

## Avaliação da pureza enantiomérica dos agroquímicos Fipronil e Malation por meio da espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

LUCAS EMANUEL BELUZZO IAROCZ<sup>1</sup>; MÁRCIO SANTOS DA SILVA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas (UFPel) – lucasiarocz@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas (UFPel) – silva.ms@ufpel.edu.br

### 1. INTRODUÇÃO

A comercialização de agroquímicos constitui um setor econômico de fundamental importância para o mercado global, uma vez que a Revolução Verde acelerou o desenvolvimento e a implementação de formulações com o intuito de maximizar a produção para suprir a demanda alimentar (PINGALI, 2012). Porém, em virtude da toxicidade comumente associada aos agroquímicos, os mesmos configuram uma classe de poluentes que tem recebido atenção internacional (TANG *et al*, 2021). Sob essa perspectiva, os agroquímicos quirais são contaminantes ambientais preocupantes, já que constituem aproximadamente 30% das formulações comercializadas, que não contêm o princípio ativo enantiomericamente puro e não possuem as proporções enantioméricas determinadas (BASHEER, 2017).

O debate associado à temática se deve ao fato de os enantiômeros demonstrarem comportamentos ambientais distintos relacionados à bioatividade e à ecotoxicidade para organismos não-alvo, já que os enantiômeros indesejados podem demonstrar, por exemplo, potencial citotóxico, toxicidade reprodutiva e neurotoxicidade, bem como podem interferir na biossíntese de aminoácidos e atuar como inibidores de atividades enzimáticas ligadas ao crescimento vegetal (YANG *et al*, 2017; YE *et al*, 2015). Logo, o desenvolvimento da síntese assimétrica verde e de métodos voltados à determinação do excesso enantiomérico em formulações comerciais são as principais estratégias para contornar os problemas mencionados (DUTARTRE *et al*, 2016; JESCHKE, 2018; ZHOU *et al*, 2016).

Desse modo, a pesquisa apresentada consiste em um estudo de caso dos agroquímicos Fipronil e Malation (Figura 1), que possuem estereocentros, respectivamente, nos átomos de enxofre e de carbono, onde são explorados os núcleos de <sup>1</sup>H, <sup>19</sup>F e <sup>31</sup>P por meio da técnica analítica de espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) para desenvolver um método eficaz, prático e verde que permita executar a discriminação quiral com o intuito de determinar as proporções enantioméricas dos princípios ativos assimétricos das formulações comerciais de agroquímicos.

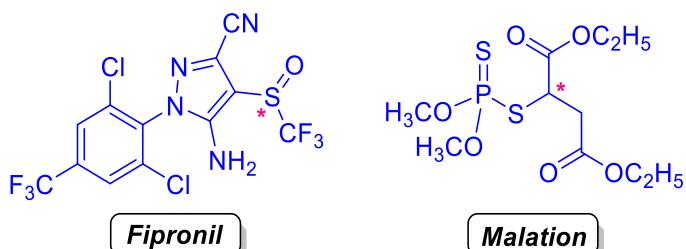


Figura 1



## 2. METODOLOGIA

### Preparação da amostra de Fipronil

Uma solução aquosa de Fipronil na concentração de 0,07 mol/L foi preparada ao se utilizar água deuterada ( $D_2O$ ) e o princípio ativo obtido a partir da purificação de 2,0 g da formulação comercial, que procedeu pela adição da mesma e de 3,0 mL de tolueno em um frasco reacional e da sua manutenção sob refluxo por 8,0 h. A mistura foi resfriada à temperatura ambiente e foi observada a precipitação do Fipronil. Posteriormente, a fase orgânica foi separada pela adição de uma solução salina ao frasco reacional, seguida pela lavagem do precipitado com hexano em um funil de Büchner e da remoção do solvente, o que levou à obtenção de 400 mg de um sólido branco.

### Preparação da amostra de Malation

Uma solução de Malation na concentração de 0,07 mol/L foi preparada ao se utilizar clorofórmio deuterado ( $CDCl_3$ ) e o princípio ativo obtido através da purificação de 2,0 g da formulação comercial através de cromatografia em coluna de sílica-gel, ao se utilizar como eluente uma mistura constituída por 20% de acetato de etila e 80% de hexano, o que levou à obtenção de 1,2 g de Malation.

### Preparação da amostra de água

A simulação de uma amostra de água que contém Malation, na concentração de 0,07 mol/L, foi executada pela adição de 30 mg da formulação comercial, que possui 50% de pureza, a 1,0 mL de água ( $H_2O$ ). Na etapa seguinte, foi adicionado 1,0 mL de clorofórmio deuterado ( $CDCl_3$ ) à solução aquosa, que foi agitada em um misturador de vórtice por dois minutos, bem como as fases aquosa e orgânica foram separadas para as análises posteriores.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, os agroquímicos selecionados para o estudo foram avaliados em meio aquoso ( $D_2O$ ), onde o princípio ativo do Fipronil foi colocado na presença de 1,0 equivalente de  $\alpha$ -,  $\beta$ - ou  $\gamma$ -ciclodextrinas (CDs) e analisado em experimentos de RMN de  $^1H$  e de  $^{19}F$ , como também em experimentos de RMN 2D ROESY. No espectro de RMN de  $^1H$ , no experimento com  $\beta$ -ciclodextrina, foi observado um valor de divisão de 0.075 ppm para o sinal no deslocamento químico de 8.28 ppm, ao mesmo tempo que as  $\alpha$ - e  $\gamma$ -ciclodextrinas não conduziram a resultados satisfatórios.

Outrossim, os ensaios analíticos de RMN de  $^{19}F$  não possibilitaram a discriminação quiral com nenhuma das ciclodextrinas estudadas, bem como os experimentos de RMN 2D ROESY confirmaram a modificação do ambiente químico dos hidrogênios aromáticos do Fipronil, que é ocasionada pela formação de um complexo de inclusão parcial do tipo receptor-substrato através do encapsulamento do anel benzênico. Além do mais, cabe destacar que os experimentos com o Malation, em meio aquoso, foram ineficazes em virtude da baixa solubilidade e da ausência de um ou mais anéis aromáticos na estrutura molecular para possibilitar o encapsulamento parcial.



Por conseguinte, os agroquímicos foram solubilizados em clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) e estudados na presença de 1,0 equivalente de uma série de agentes enantiodiscriminantes de solvatação, que foram escolhidos ao se considerar a variedade de funções orgânicas que os constituem. Os compostos químicos selecionados foram o (-)-ácido mandélico, o (+)-BINOL, a (-)-cinchonidina, a (+)-1-(2-naftil)etilamina, a (+)-metilbenzilamina, a (S)-N-((fenil)etil)-3,5-dinitrobenzamida ou amida de Kagan, o (-)-naproxeno e o (+)-sec-amina-butanol.

Nos experimentos de RMN de  $^{19}\text{F}$  com o Fipronil, a amida de Kagan levou à obtenção de um valor de divisão de 0,01 ppm para o sinal no deslocamento químico de -74.69 ppm, e foi observado um valor de divisão de 0,004 ppm para o sinal no deslocamento químico de -74.66 ppm na avaliação com o (-)-naproxeno. Outrossim, nos experimentos de RMN de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  com o Malation, apenas a amida de Kagan demonstrou eficiência e levou à obtenção de um valor de divisão de 0,01 ppm para o sinal no deslocamento químico de 96.33 ppm.

Sob essa perspectiva, foram realizados ensaios com variações na concentração dos princípios ativos, já que as aplicações dos agroquímicos costumam conduzir às baixas concentrações dos mesmos nas amostras oriundas de compartimentos ambientais, em virtude dos valores determinados pelo Limite Máximo de Resíduos (LMR). As avaliações com o Fipronil (Tabela 1) e com o Malation (Tabela 2) foram executadas nas condições otimizadas, onde a  $\beta$ -ciclodextrina se destacou como um agente enantiodiscriminante eficiente para amostras aquosas de agroquímicos em concentrações distintas. Porém, os efeitos limitantes da variação de concentração da amostra na presença da amida de Kagan foram significativos, já que não foi possível realizar a discriminação quiral em amostras com concentrações inferiores ao valor de 0,070 mol/L.

**Tabela 1.** Concentração de Fipronil determinada por qRMN<sup>a</sup>

Concentração da amostra (mol/L)	Análise de qRMN de $^1\text{H}$ (mol/L)	Valor de divisão do sinal no RMN de $^1\text{H}$ (ppm)
0,070	0,072	0,0072
0,020	0,022	0,0071
0,010	0,009	0,0068

<sup>a</sup>Avaliação padronizada através do ácido maleico de sinal referencial em 5,90 ppm (0,01 mol/L).

**Tabela 2.** Concentração de Malation determinada por qRMN<sup>a</sup>

Concentração da amostra (mol/L)	Análise de qRMN de $^1\text{H}$ (mol/L)	Valor de divisão do sinal no RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ (ppm)
0,070	0,071	0,010
0,030	0,033	0,001
0,012	0,013	0,001
0,002	0,002	-

<sup>a</sup>Avaliação padronizada através da trifenilfosfina de sinal referencial em -6,00 ppm (0,014 mol/L).

Além do mais, foram feitos ensaios analíticos com amostras preparadas pelo uso direto das formulações comerciais do Fipronil e do Malation, com o intuito de avaliar a influência dos seus constituintes na eficiência da discriminação quiral. Os resultados para os dois agroquímicos foram promissores, uma vez que não se observou interferência nos deslocamentos químicos dos espectros obtidos. Por



último, foi preparada uma amostra de água ( $H_2O$ ) com a formulação comercial do Malation, que objetivava mimetizar uma amostra de origem ambiental, para avaliar o método de discriminação quiral. Logo, é de suma relevância mencionar que não foram detectadas interferências na análise que comprometessem a avaliação da pureza enantiomérica da amostra aquosa de Malation.

#### 4. CONCLUSÕES

O método de avaliação da pureza enantiomérica pela técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de agroquímicos constituídos por princípios ativos assimétricos se caracteriza por ser eficaz, prático e verde. Os resultados contrastantes nos ensaios se devem à distinção estrutural dos agroquímicos selecionados para o estudo. Logo, nas avaliações em solução aquosa ( $D_2O$ ), a  $\beta$ -ciclodextrina desponta como um agente enantiodiscriminante eficaz frente a agroquímicos com estruturas moleculares específicas.

Além do mais, na presença de  $CDCl_3$ , a amida de Kagan demonstrou a melhor versatilidade, apesar das limitações relacionadas às concentrações das amostras. Todavia, o método desponta como uma alternativa viável para análises cotidianas devido às razões supracitadas, bem como pode ser utilizado como ferramenta de análise em estudos que envolvam síntese assimétrica verde ou para a obtenção de amostras enantiomericamente puras. Ademais, é válido ressaltar que essa pesquisa foi aceita para publicação pela revista científica “Chirality” no mês de junho de 2021 e se encontra disponível no ambiente virtual.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BASHEER, A. A. Chemical chiral pollution: Impact on the society and Science and need of the regulations in the 21<sup>st</sup> century. **Chirality**, Nova Jersey (Estados Unidos), v.30, n.4, p.402-406, 2017.
- DUTARTRE M.; BAYARDON J.; JUGÉ S. Applications and stereoselective syntheses of P-chirogenic phosphorus compounds. **Chemical Society Reviews**, Londres (Reino Unido), v.45, p.5771-5794, 2016.
- JESCHKE, P. Current status of chirality in agrochemicals. **Pest Management Science**, Nova Jersey (Estados Unidos), v.74, n.11, p.2389-2404, 2018.
- PINGALI, P. L. Green Revolution: impacts, limits, and the path ahead. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Cambridge (Estados Unidos), v.109, n.31, p.12302-12308, 2012.
- TANG, F. H. M.; LENZEN, M.; MCBRATNEY, A.; MAGGI, F. Risk of pesticide pollution at the global scale. **Nature**, Londres (Reino Unido), v.14, p.206-210, 2021.
- YANG, Y.; ZHANG, J.; YIJUN, Y. Enantioselective Effects of Chiral Pesticides on their Primary Targets and Secondary Targets. **Current Protein & Peptide Science**, Sharjah (Emirados Árabes Unidos), v.18, n.1, p.22-32, 2017.
- YE, J.; ZHAO, M.; NIU, L.; LIU, W. Enantioselective Environmental Toxicology of Chiral Pesticides. **Chemical Research in Toxicology**, Washington (Estados Unidos), v.28, n.3, p.325-338, 2015.
- ZHOU, Y.; WU, S.; LI, Z. Cascade biocatalysis for sustainable asymmetric synthesis: from biobased L-phenylalanine to high-value chiral chemicals. **Angewandte Chemie International Edition**, Weinheim (Alemanha), v.55, n.38, p.11647-11650, 2016.