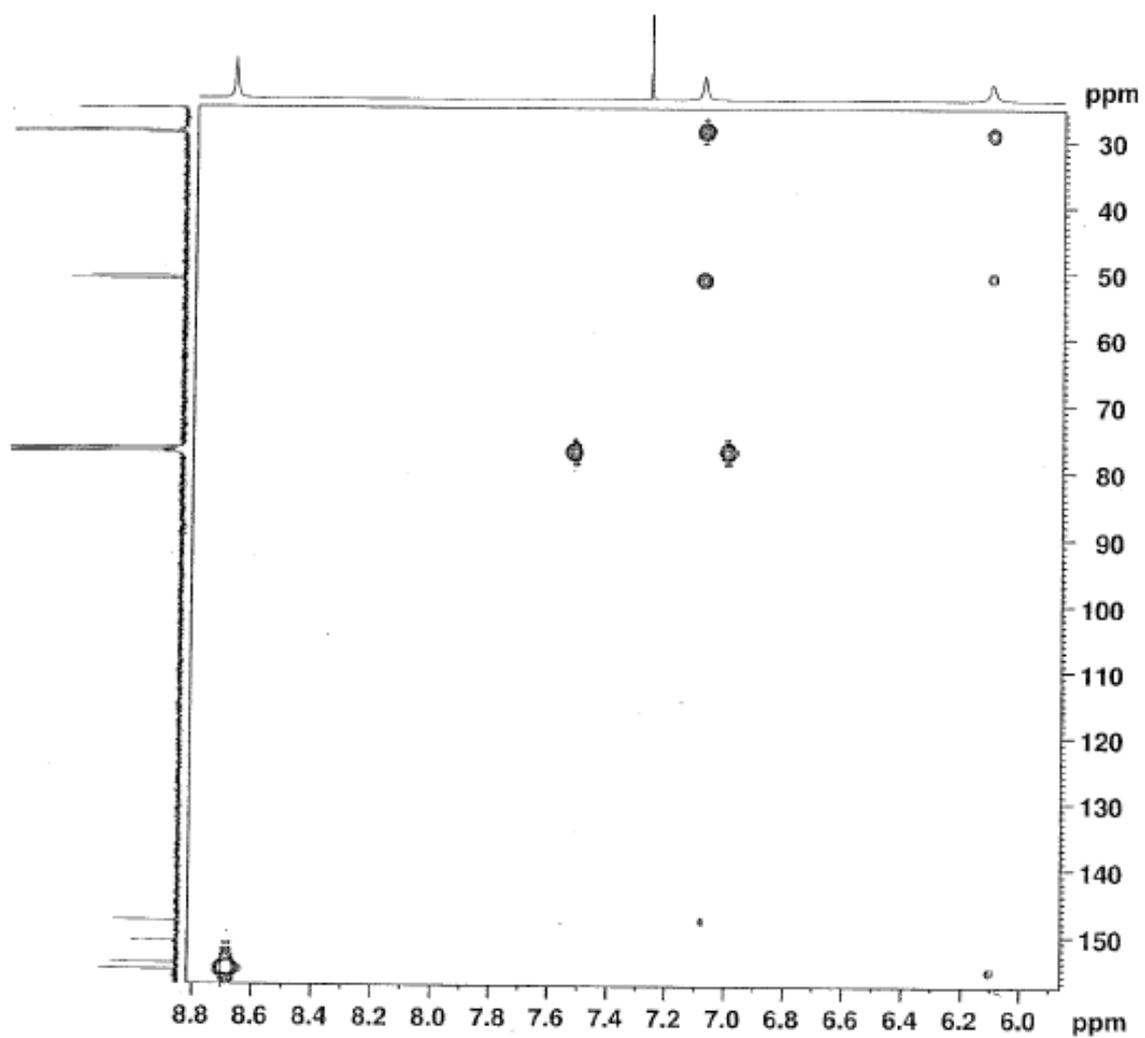


Figura 30. Espectro de RMN ^1H - ^{13}C HMBC da Impureza B de Amicarbazona – ampliado.

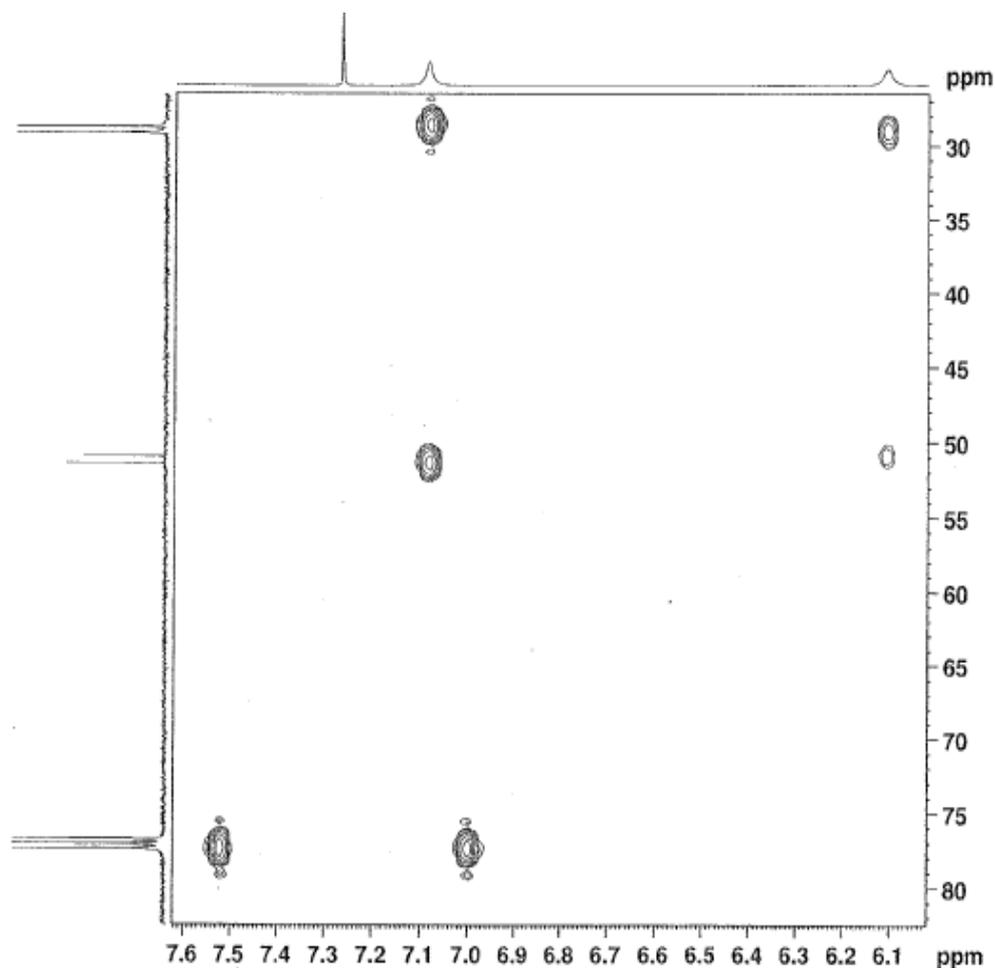


Figura 31. Espectro de RMN ^1H - ^{13}C HMBC da Impureza B de Amicarbazona – ampliado.

A Tabela 16 contempla os resultados dos espectros de RMN ^1H - ^{13}C HMBC. Por causa da dificuldade na interpretação dos resultados, colocaram-se na tabela os resultados mais confiáveis após a análise dos dados.

Tabela 16. Dados de RMN ^1H - ^{13}C HMBC da Impureza B de Amicarbazona.

Deslocamento	25,4	29,1	50,8	154,5	155,1
C (ppm)					
Acopla com H	1,1 até 1,6	6,1 e 7,0	6,1 e 7,0	1,2 e 1,3	1,2 / 1,3 / 8,7
(ppm)					

Assim, com base nos espectros obtidos e nas tabulações dos resultados, a estrutura proposta para a Impureza B de Amicarbazona é mostrada na Figura 32.

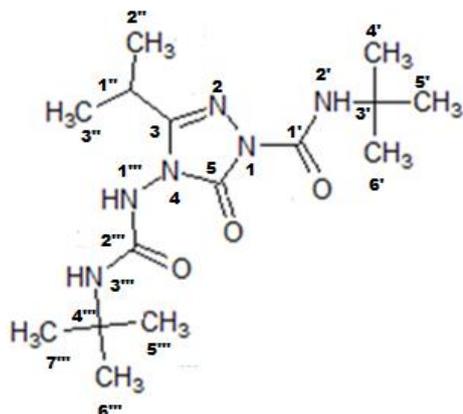


Figura 32. Estrutura proposta para a Impureza B de Amicarbazona com marcação do carbono e hidrogênio em preto.

A caracterização condiz com os valores de deslocamentos obtidos, evidenciando a adequação na atribuição dos sinais.

Os grupos metilas presentes nas extremidades da molécula podem ser os responsáveis pelos espectros de difícil interpretação, pois promovem múltiplos acoplamentos sucessivos, que são registrados no gráfico de RMN.

O mecanismo proposto de degradação é mostrado na Figura 33, onde inicialmente temos o mesmo ataque nucleofílico da dupla ligação que ocorre para a formação da Impureza A, e após a adição dos fragmentos nos extremos da Impureza A. Para tanto, espera-se uma estequiometria de 1:2, conforme ilustrado abaixo.

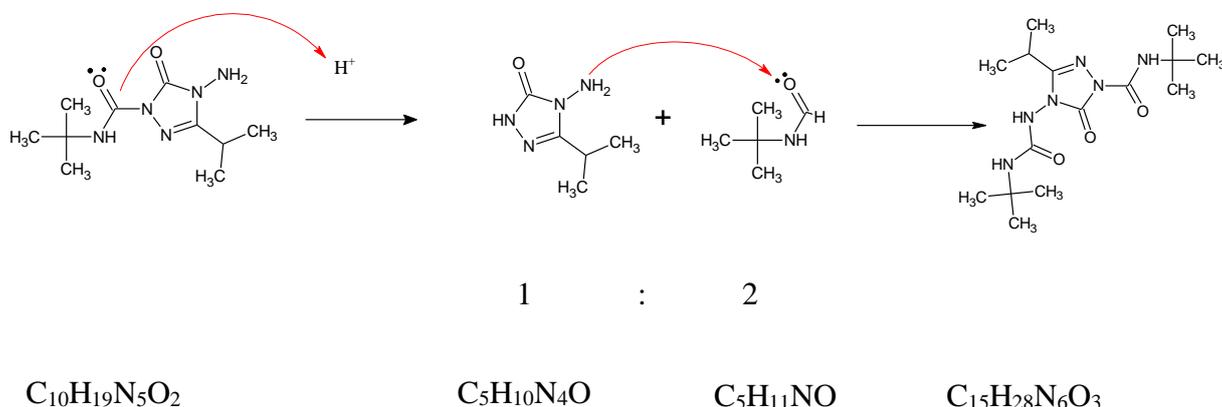


Figura 33. Mecanismo de degradação para a Impureza B de Amicarbazona.

Esta impureza também é esperada neste agroquímico, e é nomeada como Bis-Acyl (nome químico: N-tert-butil-4-[(tert-butilcarbamoil)amino]-5-oxo-3-(2-propanil)-4,5-dihidro-1,2,4-triazole-1-carboxamide. Número CAS: 129909-90-6. Massa molecular: 340 Da).

As Impurezas A e B do princípio ativo de amicarbazona são de conhecimento da rota de síntese do agroquímico, restritas aos fabricantes e, portanto, não estão abertas à consulta pública.

A concentração de Impureza A e B formadas foram de 0,260% e 0,173% respectivamente, valores acima do limite permitido, que é 0,15% (Tabela 2). Os cálculos foram realizados de acordo com a Equação 1.

$$\text{Degradação (m/m)} = \frac{(\% \text{ impureza formada} \times \text{massa do ativo})}{\% \text{ do ativo na amostra}} \quad (1)$$

4.2 Azoxistrobim

A caracterização do produto inicial é exemplificada a seguir. Para este agroquímico, 5,17 mg de amostra foram diluídos em clorofórmio deuterado, porém a solubilização não foi completa, restando pequenas suspensões na amostra.

A Figura 34 mostra o espectro de RMN ^1H da azoxistrobim. Observam-se 8 sinais distintos sendo 5 simpletos bem definidos, e sinais de multipletos em torno de 7,6 ppm, 7,3 e 7,2 ppm.

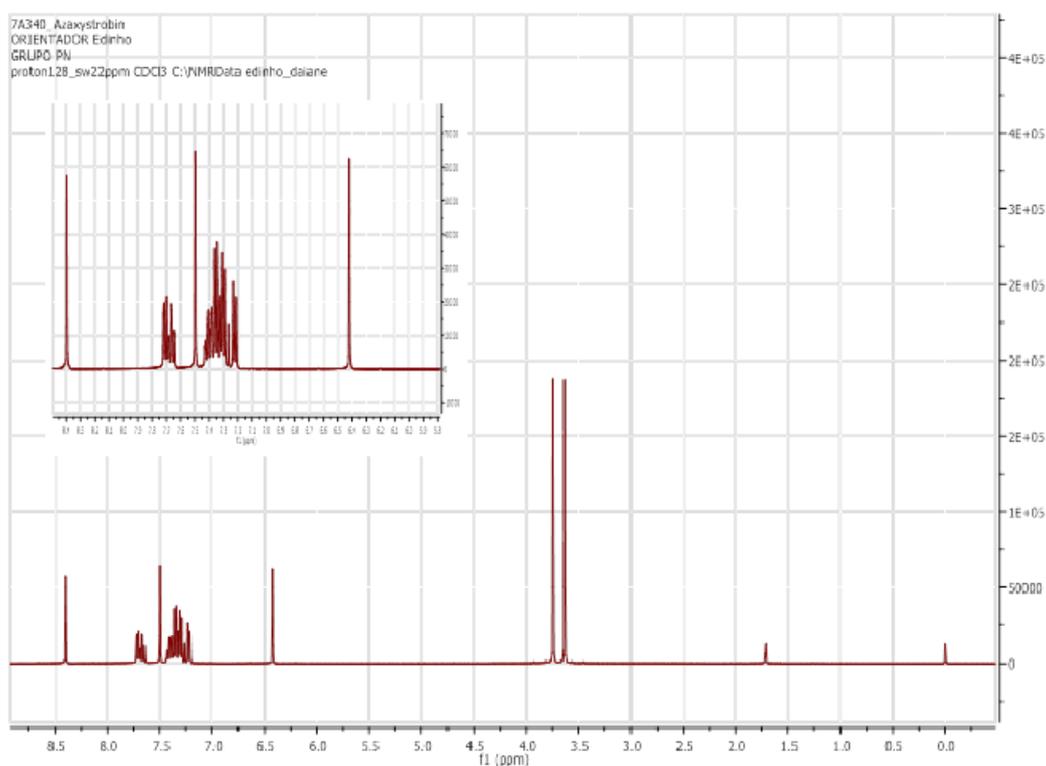


Figura 34. Espectro de RMN ^1H de Azoxistrobim (CDCl_3 , 400 MHz).

O espectro de RMN ^{13}C é mostrado na Figura 35, com deslocamentos químicos bem próximos uns dos outros na região de carbonos de aromáticos. A faixa de deslocamento observada varia de 50 ppm a 173 ppm, e nestas faixas de deslocamento podem estar presentes sinais de carbonos dos grupos funcionais de metoxilas, carbonilas, carbonos de anéis aromáticos e ligação carbono-nitrogênio.

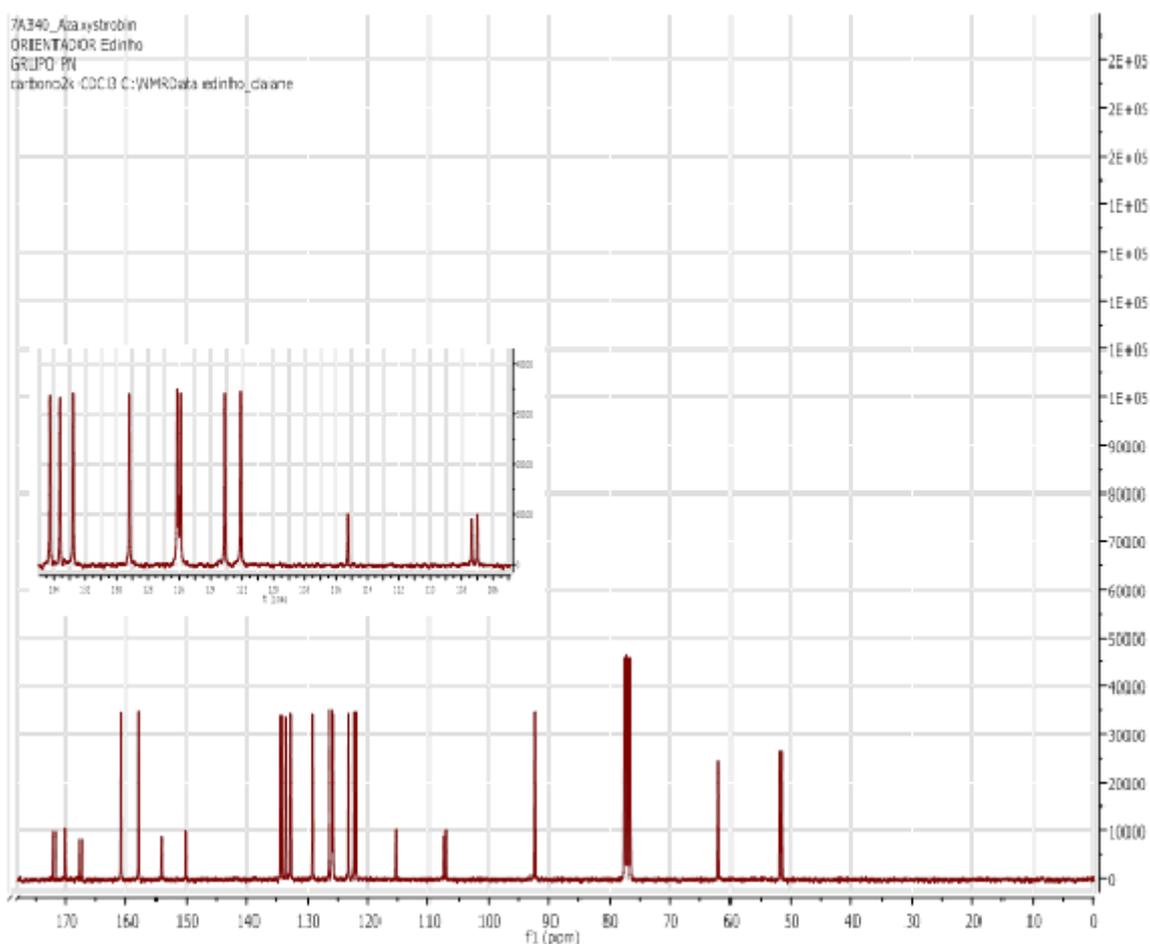


Figura 35. Espectro de RMN ^{13}C de Azoxistrobim (CDCl_3 , 100 MHz).

A Tabela 17 apresenta os deslocamentos de hidrogênio e carbono observados, correlacionados aos dados da literatura (MASTOVSKA, 2008), por aproximação. Notam-se dois dupletos, em 6,6 ppm e 8,3 ppm, dois singletos, em 3,7 ppm e 3,9 ppm e os multipletos.

Tabela 17. Dados de RMN ^1H e ^{13}C de Azoxistrobim (CDCl_3 / 400MHz e 100 MHz).

Número	Deslocamento ^1H (ppm) Lit*.	Deslocamento ^1H (ppm) Obt.	Deslocamento (ppm) ^{13}C Lit*.	Deslocamento ^{13}C (ppm) Obt.
1			171,1 s	172,2
6''*			170,0 s	170,1
4''*			167,4 s	167,0
3	8,40 s	8,30 s	160,7 d	161,2
5'''	7,71 dd	7,90 dd	157,9 d	157,8
1'''			154,1 s	155,0
2'			150,1 s	150,0
4'''	7,67 ddd	7,66 m	134,2 d	133,6
2''	7,50 s	7,49 s	133,5 d	132,0
3'''	7,41 – 7,22 m	7,31 m	132,7 d	131,4
4'	7,41 – 7,22 m	7,31 m	129,1 d	131,2
3'	7,41 – 7,22 m	7,31 m	126,1 d	127,0
1''''			125,9 s	125,7
5'	7,41 – 7,22 m	7,31 m	125,8 d	125,6
6'	7,41 – 7,22 m	7,31 m	123,0 d	123,1
3'	7,41 – 7,22 m	7,31 m	122,0 d	122,4
2'''			115,2 s	115,0
2			107,3 s	108,9
1'			106,9 s	105,4
5''	6,42 s	6,61 s	92,4 d	91,4
4	3,75 s	3,71 s	51,6 q	51,1
5	3,64 s	3,92 s'	63,3 q	62,3

(*MASTOVSKA, 2008).

Assim, com base nos espectros apresentados e na tabulação dos resultados, a estrutura do agroquímico de Azoxistrobim é apresentada na Figura 36.

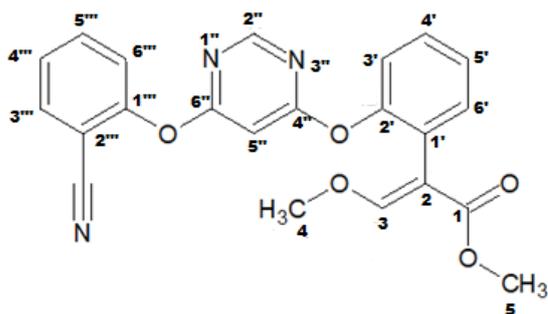


Figura 36. Estrutura de Azoxistrobim com indicação dos números atribuídos aos hidrogênios e carbonos.

4.2.1 Azoxistrobim – Impureza A

Inicialmente realizou-se um teste preliminar onde se preparou uma solução de $1000 \mu\text{g.L}^{-1}$ de amostra de azoxistrobim técnica em acetonitrila, para obter o perfil do cromatograma e o espectro de massas de íons totais da amostra, conforme ilustrado na Figura 37 e ajustar, se necessário, as condições cromatográficas.

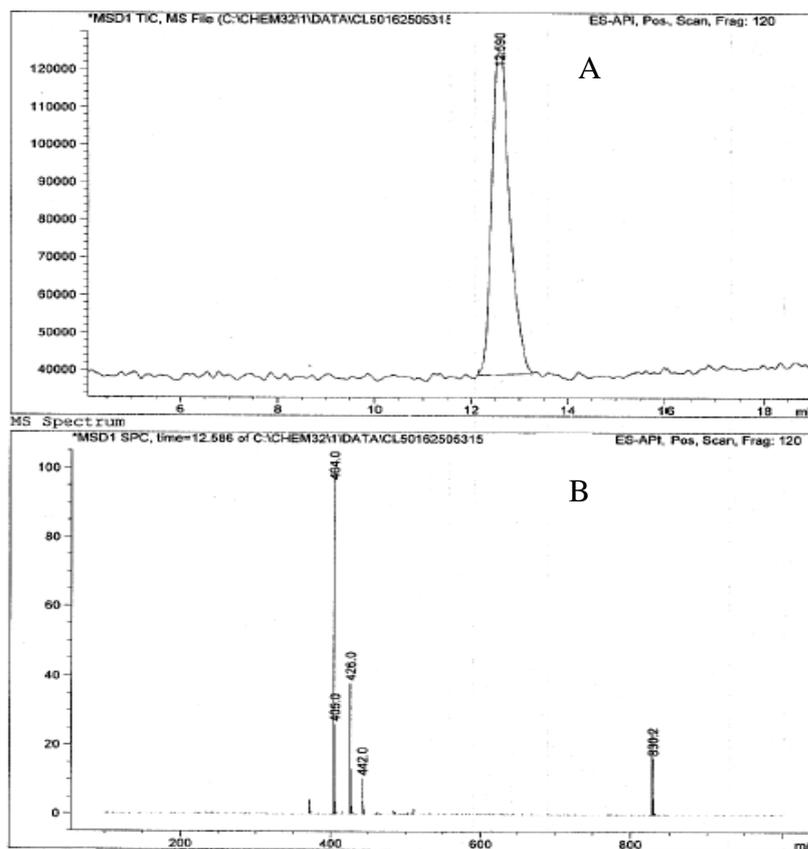


Figura 37. A) Perfil cromatográfico da análise de Azoxistrobim por LC/MS; B) Espectro de massas obtido na análise por LC/MS de Azoxistrobim – 1000 ppm (MM = 403,394 g/mol).

É possível observar que o íon a m/z 404,0 correspondente a $[(M+H)^+]$, e a presença dos ions de adutos m/z 405,0, 426,0, 442,0 e 830.

Embora seja uma molécula com estrutura complexa, a Azoxistrobim é muito estável com seus 3 anéis aromáticos, que espera-se que não reajam nas condições de degradação empregadas neste estudo.

A Figura 38 apresenta o cromatograma da análise cromatográfica realizada com o extrato da reação de degradação após os 10 dias de incubação ácida, cujos resultados indicam a formação de vários produtos de degradação e predominante a recuperação de Azoxistrobim.

É possível notar duas impurezas, com tempo de retenção de 9,522 min e 11,566 min, nomeadas de Impureza A e B respectivamente e a recuperação em muito maior proporção da Azoxistrobim com tempo de retenção de 12,5 min. Os demais picos observados foram descartados em função da pequena área dos sinais.

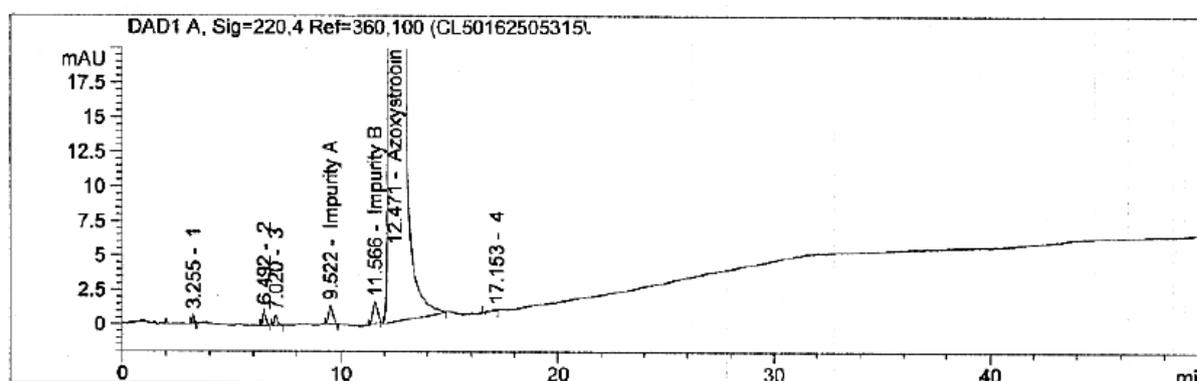


Figura 38. Cromatograma do tratamento de Azoxistrobim em incubação ácida- 10 dias - screening.

Foram obtidos os espectros de massas dos produtos de degradação (impurezas A e B) mostrados na Figura 38 e aquele da impureza A é mostrado na Figura 39.

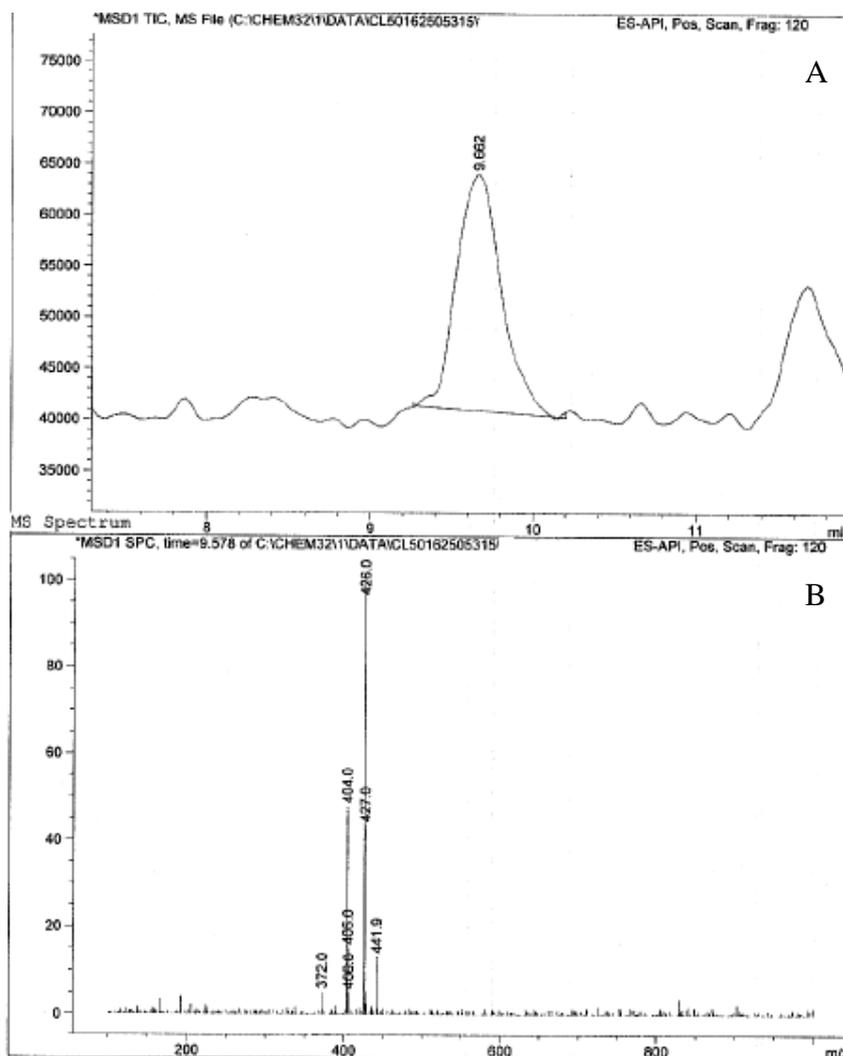


Figura 39. A) Perfil cromatográfico da análise da Impureza A de Azoxistrobim por LC/MS; B) Espectro de massas obtido na análise da Impureza A de Azoxistrobim por LC/MS.

É possível observar fragmentos em m/z 372,0 [(M+H)⁺-MeOH], 404,0 [(M+H)⁺] e dos adutos 426,0 e 441,9.

Os espectros de massas da Impureza A e da Azoxistrobim são muito semelhantes e sugerem que a impureza é muito similar com a molécula inicial.

Os espectros de RMN ¹H e RMN ¹³C obtidos foram iguais ao da caracterização do produto inicial, indicando que a Impureza A é um isômero de azoxistrobim. Este fato não pode ser comprovado pelas correlações dos espectros bidimensionais, pois devido a dificuldade de solubilização, não foi possível a obtenção dos mesmos.

Existe um subproduto de conhecimento da rota de síntese da indústria, chamada de Z-Azoxistrobina (nome químico: Metil (2Z)-2-(2-{[6-(2-cianofenóxi)pirimidil-4-oxi}fenil)-3-

metoxi-2-propenoato, (Número CAS: 143130-94-3. Massa nominal: 403 Da), assim com base nos dados obtidos, infere-se a formação da mesma.

É possível observar na Figura 40 que para a Impureza A ocorre a metameria, que é um tipo especial da isomeria de posição do agroquímico Azoxistrobim, cuja mudança é na configuração do grupo propenoato, E em Azoxistrobim e Z na impureza A.

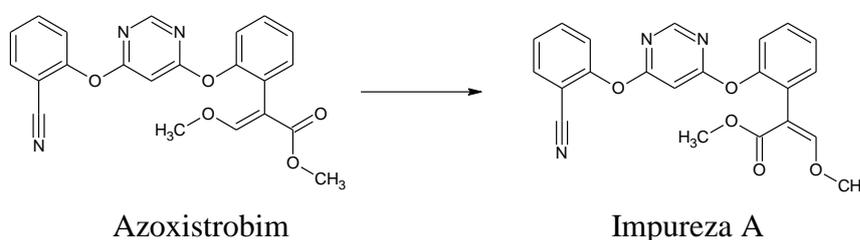


Figura 40. Isomerização de Azoxistrobim.

Para a Impureza B após a rotoevaporação formou-se numa pasta grudenta, de difícil remoção do balão de fundo chato e, portanto não foi possível a obtenção dos espectros unidimensionais e bidimensionais. É possível observar que a Impureza B elui muito próximo ao pico do ativo Azoxistrobim, o que pode ter causado a formação desta pasta, a partir da interação da impureza com o ativo.

Tentou-se uma melhor separação dos compostos por cromatografia, alterando-se as condições do método, porém os resultados foram insatisfatórios.

A concentração de Impureza A e B formadas foram de 0,189% e 0,059% respectivamente. O valor da quantidade para a Impureza B (1,02 mg recuperados, 3,91 mg retidos no balão) indicado é impreciso devido a dificuldade de remoção da impureza da superfície do balão de fundo chato. O valor para a Impureza A está acima do limite permitido, que é 0,15% (Tabela 2). Os cálculos foram realizados de acordo com a Equação 1.

$$\text{Degradação (m/m)} = \frac{(\% \text{ impureza formada x massa do ativo})}{\% \text{ do ativo na amostra}} \quad (1)$$

Os estudos presentes na literatura sobre este subproduto versam sobre seu efeito em animais e plantas (SILVA, et. al., 2006), ou a utilizam como marcador (RANZI, 2013). Não

foi encontrado um trabalho onde seja tratada a impureza gerada da degradação, suas características e toxicologia.

4.3. Picloram

A caracterização do produto inicial é exemplificado a seguir com espectros simulados. A molécula de Picloram não possui hidrogênios que possam ser analisados pela técnica de RMN ^1H , portanto, apenas a obtenção do espectro de RMN ^{13}C foi possível. A Figura 41 mostra o espectro simulado de RMN ^{13}C .

Notam-se cinco sinais distintos, compreendidos entre 110 ppm e 165 ppm, sugerindo a presença de carbonos ligados a cloro, nitrogênio e ácido carboxílico.

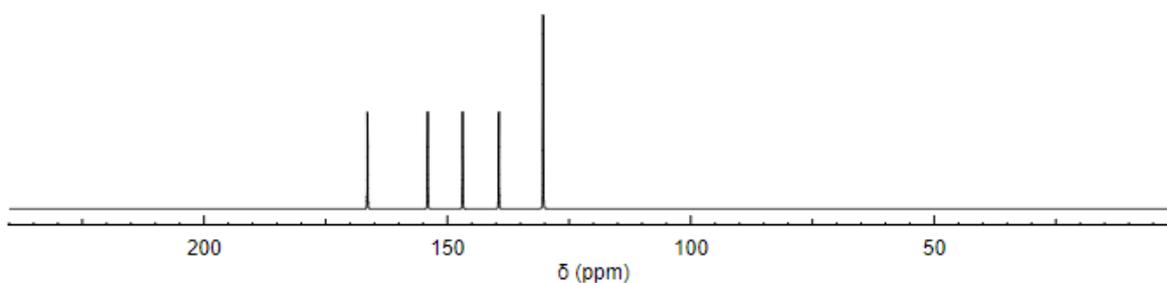


Figura 41. Simulação do espectro de RMN ^{13}C de Picloram (Simulate and Predict NMR – adaptado).

A Tabela 18 correlaciona os deslocamentos observados na Figura 41 com os dados da literatura (MERKLE, 1967).

Tabela 18. Dados de RMN ^{13}C de Picloram.

Numeração	Deslocamento ^{13}C (ppm)	
	Literatura*	Calculados
2	150	154,0
3 ou 5	110	130,3
3 ou 5	111	130,3
4	145	139,4
6	146	146,8
1'	165	166,4

(*<https://www.nmrdb.org>)

Assim, a estrutura foi definida com base nos dados obtidos no LC/MS e do espectro de RMN ^{13}C . A Figura 42 ilustra a molécula.

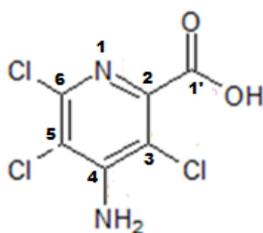


Figura 42. Estrutura proposta para Picloram com marcação da numeração de carbonos em preto.

A caracterização condiz com os valores de deslocamentos obtidos, evidenciando a adequação na atribuição dos sinais.

4.3.1 Picloram – Impureza A

Realizou-se um teste preliminar onde se preparou uma solução de 1000 mg.L^{-1} de amostra de Picloram técnica em acetonitrila (pesou-se $5,02 \text{ mg}$), para obter o perfil do cromatograma e os íons formados na fragmentação da molécula, conforme ilustrado na Figura 43 e ajustar, se necessário, as condições cromatográficas.

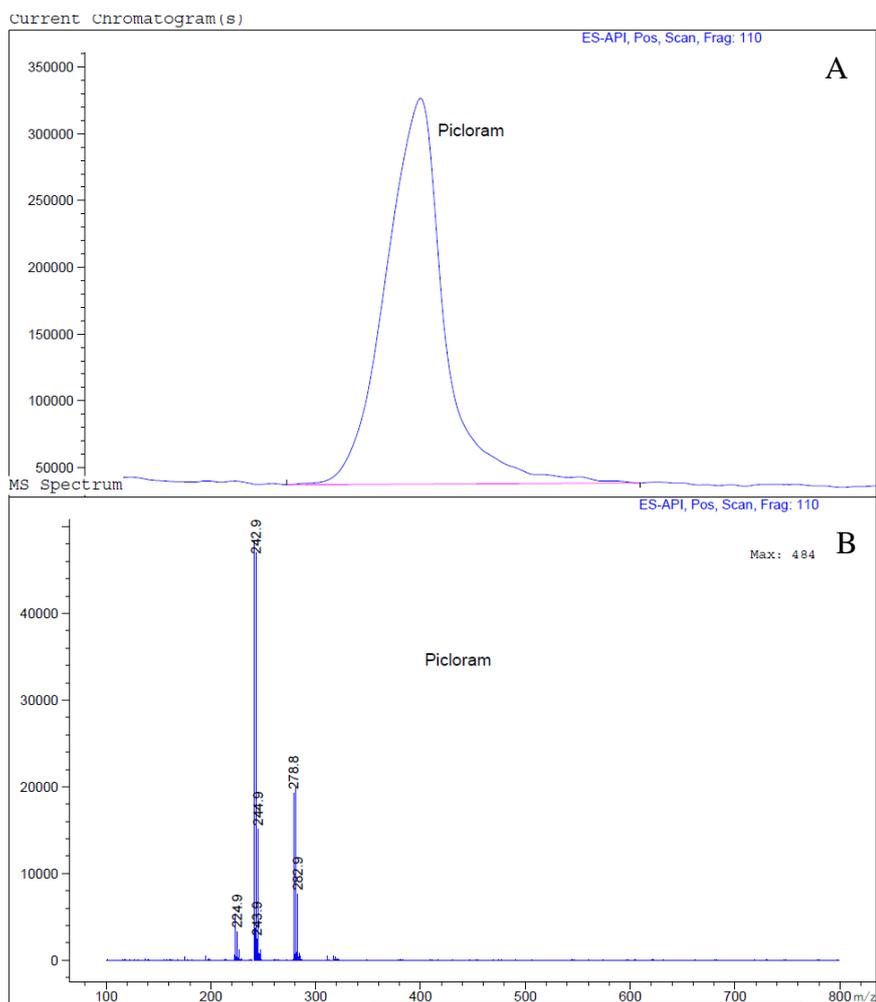


Figura 43. A) Perfil cromatográfico da análise por LC/MS de Picloram; B) Espectro de massas da análise por LC/MS de Picloram – 1000 ppm (MM = 241,460 g/mol).

É possível notar fragmentos em m/z 240,8, m/z 242,9, 244,9 [(M+H)⁺, Cl₃₅ e Cl₃₇] referente a massa molecular mais um hidrogênio de picloram e o fragmentos em 224,9 [(M+H-NH₂)⁺] e íons m/z 278,8, 280,8, 282,9 relativo a adutos.

A Figura 44 mostra o cromatograma gerado após os 10 dias de incubação da degradação ácida, cujos resultados foram mais significativos em relação à intensidade de sinal e quantidade de material seco após a rotoevaporação.

É possível notar cinco impurezas, com tempo de retenção de 3,72 min, 19,42 min, 20,86 min, 23,14 min e 28,61 min, nomeadas de Impureza A a E respectivamente.

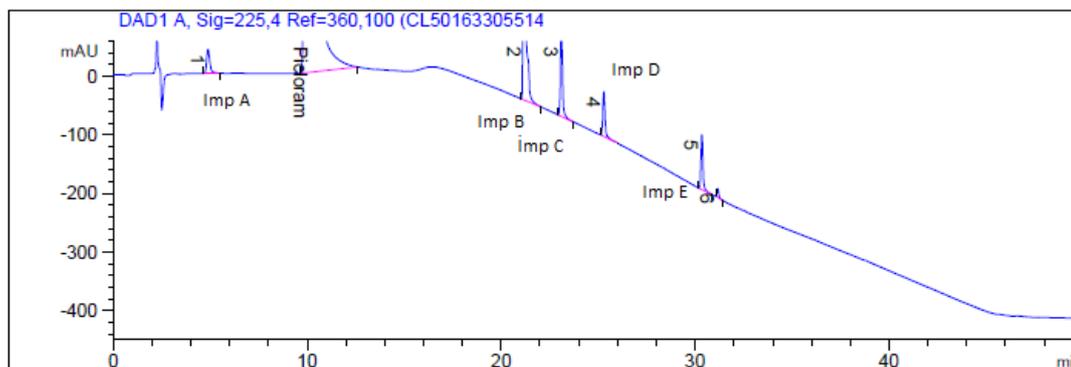


Figura 44. Cromatograma do tratamento de Picloram com 10 dias de incubação ácida - screening.

Em seguida, após o tempo 10 dias de degradação, injetou-se uma amostra no cromatógrafo líquido acoplado a espectrometria de massas para obtenção do perfil da Impureza A, como mostrado na Figura 45. Todas as impurezas observadas na Figura 44 foram obtidas; selecionou-se cada pico de interesse e tirou-se o espectro de massa do pico selecionado.

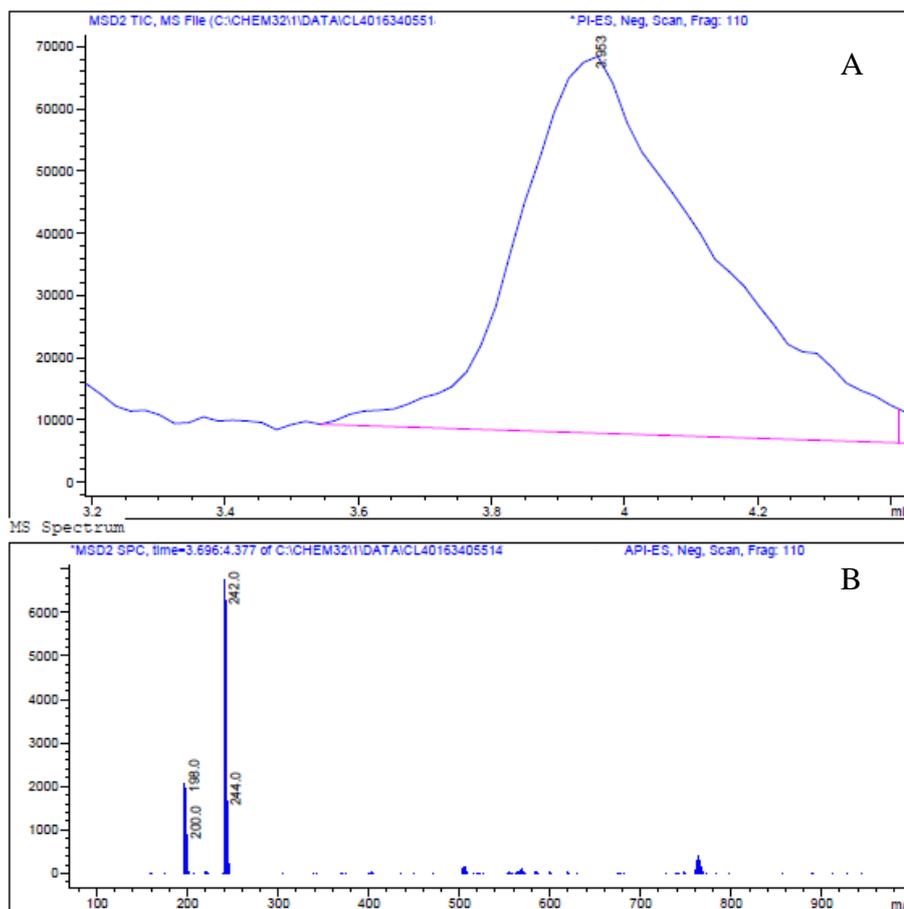


Figura 45. A) Perfil cromatográfico da Impureza A de Picloram analisada por LC/MS; B) Espectro de massas da Impureza A de Picloram analisada por LC/MS.

É possível notar fragmentos em m/z 242,0, 244,0 [(M+H)⁺, Cl₃₅ e C₃₇], e a presença dos fragmentos m/z 198,0, 200,0 (M+H-CO₂)⁺].

Foi obtido 4,12 mg de material seco para utilização nos ensaios de RMN. É possível notar na Figura 46 sete deslocamentos distintos, compreendidos na faixa de 40 ppm a 170 ppm, evidenciando a presença de ligações carbono com cloro, nitrogênio e ácido carboxílico, igualmente ao observado no ativo Picloram.

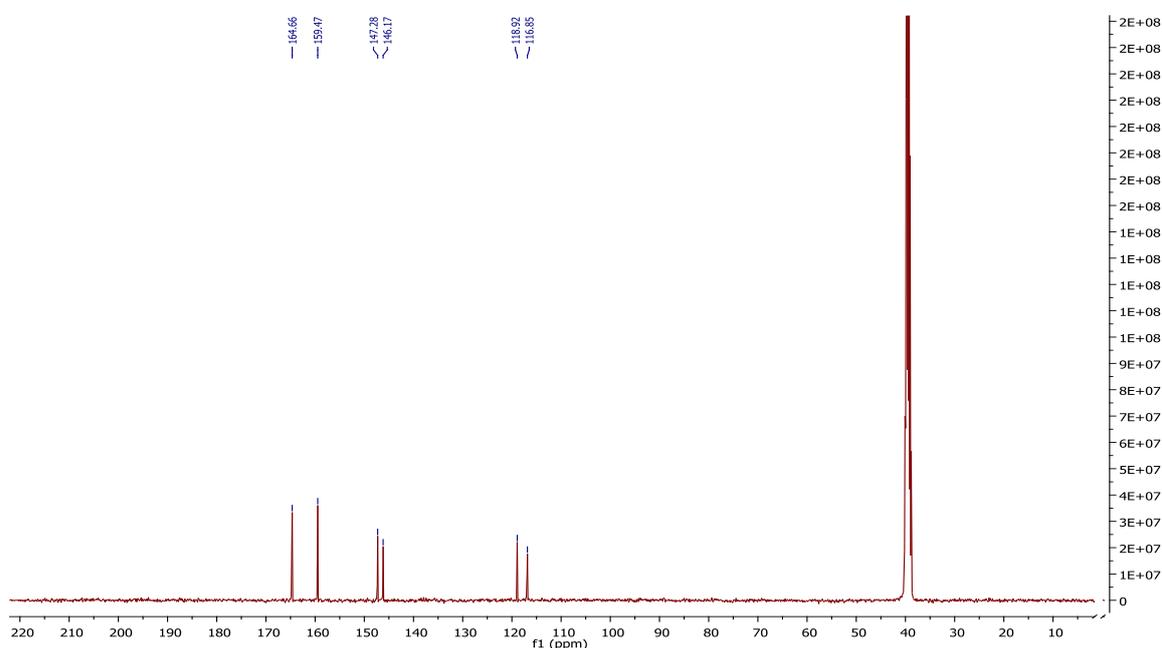


Figura 46. Espectro de RMN ¹³C da Impureza A de Picloram (DMSO-D6, 100 MHz)

A Tabela 19 correlaciona os deslocamentos observados e calculados, com a numeração na estrutura molecular e o carbono correspondente.

Tabela 19. Dados de ¹³C da Impureza A de Picloram (CDCl₃/100MHz)

Carbonos	Deslocamento ¹³ C (ppm)	
	Calculado*	Observado
1'	166,4	165,1
2	154,9	146,2
3	130,3	118,7
4	149,2	159,9
5	116,4	119,8
6	146,8	147,3

(*<https://www.nmrdb.org>)

Pelo mesmo fato que a molécula inicial, para a Impureza A não foi possível a obtenção do espectro de RMN ^1H e dos espectros de RMN bidimensional.

Portanto, a estrutura da Impureza A foi proposta com base na fragmentação, no espectro de RMN ^{13}C e da molécula inicial, como mostrado na Figura 46.

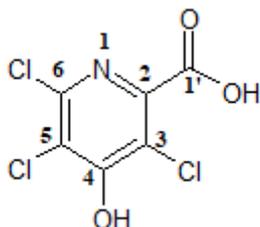


Figura 46. Estrutura proposta para a Impureza A de Picloram com marcação da numeração de carbono.

Esta impureza é de conhecimento da rota de síntese da indústria, cujo nome químico é ácido 3,5,6-tricloro-4-hidroxi-2-piridina. Número CAS: 26449-73-0. Massa nominal: 241 Da.

A caracterização condiz com os valores de deslocamentos obtidos, evidenciando a adequação na atribuição dos sinais.

4.3.1 Picloram – Impureza B

O extrato da degradação ácida por 10 dias de Picloram foi injetada no cromatógrafo líquido acoplado a espectrometria de massas para obtenção do perfil da Impureza B, como mostrado na Figura 47.

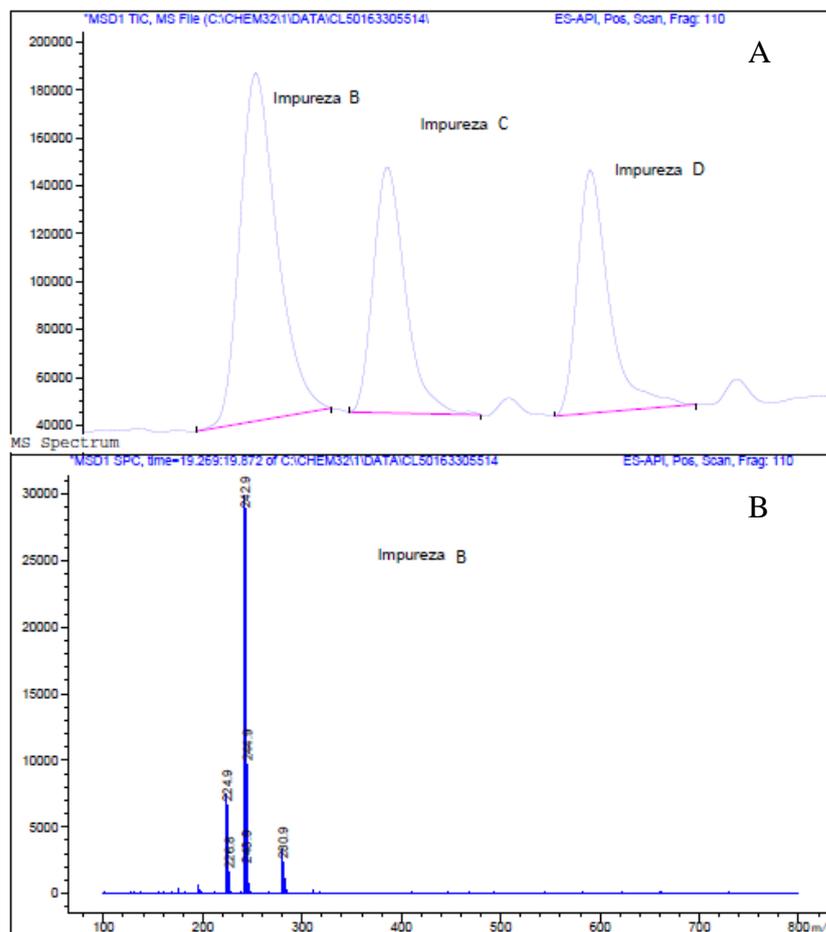


Figura 47. A) Perfil cromatográfico da Impureza B de Picloram analisada por LC/MS; B) Espectro de massas da Impureza B de Picloram analisada por LC/MS.

É possível notar em o íon m/z 242,9, 244,9, 246,8 [(M+H)⁺, Cl₃₅ e Cl₃₇], referente a massa molecular da impureza B mais um hidrogênio e os fragmentos em 224,9, 226,8 [(M+H-NH₂)⁺] e o ion aduto em m/z 280,9. É possível notar também a semelhança do espectro e dos íons desta impureza com o espectro da Impureza A. Nota-se também a proximidade nos tempos de retenção, evidenciando mais uma vez que as moléculas são similares.

A Tabela 20 exemplifica os deslocamentos de RMN ¹³C da Figura 48. Foi obtido 4,77 mg de material seco para a realização dos ensaios de RMN. Da mesma maneira que a Impureza A, esta impureza não possui hidrogênios quantificáveis em RMN ¹H e, portanto só foi possível a obtenção do espectro unidimensional de RMN ¹³C.

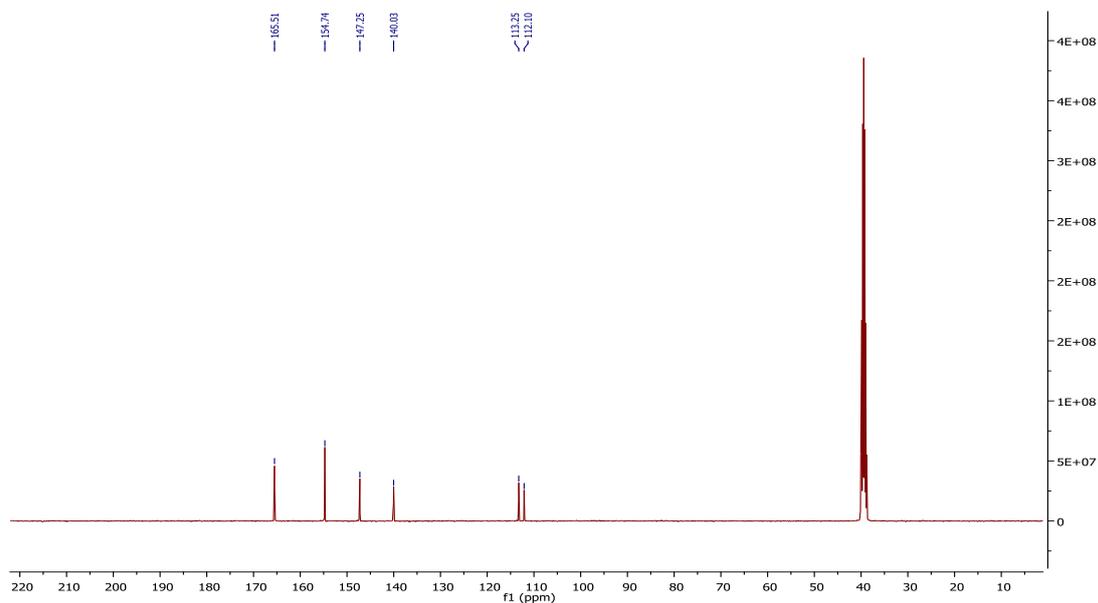


Figura 48. Espectro de RMN ^{13}C da Impureza B de Picloram (DMSO-D6, 100 MHz).

Notam-se cinco sinais distintos e o solvente, compreendidos entre 100 ppm e 160 ppm, que sugerem a presença de ligações carbono com cloro, nitrogênio e ácido carboxílico.

Tabela 20. Dados de RMN ^{13}C da Impureza B de Picloram ($\text{CDCl}_3/100\text{MHz}$)

Carbonos	Deslocamento ^{13}C (ppm)	
	Calculado*	Observado
1'	166,4	167,4
2	154,0	155,0
3	130,3	114,3
4	132,3	112,3
5	130,3	140,1
6	156,6	148,3

(*<https://www.nmrdb.org>)

Portanto, a estrutura da Impureza B foi proposta com base na fragmentação, no espectro de RMN ^{13}C e da molécula inicial, como mostrado na Figura 49.

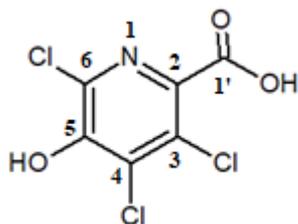


Figura 49. Estrutura proposta para a Impureza B de Picloram com marcação da numeração de carbono em preto.

A caracterização condiz com os valores de deslocamentos obtidos, evidenciando a adequação na atribuição dos sinais.

4.3.2 Picloram – Impureza C

Injetou-se o extrato da amostra tempo 10 dias de degradação ácida no cromatógrafo líquido acoplada a espectrometria de massas para obtenção do perfil da Impureza C, como mostrado na Figura 50.

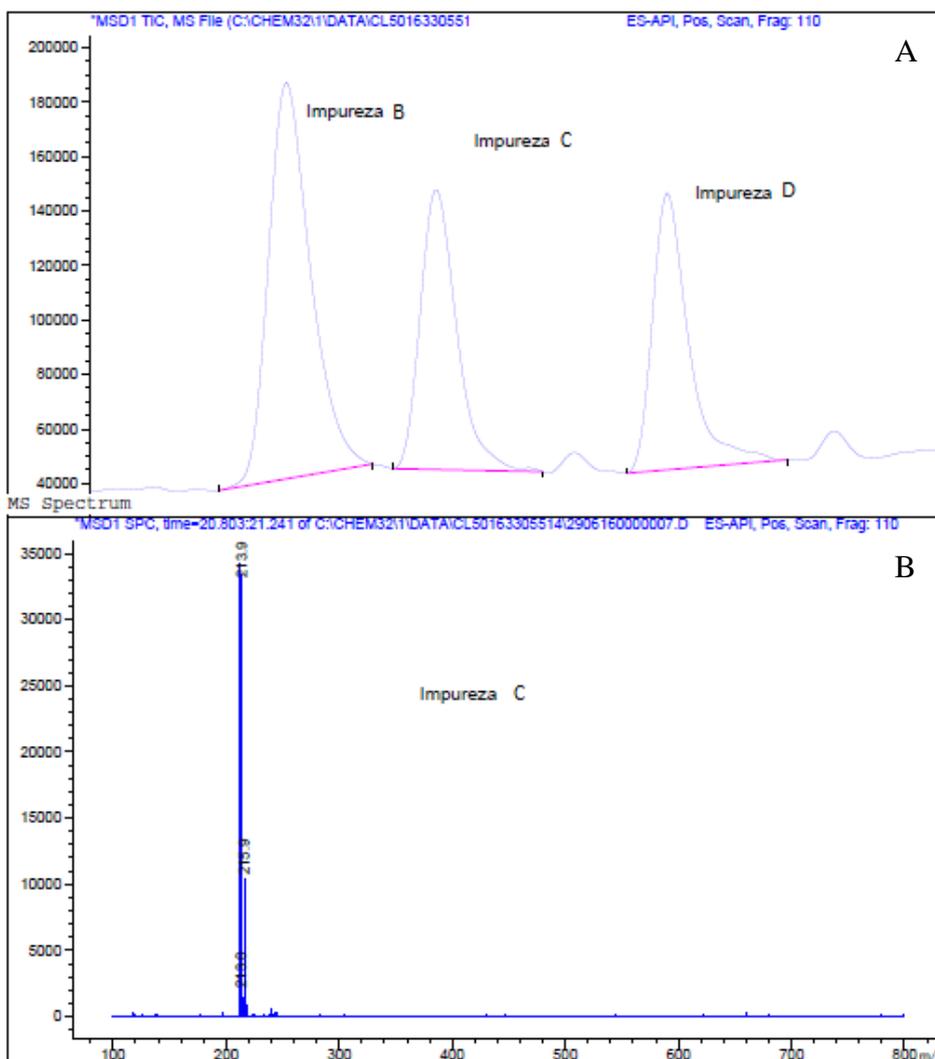


Figura 50. A) Perfil cromatográfico da Impureza C de Picloram analisada por LC/MS; B) Espectro de massas da Impureza C de Picloram analisada por LC/MS.

É possível notar em m/z 211,8, 213,9, 215,9 [(M+H)⁺, Cl₃₅ e Cl₃₇].

Foi obtido 3,26 mg de material para a realização dos ensaios de RMN. Da mesma maneira que a Impureza A, esta impureza não possui hidrogênios quantificáveis em RMN ¹H, e, portanto só foi possível a obtenção do espectro unidimensional de RMN ¹³C.

Os deslocamentos observados na Figura 51 são bem próximos dos deslocamentos obtidos para as impurezas anteriores, portanto, a mudança de uma molécula para outra é bem pequena.

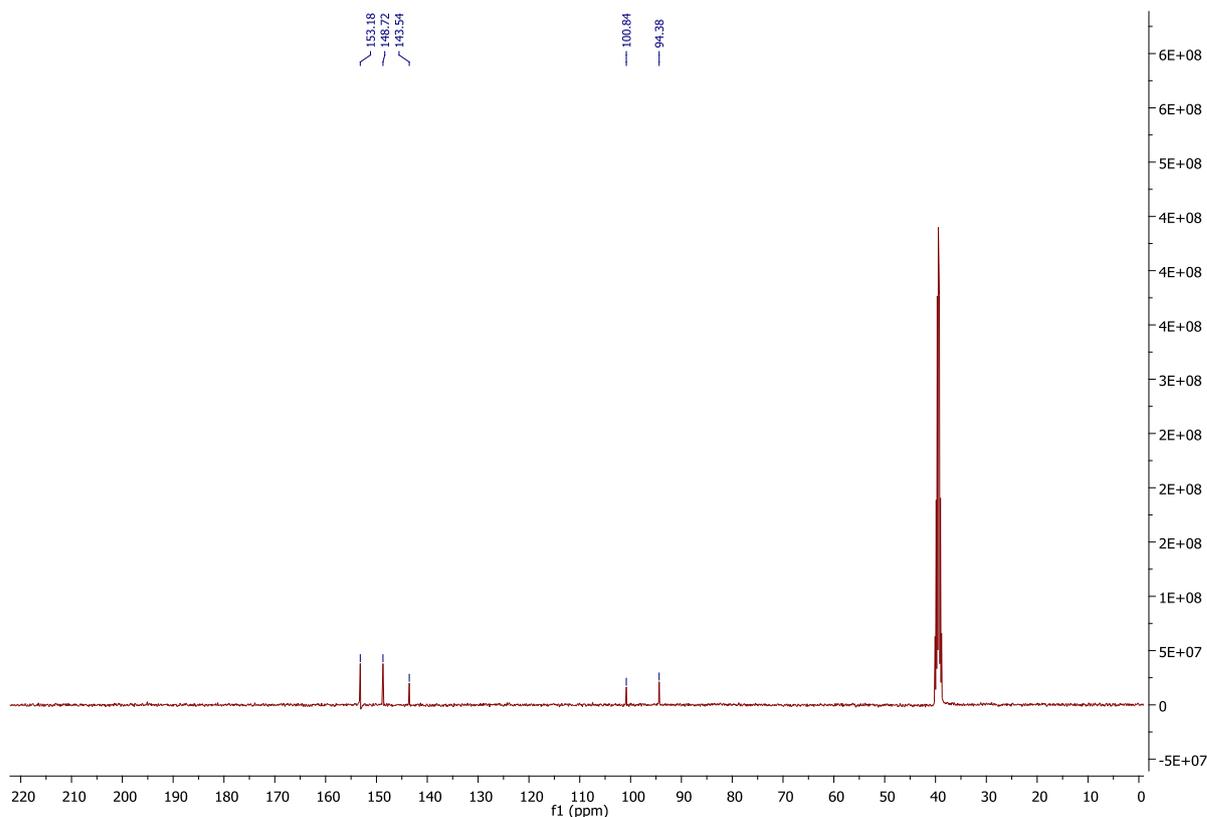


Figura 51. Espectro de RMN ^{13}C da Impureza C de Picloram (DMSO-D₆, 100 MHz).

A Tabela 21 correlaciona os deslocamentos observados na Figura 51 com o deslocamento calculado. Os mesmos conjuntos de átomos observados para as Impurezas A e B também são observados para a Impureza C.

Tabela 21. Dados de RMN ^{13}C da Impureza C de Picloram (CDCl₃/ 100MHz).

Carbonos	Deslocamento ^{13}C (ppm)	
	Calculado*	Observado
2	156,6	155,1
3	130,3	95,2
4	139,4	145,6
5	130,3	101,1
6	146,8	150,2

(*<https://www.nmrdb.org>)

Portanto, a estrutura da Impureza C foi proposta com base na fragmentação, no espectro de RMN ^{13}C e da molécula inicial, como mostrado na Figura 52.

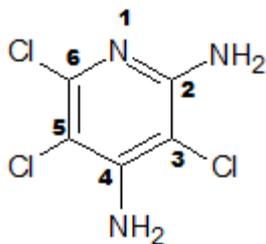


Figura 52. Estrutura proposta para a Impureza C de Picloram com marcação da numeração de carbono em preto.

A caracterização condiz com os valores de deslocamentos obtidos, evidenciando a adequação na atribuição dos sinais.

Esta impureza é de conhecimento como subproduto da rota de síntese da indústria, cujo nome químico é 3,5,6-tricloropridina-2,4-diamina. Número CAS: 725208-26-4. Massa nominal: 211 Da.

4.3.4 Picloram – Impureza D

Injetou-se o tempo 10 dias de degradação ácida no cromatógrafo líquido acoplado a espectrometria de massas para obtenção do perfil da Impureza D, como mostrado na Figura 53.

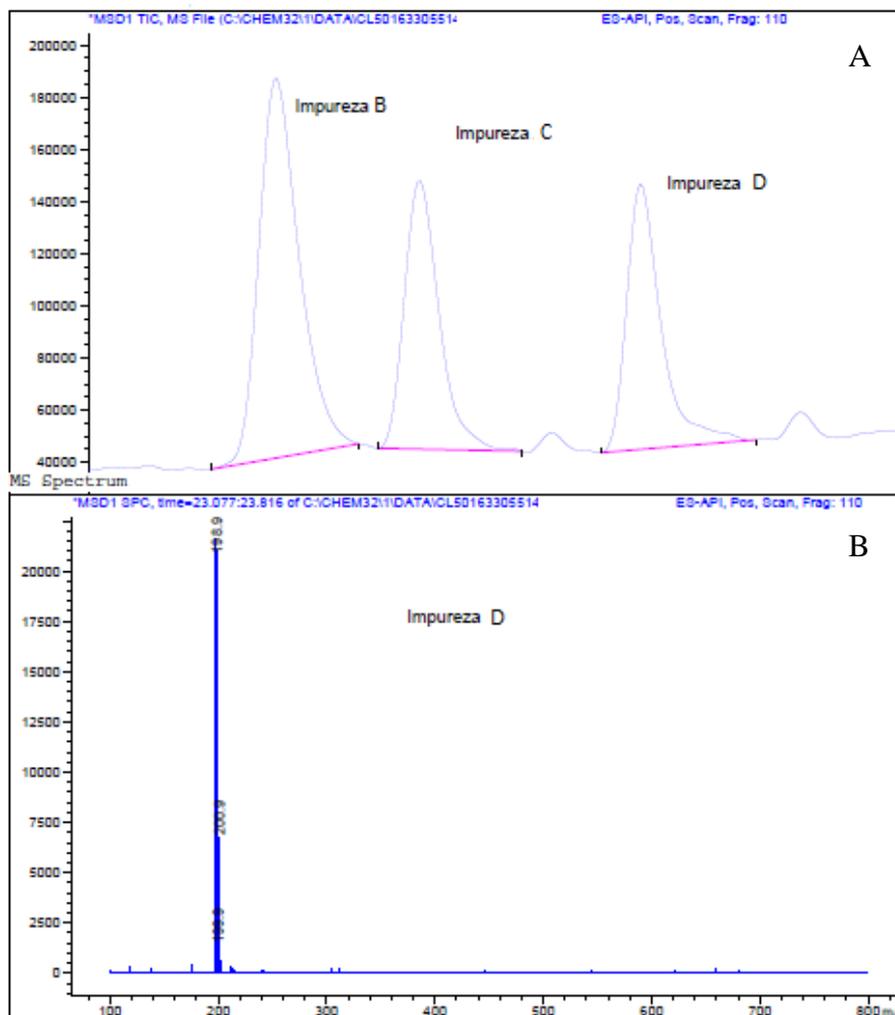


Figura 53. A) Perfil cromatográfico da Impureza D de Picloram analisada por LC/MS; B) Espectro de massas da Impureza D de Picloram analisada por LC/MS.

É possível notar em m/z 198,9, 200,9 e 201,9 $[(M+H)^+, Cl_{35}$ e $Cl_{37}]$.

Foi obtido 3,91 mg de material seco para a realização dos ensaios de RMN. Da mesma maneira que a Impureza A, e as demais houve apenas a obtenção do espectro unidimensional de RMN ^{13}C . São observados na Figura 54 cinco sinais de deslocamento químico de carbonos correspondentes aqueles ligados a cloro e nitrogênio.

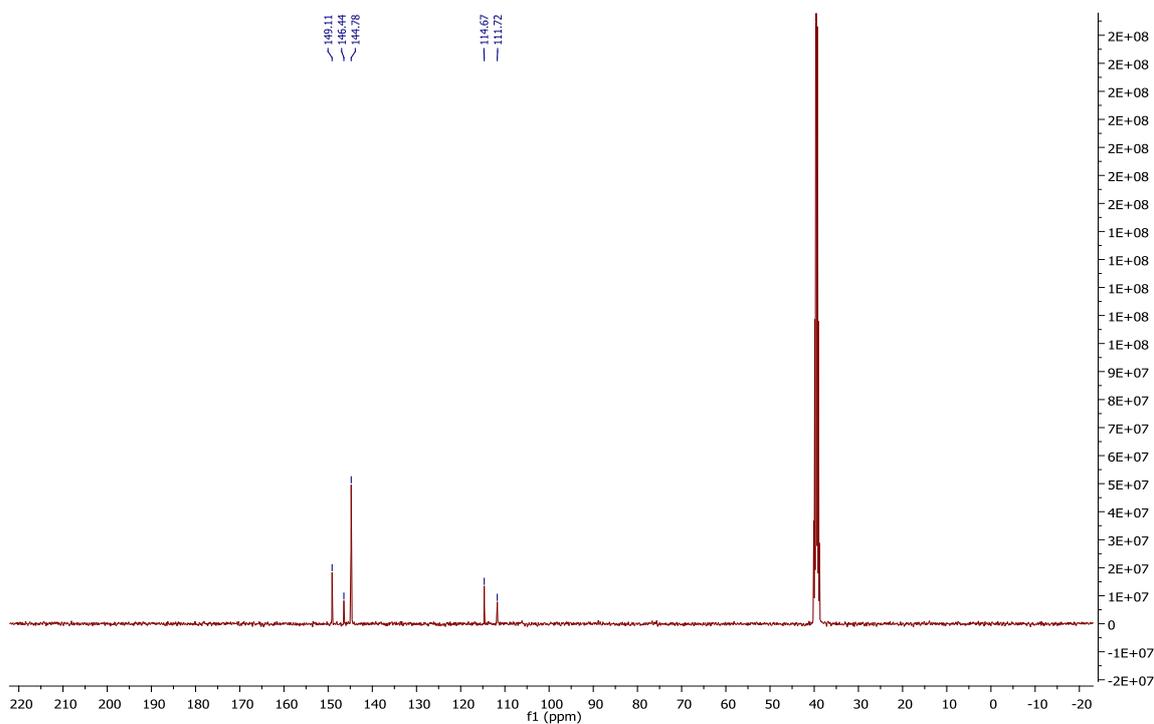


Figura 54. Espectro de RMN ^{13}C da Impureza D de Picloram (DMSO-D6, 100 MHz).

A Tabela 22 correlaciona os deslocamentos obtidos na Figura 54 com o deslocamento calculado.

Tabela 22. Dados de RMN ^{13}C da Impureza D de Picloram (CDCl_3 / 100MHz).

Carbonos	Deslocamento ^{13}C (ppm)	
	Calculado*	Observado
2	144,9	147,0
3	130,3	115,0
4	159,4	150,2
5	130,3	112,2
6	146,8	145,2

(*<https://www.nmrdb.org>)

Portanto, a estrutura da Impureza D foi proposta com base na fragmentação, no espectro de RMN ^{13}C e da molécula inicial, como mostrado na Figura 55.

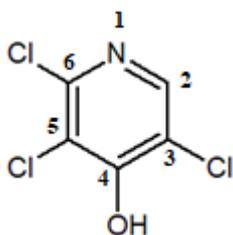


Figura 55. Estrutura proposta para a Impureza D de Picloram com marcação da numeração de carbono em preto.

A caracterização condiz com os valores de deslocamentos obtidos, evidenciando a adequação na atribuição dos sinais.

4.3.5 Picloram – Impureza E

Injetou-se a solução dos extratos do tempo de 10 dias de degradação ácida no cromatógrafo líquido acoplado a espectrometria de massas para obtenção do perfil da Impureza E, como mostrado na Figura 56.

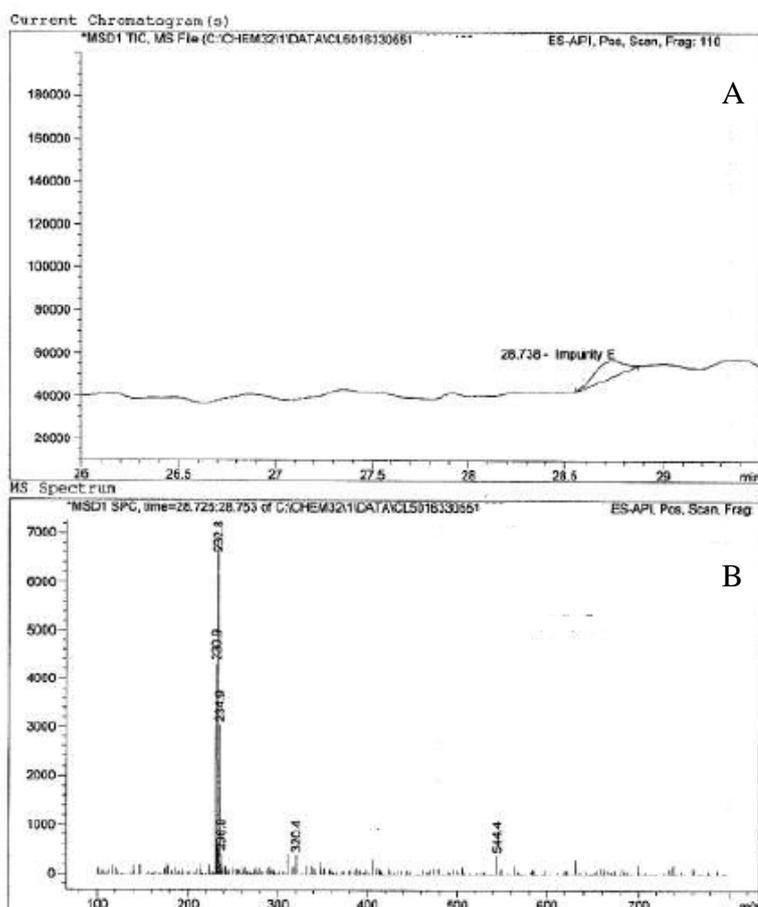


Figura 56. A) Perfil cromatográfico da Impureza E de Picloram analisada por LC/MS; B) Espectro de massas da Impureza E de Picloram analisada por LC/MS.

É possível notar em m/z 230,9, 232,8 e 234,9, 236,8 $[(M+H)^+]$, Cl 35 e 37]. Como o tempo de retenção desta impureza é bem diferente do tempo de retenção das demais, espera-se que a molécula seja diferente das outras.

Foi obtido 3,66 mg de material para a realização dos ensaios de RMN. Da mesma maneira que a Impureza A, esta impureza não possui hidrogênios ligados a carbonos, e, portanto só foi possível a obtenção do espectro unidimensional de RMN ^{13}C . Notam-se na Figura 57 apenas três sinais, com valores de deslocamentos altos, sugerindo a presença majoritária de átomos de cloro e simetria na molécula.

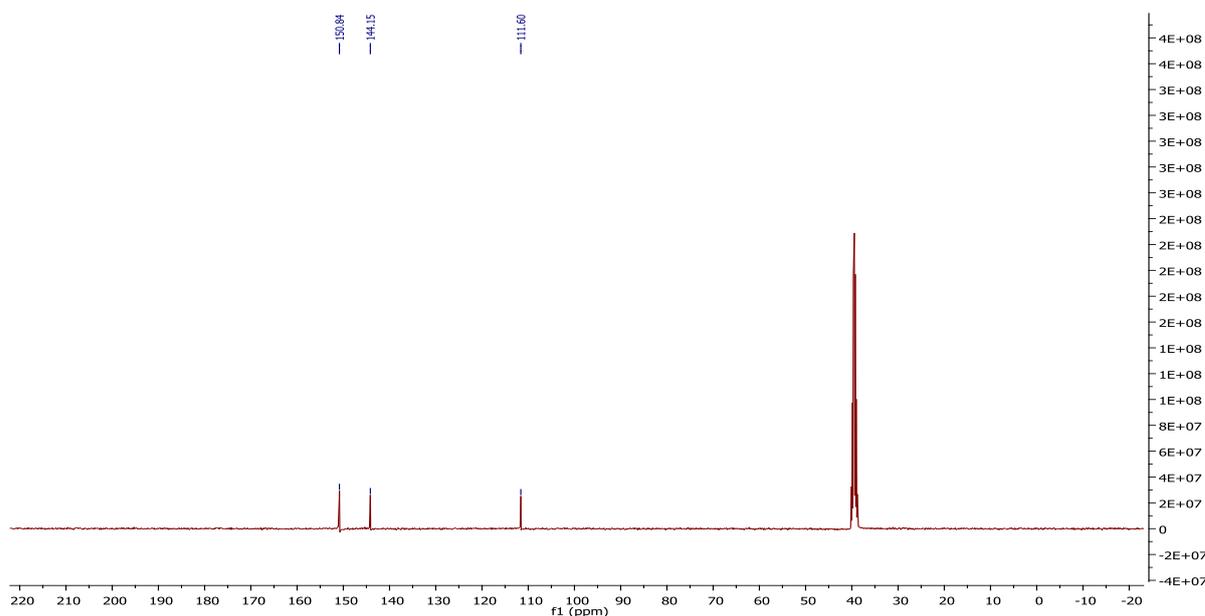


Figura 57. Espectro de RMN ^{13}C da Impureza E de Picloram (DMSO-D6, 100 MHz).

A Tabela 23 exemplifica a Figura 57, correlacionando os valores do deslocamento ao possível grupo de átomos envolvidos.

Tabela 23. Dados de RMN ^{13}C da Impureza E de Picloram (CDCl_3 / 100MHz).

Carbonos	Deslocamento ^{13}C (ppm)	
	Calculado*	Observado
2	146,8	152,1
3	130,3	112,2
4	139,4	145,0
5	130,3	112,2
6	146,8	152,1

(*<https://www.nmrdb.org>)

Portanto, a estrutura da Impureza E foi proposta com base na fragmentação, no espectro de RMN ^{13}C e da molécula inicial, como mostrado na Figura 58.

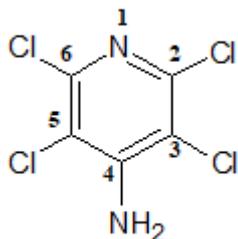


Figura 58. Estrutura proposta para a Impureza E de Picloram com marcação da numeração de carbonos.

A caracterização condiz com os valores de deslocamentos obtidos, evidenciando a adequação na atribuição dos sinais.

Esta impureza é de conhecimento da rota de síntese da indústria como subproduto, cujo nome químico é 2,3,5,6-tetracloropiridina-4-amina. Número CAS: 2176-63-8. Massa nominal: 230 Da.

4.3.6 Rotas de degradação do Picloram

A amostra de Picloram utilizada neste trabalho apresenta pureza de 95%. Desta forma, espera-se que outros compostos estejam presentes junto com o ingrediente ativo, ou mesmo que subprodutos da síntese ainda permaneçam na mistura, como observado para as quatro impurezas, que apresentam pouca variação em relação à molécula original, como evidencia a Figura 59. A análise cromatográfica de Picloram comercial utilizado neste trabalho, item 4.3.2 Figura 43, não mostra as impurezas que foram obtidas durante a reação de degradação e consta da Figura 44 que corresponde ao cromatograma da extração da reação de degradação, que indicam a formação das impurezas.

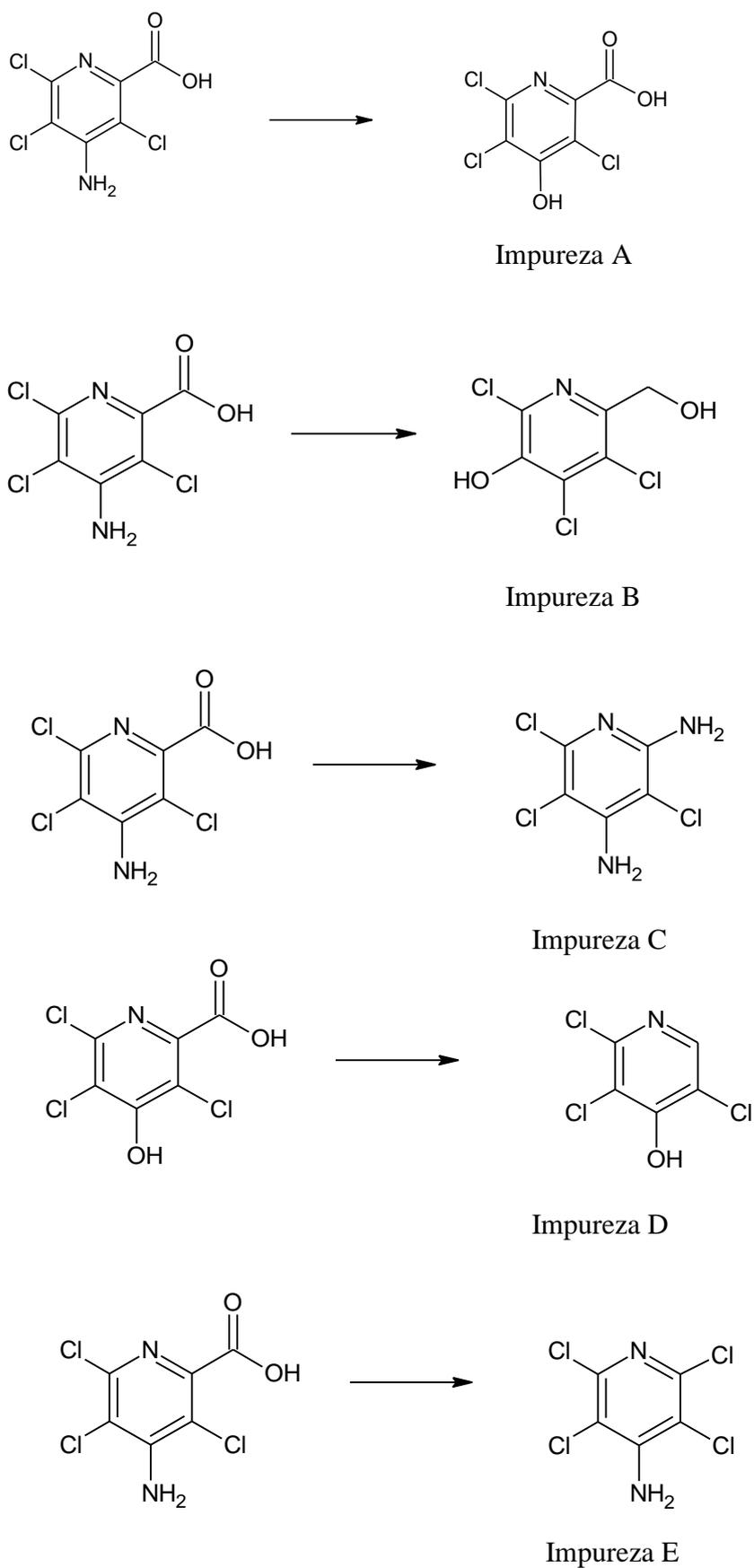


Figura 59. Produtos de degradação do Picloram.

A concentração dos produtos de degradação A a E formadas foram de 0,246%; 0,285 %; 0,194 %; 0,234 % e 0,219 % respectivamente. Todos os valores estão acima do limite permitido, que é 0,15% (Tabela 2). Os cálculos foram realizados de acordo com a Equação 1.

$$\text{Degradação (m/m)} = \frac{(\% \text{ impureza formada x massa do ativo})}{\% \text{ do ativo na amostra}} \quad (1)$$

5. Conclusões

O presente trabalho atingiu seu objetivo principal de qualificar um colaborador da empresa no aprendizado das técnicas de RMN e aperfeiçoar seu desempenho nas demais técnicas analíticas de qualificação, quantificação e caracterização de moléculas.

Os primeiros experimentos foram úteis para prever a disposição das moléculas frente as condições de degradação.

Fica evidente a carência de estudos nesta área de atuação, e a importância dos mesmos frente ao potencial poluidor e recalcitrante dos agroquímicos e das impurezas por eles formadas (ou produtos de degradação) ou provenientes da própria rota de síntese.

Os estudos disponíveis hoje na literatura sobre degradação do azoxistrobim tomam como base a ação de micro-organismos; sobre o amicarbazona, há estudos de fotólise direta, onde é empregado H_2O_2/UV em reator fotoquímico; para picloram, há estudos de degradação utilizando-se o reagente de Fenton ($H_2O_2/$ catalisador de ferro) e degradação eletroquímica.

Os estudos de degradação utilizados neste trabalho favoreceram a intensificação de formação das impurezas provenientes da rota de síntese (no caso, produtos de degradação), mostrando que o mesmo ocorre no meio ambiente após a aplicação dos produtos. Demais impurezas desconhecidas podem estar presentes, o que necessita de um trabalho mais detalhado e aprofundado para identificá-las.

Para o agroquímico de amicarbazona, as duas impurezas forneceram espectros desafiadores para interpretação e montagem das estruturas. A quantidade em massas de ambas foi a melhor dentre os agroquímicos escolhidos, facilitando a condução das demais técnicas analíticas.

Para o agroquímico de azoxistrobim, na Impureza A houve dificuldade em localizar um bom solvente para uso nas técnicas analíticas 2D de RMN, o que resultou no uso total da massa obtida e não foi possível obter os espectros em 2D. Entretanto, a estrutura proposta condiz com os dados 1D de RMN e combina com a fragmentação observada no espectro de massas. Na Impureza B será necessário, num trabalho futuro, trabalhar com maior massa inicial para ser possível a remoção da impureza do balão de fundo chato no final do processo de rotoevaporação, ou estudar-se um meio de evitar a formação desta pasta de difícil remoção. Com isso será possível a obtenção dos espectros de RMN e a identificação molecular de tal impureza.

Para o agroquímico de picloram, as diversas impurezas formadas levantaram a discussão acerca do excesso de moléculas de cloro, piridina e demais componentes não identificados presentes nos agroquímicos classificados como produtos técnicos – que significa o agroquímico possuir elevada pureza – cuja finalidade é preservar as características principais de ação das moléculas, sem ter a necessidade de proceder a uma etapa de clean up do produto final.

Embora as impurezas sejam de conhecimento da rota de síntese, este fato não é divulgado amplamente entre os laboratórios de pesquisa e a população. A obtenção deste dados foram de difícil acesso, por serem sigilosos e de domínio apenas dos fabricantes.

Posteriormente, um trabalho futuro deve abordar os efeitos destas impurezas no meio ambiente e a interação com animais, plantas e organismos humanos, a fim de tornar público os riscos iminentes frente ao uso descontrolado destes produtos. Também, propor medidas de mitigação de danos ou mesmo uma nova rota de síntese mais saudável, pode chamar a atenção das indústrias, gerando uma parceria para contribuição nos estudos acadêmicos e melhorias significativas do meio ambiente.

Assim, este trabalho mostra que os agroquímicos são compostos que necessitam melhor uso e manejo, além de mais estudos e informações quanto a sua toxicidade, recalcitrância e sub produtos gerados após sua exposição aos fatores ambientais e condições de estresse.

Portanto, este trabalho atingiu seus objetivos, pois a partir das degradações foi possível observar as impurezas geradas e os usos das técnicas analíticas de interpretação aprendidas capacitaram a mestranda na análise de espectros de massas, infravermelho (vista em sala de aula) e RMN, conhecimento defasado atualmente na empresa.

6. Referências Bibliográficas

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consulta Pública nº 38, de 6 de agosto de 2008. D.O.U de 07/08/08. Disponível em < [http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP\[23505-1-0\].PDF](http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP[23505-1-0].PDF)> Acesso em 03/02/2017.

ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consulta Pública nº 61, de 26 de junho de 2007. D.O.U de 27/06/2007. Disponível em < [http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP\[18969-1-0\].PDF](http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP[18969-1-0].PDF)> Acesso em 03/02/2017.

ALCÂNTARA, et al. Testes de degradação forçada para fármacos e medicamentos. Revista de Pesquisa e Inovação Farmacológica. 2013. 38-48 p.

ARAÚJO, M.J. Fundamentos de agronegócios. 2. ed São Paulo: Atlas. 2005. 160 p.

AUBRY, A.F., TATTERSALL, P., RUAN, J. Development of Stability Indicating Method: Handbook of stability testing in pharmaceutical development - regulations, methodologies and best practices. ed. kim huynh- ba. 2009. 139-162 p.

BRASIL. Lei 6.360, de 23 de setembro de 1976. Dispõe sobre a vigilância sanitária a que ficam sujeitos os medicamentos, as drogas, os insumos farmacêuticos e correlatos, cosméticos, saneantes e outros produtos, e dá outras providências. Brasília: Diário Oficial da União, 1976.

BRASIL. Decreto nº 79.094, 5 de janeiro de 1977. Regulamenta a Lei nº 6.360 de 23 de setembro de 1976, que submete a sistema de vigilância sanitária os medicamentos, insumos farmacêuticos, drogas, correlatos, cosméticos, produtos de higiene, saneantes e outros. Brasília: Diário oficial da União, 1977.

BRASIL. Lei 9.782, de 26 de janeiro de 1999. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. Brasília Diário Oficial da União, 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC nº 560, de 02 de abril de 2002. Determina a publicação do Guia para Realização de Estudos de Estabilidade. Brasília: Diário Oficial da União, 2002.

BRASIL. Decreto Nº 4.074, DE 4 DE JANEIRO DE 2002. Regulamenta a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Brasília: Diário Oficial da União, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC nº 210, de 04 de agosto de 2003. Determina a todos os estabelecimentos fabricantes de medicamentos, o cumprimento das diretrizes estabelecidas no Regulamento Técnico das Boas Práticas para a fabricação de Medicamentos. Brasília: Diário Oficial da União, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RE nº398, de 12 de novembro de 2004. Determina a publicação do GUIA para Realização de Estudos de Estabilidade. Brasília: Diário Oficial da União, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RE nº01, de 29 de julho de 2005. Autoriza, ad referendum, a publicação do Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade. Brasília: Diário Oficial da União, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC nº166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Brasília: Diário Oficial da União, 2017.

BRAUM, S.; KALINOWSKI, H. -O.; BERGER, S.; 100 and More Basic NMR Experiments; VCH; Weinheim, 1996.

CROASMUN, W. R.; CARLSON, R. M. K.; Eds; Two Dimensional NMR Spectroscopy; VCH, New York, 1994.

DE NEGRI, J. A.; SALERNO, M.S. Inovações, padrões tecnológicos e desempenho das firmas industriais brasileiras. Brasília: IPEA, 2005.

DEROME, A. E.; Modern NMR Techniques for Chemistry Research; Pergamon; Oxford, 1987.

DEVINE, M.D.; BANDEEN, J.D.; MCKERSIE, B.D. Temperature effects on glyphosate absorption, translocation and distribution in quackgrass (*Agropyron repens*). Weed Science, Champaign, v.31, 1983. 461-464 p.

E-PESTICIDE MANUAL. Plataforma < <https://www.bcpc.org/product/bcpc-online-pesticide-manual-latest-version> > Acesso em 01/04/2017.

FERREIRA, A. F.; SILVA, A.A.; FERREIRA, L.R. Mecanismo de ação dos herbicidas. V Congresso Brasileiro de Algodão. Universidade Federal de Viçosa, 2005. Disponível em < http://www.cnpa.embrapa.br/produtos/algodao/publicacoes/trabalhos_cba5/336.pdf > Acesso 29/10/2017.

GASQUES, J.G., CONCEIÇÃO, J.C.P.R. Crescimento e produtividade da agricultura brasileira. Instituto de pesquisa econômica aplicada – IPEA. 1997.

GOMES, M. A. F.; SPADOTTO, C. A.; PESSOA, M.C.P.Y. Avaliação da vulnerabilidade natural do solo em áreas agrícolas: subsídio à avaliação do risco de contaminação do lençol freático por agroquímicos. Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente, Curitiba, v. 12, p. 169-179, jan./dez. 2002.

GOROG, S. Identification in drug quality control and drug research. Chemical Works of Gedeon Richter Plc. Hungary. 2015.

HARRIS, R. K.; KOWALEWSKI, J.; MENEZES, S. C.; Pure & Appl. Chem. 1997.

HASIJA M, Li L, RAHMAN N, AUSAR SF. Forced degradation studies: an essential tool for the formulation development of vaccines. Vaccine (Auckl). c- 3. 2013. 11–33 p.

- HENAO, S. H. & COREY, G. O. Serie Vigilancia 2: plaguicidas organofosforados y carbamatos. México: Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud/OMS/ Opas, 1986.
- HOTHA, K.K.; REDDY, S.; RAJU, V.K.; RAVINDRANATH, L.K. Forced Degradation Studies: Pratical Approach – Overview Regulatory Guidance and literature for the drug products and drug substances. *Int Res J Pharm.* 28-85 p. 2013.
- IBAMA – INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. Produtos agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil: uma abordagem ambiental. Brasília: Ibama, 2010.
- INKEMIA BRASIL. A Ressonância Magnética Nuclear: Uma técnica analítica em expansão. 2016. Disponível em <https://inkemiabrasil.com/2016/07/19/a-ressonancia-magnetica-nuclear-uma-tecnica-analitica-em-expansao/> Acesso em 22/07/2017.
- ISLER, A.C.; 1981. Análise por RMN de produtos de degradação forçada em fármacos. Repositório da Produção Científica e Intelectual da Unicamp. 1981. Disponível em <<http://repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/250654>> Acesso em 22/07/2017.
- KAVLOCK, R. J. et al. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environmental Health Perspectives*, 104 (Suppl 1): 715-740, 1996.
- LACORTE, S. & BARCELÓ, D. Determination of organophosphorus pesticides and their transformation products in river waters by automated on-line solidphase extraction followed by thermospray liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, 712. 1195. 103-112 p. 2000.
- LACHMAN, L. LIEBERMEN, H. A. e KANIG, J. L. Teoria e prática na indústria farmacêutica. 1 ed. Lisboa: Fundação Galouste Guldenkian. 1017 p. 2001.
- LAPORTE, J.R.; TOGNONI, G.; ROSENFELD, S. Epidemiologia do medicamento: princípios gerais. São Paulo: HUCITEC-ABRASCO. 293 p. 1989.
- MAGGIO, R.M.; CALVO, N.L.; VIGNADUZZO, S.E.; KAUFMAN, T.S. Pharmaceutical impurities and degradation products: Uses and applications of NMR techniques. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* Argentina, 2014.
- MANAHAN, E. E. *Environmental Chemistry.* 6.ed. Boca Raton, Florida: Lewis, 1994.
- MARCHI, G.; MARCHI, E. C. S.; GUIMARÃES, T. G. Herbicidas: mecanismo de ação e uso. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2008.
- MERCOSUL. Resolução G<C 53, 1996. Aprova o regulamento técnico denominado “Estabilidade de Produtos Farmacêuticos”, para aplicação da resolução GMC 23/95. Disponível em <<http://www.anvisa.com.br/scriptsweb/anvisalegis/resultado.asp>> Acesso em 01/04/2017.
- MERKLE, G., Bovey, M & W., Davis ,R & S. Factors Affecting the Persistence of Picloram in Soil. *Agronomy Journal - AGRON J.* 59. 1967.

MOREIRA, J. C. et al. Avaliação integrada do impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana em uma comunidade agrícola de Nova Friburgo/RJ. *Ciência e Saúde Coletiva*, 7(2): 299-311, 2002.

MOREIRA, J. C. et AL. Desafios ao controle da qualidade de medicamentos no Brasil. *Cad. Saúde Colet.*, Rio de Janeiro, 25 (3): 362-370. 2017.

NASCIMENTO, A . Ao persistirem os sintomas, o médico deverá ser consultado. Isto é regulação? São Paulo: Editora Sobravime. 2005. 151 p.

NUDELMAN, N. S. Estabilidade de Medicamentos. 1 ed, Buenos Aires: El Ateneo. p. 179. 1975.

OSCHKINAT, H.; MÜLLER, T.; DIECKMANN, T.; *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 1994.

PELAEZ, V. Mercado de agrotóxico e regulação. In: Seminário mercado de agrotóxico e regulação, 2. Brasília: Observatório da Indústria de Agrotóxicos da Anvisa, 2012.

RANZI, C. Curative sprays of fungicides and their effect on lesion expansion of the wheat tan spot. II Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, UPF, Passo Fundo, RS. 2013.

REGIÃO SUDESTE DO BRASIL. Disponível em < http://www.portalbrasil.net/regiao_sudeste.htm > Acesso em 09/06/2016.

RIZZARDI, M. A.; VARGAS, L.; ROMAN, E. S.; KISSMAN, K. Aspectos gerais do controle de plantas. In: VARGAS, L.; ROMAN, E. S. Manual de manejo e controle de plantas daninhas. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho. 2004. 105-144 p.

RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA, F. S. Guia de herbicidas. 5 ed. Londrina. 2005. 591 p.

SILVA, A. V., CARVALHO, M. R., NETTO, A.P.C. Efeitos da aplicação de azoxistrobina no índice de clorofila em diferentes genótipos de milho cultivados em segunda safra. XXXI Congresso Nacional de milho e sorgo. 2016.

SILVA, G.H.T. O que devemos saber sobre medicamentos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). 2010.

SILVA, K. E.R., ALVES, L. D. S., SOARES, M. F. R., et al. Modelos de avaliação da estabilidade de fármacos e medicamentos para a indústria farmacêutica. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*. 2009.

SILVERSTEIN, R. M.; Bassler, G. C.; Morrill, T. C.; *Spectrometric Identification of Organic Compounds*; Wiley & Sons; New York, 1995.

SINGH, S.; JUNWAL, M.; MODHE, G.; TIWARI, H.; KURMI, M.; PARASHAR, N.; SIDDURI, P. Forced degradation studies to assess the stability of drugs and products. National Institute of Pharmaceutical Education and Research (NIPER). India. 2013.

SIMULATE AND PREDICT NMR. Disponível em < <https://www.nmrdb.org/> > Acesso em 08/02/2017.

TIPOS DE SOLO NO BRASIL. Disponível em <<http://geoconceicao.blogspot.com.br/2012/06/tipos-de-solos-do-brasil.html> > Acesso em 09/06/ 2016.

WHO. Aspects of Quality Assurance. WHO Drug Information. V 12, n 2. 2004.

WHO. Good Distribution Practices (GDP) for Pharmaceuticals Products. Disponível em<http://www.who.int/medicines/services/expertcommittees/pharmprep/QAS_068REv2_GDPdraft.pdf > Acesso em 01/04/2017.