Anexo 3.

Información específica sobre los productos de degradación y los metabolitos del flutianil en las plantas tratadas, comportamiento y magnitud de los residuos de la sustancia activa y sus metabolitos desde el momento de la aplicación hasta la cosecha, los límites máximos de residuos (LMR) y el análisis respectivo sobre la disipación y acumulación en suelos agrícolas, persistencia en el suelo, adsorción y desorción en partículas de suelo, hidrólisis, fotolisis y biodegradación.

Referencia: EFSA. DAR inicial Flutianil. Anexo B (Volumen 3). B.7 Residuos. 2013.

Metabolismo en plantas

Se ha investigado el metabolismo y la distribución de los residuos de flutianil en los siguientes cultivos primarios: uvas, manzanas, pepinos y lechuga. Dada la naturaleza de las bunas prácticas agrícolas para los usos representativos propuestos (vides y cultivos ornamentales protegidos), no es necesario considerar el metabolismo, la distribución y la expresión de los residuos de flutianil en cultivos rotacionales y posteriores, ya que las uvas son un cultivo no rotacional y el suelo gastado y el abono utilizado para cultivar cultivos ornamentales que pueden haber sido tratados con flutianil no serán una vía significativa de exposición en las cadenas alimentarias del ganado y los seres humanos. De manera similar, los usos propuestos no conducen a productos básicos que puedan formar una parte significativa de la dieta del ganado. Junto con los estudios del metabolismo del flutianil en la rata que indican una alta tasa de excreción y baja propensión a la bioacumulación, no es necesario considerar el metabolismo, la distribución y la expresión de los residuos de flutianil en el ganado. En los estudios del metabolismo de las plantas primarias, se observó un patrón similar de metabolismo, distribución y expresión de los residuos en los cultivos investigados. El flutianil original fue el componente principal del residuo en el punto de muestreo final (88,5-96,2% del residuo radiactivo total en uvas y follaje; 50,2-75,1% del residuo radiactivo total en manzanas y follaje; 33,8-92,9% del residuo radiactivo total residuo radiactivo total en pepinos y follaje y 83,7-89,4% del residuo radiactivo total en follaje de lechuga). Los metabolitos identificados individualmente fueron componentes menores del residuo, que normalmente corresponden a menos del 5% del residuo radiactivo total. Sobre esta base, es apropiado establecer una definición de residuo en frutas y cultivos de hojas del flutianil original solo para fines de evaluación y monitoreo de riesgos.

Definición de residuo en plantas: Flutianil solo para fines de evaluación y monitoreo de riesgos (solo frutos y cultivos de hojas).
Definición de residuo en cultivos rotativos: No se requiere para los usos notificados.
Definición de residuo en ganado: No se requiere para los usos notificados

Metabolismo en uva

Métodos: Directiva 91/414/CE (modificada por la Directiva 96/68/CE) documento 7028/VI/95 rev 3, julio de 1997. Guía de prueba de química de residuos de la EPA OPPTS 860.1300, Naturaleza del residuo en las plantas (agosto de 1996). Directrices japonesas

MAFF 12-Nousan-8147, sección 2-4-1 (noviembre de 2000), bajo buenas prácticas de laboratorio

En 2005 se realizó un estudio del metabolismo en vid (*Vitis vinifera*, variedad 'Thomson Seedless') al aire libre en California, Estados Unidos. Las vides de uva establecidas comercialmente, que crecían en un suelo franco arcilloso, se trataron con [anillo de 2-metoxifenil-U-^{14}C]-flutianil (>99,2% de pureza radioquímica) o [anillo de trifluorometilfluorobenceno-U-^{14}C]-flutianil (>99,4% de pureza radioquímica). Estos se prepararon como formulaciones separadas al 2,5% que contenían una mezcla de flutianil marcado y no marcado; las actividades específicas de estas soluciones de pulverización fueron de ~1,25 MBq/mg. Las vides fueron tratadas entre BBCH 79 y BBCH 85 (escala de estados fenológicos de cultivos de la Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt und CHemische Industrie) con cuatro aplicaciones de 40 g i.a./ha con un intervalo de aspersión de 14 días. Esto corresponde a una dosis de 1,6 N por aplicación y una dosis total de 2,1 N con respecto a las buenas prácticas agrícolas propuestas en uvas del sur de la UE de 3 aplicaciones de 25 g i.a./ha.

Se tomaron muestras de uvas y hojas a los 1 días (inmaduros), 21 (maduros tempranos) y 45 (maduros tardíos) después de la última aplicación, esto se compara con el intervalo precosecha de 14 días establecido por la directriz Global Agricultural Productivity GAP representativo propuesto en uvas del sur de la UE. Las muestras de uvas y hojas se lavaron con acetonitrilo para obtener una fracción de lavado superficial y luego se homogeneizaron con hielo seco y se sometieron a los siguientes procedimientos de extracción (en orden, mediante maceración): 3 × metanol, 3 × metanol: agua (1:1 v/v), agua, ácido clorhídrico 0,1 M, hidróxido de sodio 0,1 M y finalmente acetona (las extracciones ácidas y bases solo se realizaron para las muestras de 21 días). Los lavados superficiales se concentraron para su análisis. Para las muestras de uva, el extracto de metanol inicial se diluyó en agua y se dividió con acetato de etilo. La fracción de acetato de etilo se concentró para su análisis. La fracción acuosa se limpió utilizando varios cartuchos ENV+ SPE; Se analizó el eluyente de los cartuchos. En el caso de las hojas de vid, el extracto metanólico se analizó directamente sin fraccionamiento de acetato de etilo/agua.

El lavado superficial, los extractos y los sólidos posteriores a la extracción se analizaron para determinar la presencia de residuos radiactivos totales mediante el conteo de centelleo líquido (LSC). Análisis cromatográfico compuesto por HPLC en fase reversa utilizando un Genesis C18 de 150 mm × 4,6 mm de diámetro interior × columna de 4 µm eluida con un gradiente de agua: acetonitrilo (90:10% v/v) a agua: acetonitrilo (0:100% v/v) durante 35 min o un gradiente de 0,01% aq. ácido trifluoroacético: acetonitrilo (90:10% v/v) a 0,01% aq. ácido trifluoroacético: acetonitrilo (0:100% v/v) durante 30 min. La detección se realizó por absorción UV a 254 m y por radiodetección por LSC de las fracciones colectadas. Las identidades de los componentes del residuo se determinaron por cocromatografía con patrones de referencia por HPLC o TLC. El sistema TLC está compuesto por una placa de gel de sílice Whatman K6F desarrollada con tolueno: acetato de etilo (1:1 v/v) o butanol: agua: ácido acético (4:1:1 v/v/v).

Resultados

No se detectaron residuos radiactivos en las muestras de uvas de control en ningún momento; Los residuos en las muestras de follaje control fueron de ≤0,003 mg/kg. Los residuos radiactivos totales en los pomelos tratados disminuyeron de aproximadamente 0,35 mg/kg (0,30 y 0,36 mg/kg para las etiquetas de 2-metoxifenilo y trifluorometilo, respectivamente) un día después de la aplicación a aproximadamente 0,20 mg/kg (0,17 y 0,23 mg/kg para las etiquetas de 2-metoxifenilo y trifluorometilo, respectivamente) a los 45 días después de la aplicación. Los niveles totales de residuos radiactivos en el follaje no siguieron ninguna tendencia clara con respecto al intervalo de cosecha o la posición de la radiomarca, con niveles de residuos radiactivos que oscilaron entre 2,7 y 5,4 mg/kg para las dos etiquetas en los tres puntos de tiempo.

La mayor parte del total de los residuos radiactivos se recuperó de los lavados superficiales. En las uvas, entre el 93 y el 94% del residuo radiactivo total se encontraba en los lavados superficiales 1 día después de la última aplicación, disminuyendo al 87% del residuo radiactivo total a los 45 días después de la última aplicación. En el follaje de la vid, el 92% del residuo radiactivo total se recuperó en los lavados superficiales 1 día después de la última aplicación y entre el 85 y el 88% a los 45 días después de la última aplicación. En las uvas, la mayor parte de la radiactividad restante se extrajo en el extracto inicial de metanol y solo entre el 0,3 y el 2,3% del residuo radiactivo total permaneció en los sólidos posteriores a la extracción de la uva. Del mismo modo, solo entre el 1,3 y el 4,2% del residuo radiactivo total permaneció sin extraer del follaje de la vid.

Las identidades de los residuos radiactivos en los lavados superficiales y la partición de acetato de etilo del extracto de metanol se determinaron mediante cocromatografía con patrones de referencia por HPLC y TLC. La identidad del residuo radiactivo en la partición acuosa del extracto metanol se determinó mediante TLC, ya que este extracto polar no cromatografió bien por HPLC; la partición acuosa requirió una limpieza por parte de SPE antes del análisis por parte de TLC. El bajo nivel de radiactividad recuperado en los extractos orgánicos y acuosos restantes de uvas significó que estos extractos no se caracterizaron más.

En los lavados superficiales, solo se identificó flutianil parental. En la partición de acetato de etilo del extracto de metanol padre flutianil, se identificaron los metabolitos OC 53276, OC 56574 y un desconocido (desconocido 3). OC 53276 y OC 56574 coeluidos por HPLC y, por lo tanto, se cuantificaron conjuntamente, pero se resolvieron mediante TLC, a partir de la cual se pudieron determinar sus cantidades relativas. En la partición acuosa del extracto de metanol, el metabolito OC 56635 se identificó por cocromatografía en muestras con la etiqueta [CF3Ph-U-14C], mientras que con la etiqueta [MeOPh-U-14C] se observaron varios metabolitos polares no identificados.

En el follaje de la vid, las identidades de los residuos radiactivos en los lavados superficiales y el extracto metanólico se determinaron mediante cocromatografía con patrones de referencia por HPLC y TLC. El metanol: agua y otros extractos acuosos de follaje no se caracterizaron más debido al bajo nivel de radiactividad en estos extractos.

Se observó un patrón de metabolismo similar en el follaje de la vid que se observó en las uvas, en el sentido de que la mayoría del residuo radiactivo permaneció asociado con los lavados superficiales y esto se identificó por HPLC como compuesto por flutianilo padre. Se observó un componente menor en el radiocromatograma del lavado superficial con la marca [CF3Ph-U-14C]-flutianil; esto se asignó tentativamente al metabolito OC 53279 pero no se cuantificó formalmente.

En los extractos de metanol del follaje de la vid, una combinación de HPLC y TLC permitió identificar y cuantificar los principales componentes identificados flutianil y los metabolitos OC 53276, OC 56574 y OC 56635. El metabolito OC 53279 fue identificado tentativamente por TLC, pero no fue cuantificado. Los metabolitos OC 53276 y OC 56574 coeluyen por HPLC y, por lo tanto, se cuantificaron conjuntamente, pero se resolvieron mediante TLC, a partir de la cual se pudieron determinar sus cantidades relativas. Por TLC, los metabolitos OC 56635 y Unknown 2B se cuantificaron solo a partir de [CF3Ph-U-14C]-flutianil y Unknown 5A solo se formó a partir de [MeOPh-U-14C]-flutianil. Los metabolitos OC 53276 y OC 56574 no pudieron cuantificarse individualmente durante los 45 días posteriores a la última aplicación [MeOPh-U-14C]-muestra de flutianil ya que el nivel de radiactividad fue <LOQ del método TLC; por lo tanto, se cuantifican juntos a partir del pico de HPLC coeluyente.

Conclusión

Cuando se trataron con una pulverización foliar de [MeOPh-U-14C]-flutianil o [CF3Ph-U-14C]-flutianil a 4 × 40 g i.a./ha (tasa de 2,1N), los residuos radiactivos totales en las uvas tratadas disminuyeron de aproximadamente 0,35 mg/kg (0,30 y 0,36 mg/kg para las etiquetas de 2-metoxifenilo y trifluorometilo, respectivamente) un día después de la aplicación a aproximadamente 0,20 mg/kg (0,17 y 0,23 mg/kg para las etiquetas de 2-metoxifenilo y trifluorometilo, respectivamente) a los 45 días después de la aplicación. Los niveles totales de residuos radiactivos en el follaje no siguieron ninguna tendencia clara con respecto al intervalo de cosecha o la posición de la radiomarca, con niveles de residuos radiactivos que oscilaron entre 2,7 y 5,4 mg/kg para las dos etiquetas en los tres puntos de tiempo.

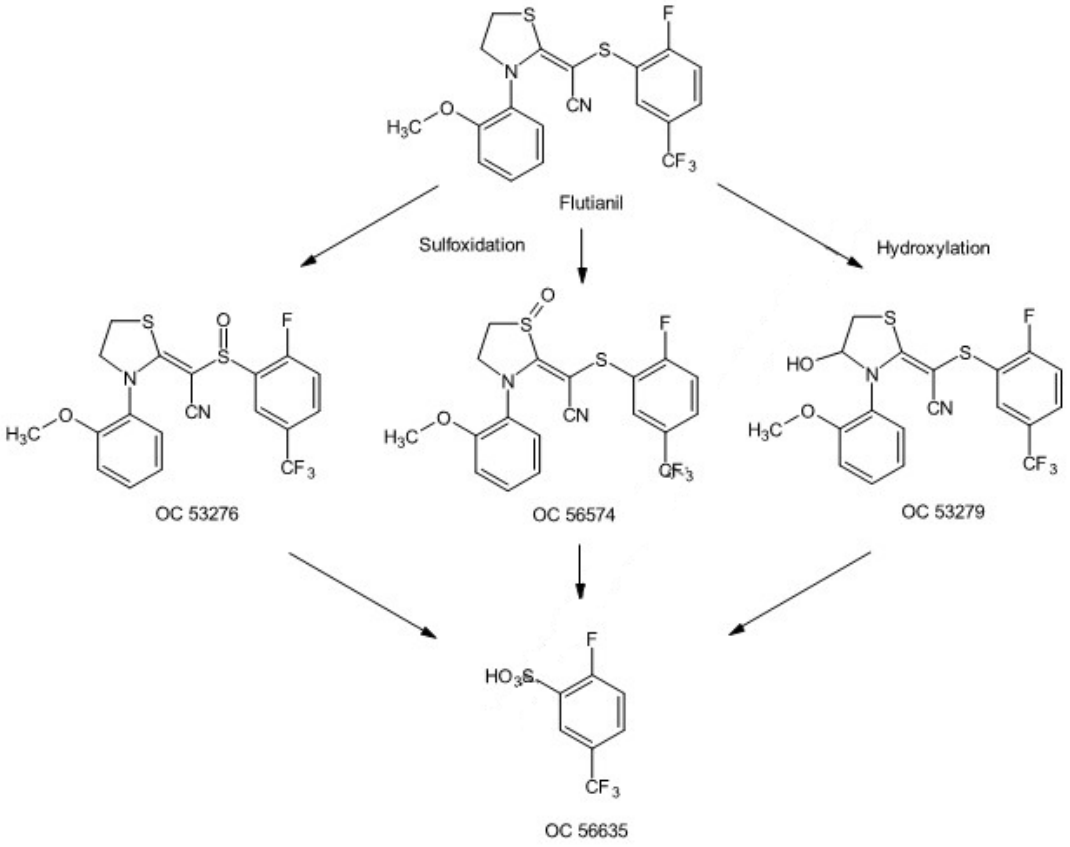
Se dispone de datos suficientes para demostrar que el flutianil no se absorbió bien en los tejidos de la uva y que los residuos permanecieron en gran medida en las superficies de la vid y la baya; El 85 – 88% del residuo radiactivo total permaneció en las uvas y en los lavados superficiales del follaje a los 45 días después de la última aplicación. Los lavados superficiales estaban compuestos por flutianil padre, aunque se detectó, pero no se cuantificó formalmente, una pequeña cantidad del metabolito OC 53279, en algunos lavados superficiales de muestras de follaje. Este resultado sugiere que es poco probable que la transferencia sistémica de residuos dentro de las vides sea una vía significativa de exposición al flutianil.

La mayoría de los residuos radiactivos restantes pudieron extraerse de muestras de follaje de uva y vid utilizando metanol; Poco más se extrajo radiactividad por agua, ácido o base. Solo entre el 0,3 y el 2,6% del residuo radiactivo total permaneció en los sólidos

posteriores a la extracción de la uva y entre el 1,3 y el 4,2% del residuo radiactivo total permaneció sin extraer del follaje de la vid. En los extractos de metanol, la mayor parte de la radiactividad se asoció con el flutianil original, aunque los metabolitos OC-53276, OC-56574 y OC 56635 se identificaron y cuantificaron mediante el uso de una combinación de HPLC y TLC. Se identificó un pequeño número de componentes desconocidos; Estos nunca superaron el 1% del total de residuos radiactivos.

A partir de la identidad de los metabolitos, se propone que el metabolismo del flutianil en las uvas procede por oxidación para formar OC 53276 o OC 56574 y tentativamente por hidroxilación para formar OC 53279. Todos estos compuestos o progenitores podrían dar lugar al producto de escisión OC 56635, que es específico de [CF3Ph-U-14C]-flutianil. No se identificaron productos de escisión específicos de [MeOPh-U-14C]-flutianil.

Se propone la siguiente ruta metabólica para el flutianil en las uvas:



En general, el flutianil original representó entre el 89,0 y el 96,2% del residuo radiactivo total en los pomelos con la etiqueta en cualquiera de los anillos aromáticos y durante los tres períodos de muestreo de 1, 21 y 45 días después de la última aplicación. La degradación metabólica parece ser relativamente menor. Por lo tanto, estos datos respaldarían que una definición de residuo de flutianil solo para fines de evaluación del riesgo y aplicación es apropiada en las uvas.

Metabolismo en Manzanas

Métodos: Directiva 91/414/CE (modificada por la Directiva 96/68/CE) documento 7028/VI/95 rev 3, julio de 1997. Guía de prueba de química de residuos de la EPA OPPTS 860.1300, Naturaleza del residuo en las plantas (agosto de 1996). Japonés Directrices del MAFF 12-Nousan-8147, Sección 2-4-1 (noviembre de 2000), bajo buenas practicas de laboratorio

En 2006 se realizó un estudio del metabolismo en manzanas (*Malus domestica*, variedad 'Granny Smith') al aire libre en California, Estados Unidos. Los manzanos establecidos comercialmente que crecían en un suelo arcilloso se trataron con aspersiones foliares de [2-anillo de metoxifenilo-U-14C]-flutianil (>98% de pureza radioquímica, actividad específica 3.782 MBq/mg) o [anillo de trifluorometilfluorobenceno-U-14C]-flutianil (>98% de pureza radioquímica, 3.735 MBq/mg). Se prepararon como formulaciones separadas de 5% EC. Los manzanos se trataron entre BBCH 79 y BBCH 81 (escala de estados fenológicos de cultivos de la Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt und CHemische Industrie) con tres aplicaciones de 75 g i.a./ha con un intervalo de pulverización de 12 días. Esto corresponde a una dosis de 3N por aplicación y una dosis total de 3N con respecto a la directriz Global Agricultural Productivity GAP representativa propuesta en uvas del sur de la UE de 3 aplicaciones de 25 g i.a./ha.

Se tomaron muestras de manzanas a 1, 14, 21 y 35 días después de la última aplicación y muestras de follaje de manzana a los 14, 30 y 35 días después de la última aplicación; esto se compara con el intervalo precosecha de 14 días propuesto por la directriz Global Agricultural Productivity GAP para las uvas del sur de la UE. Las muestras de manzanas y follajes se lavaron con acetonitrilo para obtener una fracción de lavado superficial y luego se homogeneizaron con hielo seco y se sometieron a los siguientes procedimientos de extracción (en orden, utilizando maceración): 3 × metanol, 3 × metanol: agua (1:1 v/v), agua, ácido clorhídrico 0,1 M, hidróxido de sodio 0,1 M y finalmente acetona.

Los lavados superficiales de manzanas y follaje se concentraron para su análisis. Los extractos metanólicos iniciales de las muestras de manzana se diluyeron con agua y se limpiaron con un cartucho de extracción en fase sólida (Isolute C18). El eluido que pasaba directamente a través de los cartuchos y un eluido de metanol posterior se recogieron por separado para su análisis. El extracto de metanol: agua se concentró para el análisis directo. Las muestras del extracto de metanol: agua que contenía la etiqueta [MeOPh-U-14C]-flutianil se analizaron más a fondo después de la hidrólisis nocturna en ácido clorhídrico 2M a 60 °C; los exoconos liberados se dividieron en diclorometano para su análisis. El resto de los extractos acuosos y de acetona no se caracterizaron más debido a los bajos niveles de radiactividad que contenían. Para las muestras de follaje, los extractos de metanol y metanol: agua se combinaron para el análisis directo. El resto de los extractos acuosos y de acetona no se caracterizaron más debido a los bajos niveles de radiactividad que contenían.

El lavado superficial, los extractos y los sólidos posteriores a la extracción se analizaron para determinar el residuo radiactivo total (residuo radiactivo total) mediante conteo de centelleo líquido (LSC). Análisis cromatográfico compuesto por HPLC en fase reversa

utilizando un Genesis C18 de 150 mm × 4,6 mm de diámetro interior × columna de 4 µm eluida con un gradiente de agua: acetonitrilo (90:10% v/v) a agua: acetonitrilo (0:100% v/v) durante 35 min o un gradiente de 0,01% aq. ácido trifluoroacético: acetonitrilo (90:10% v/v) a 0,01% aq. ácido trifluoroacético: acetonitrilo (0:100% v/v) durante 30 min. La detección se realizó por absorción UV a 254 m y por radiodetección por LSC de las fracciones colectadas. Las identidades de los componentes marcados se determinaron mediante cocromatografía con estándares de referencia por HPLC o TLC. El sistema TLC está compuesto por una placa de gel de sílice Whatman K6F desarrollada con tolueno: acetato de etilo (1:1 v/v) o butanol: agua: ácido acético (4:1:1 v/v/v).

Resultados

Se detectaron residuos radiactivos insignificantes (≤0,002 mg/kg) en muestras de manzanas y follaje de control. Los residuos radiactivos totales en las manzanas tratadas disminuyeron de aproximadamente 0,17 mg/kg (0,151 y 0,188 mg/kg para las etiquetas de 2-metoxifenilo y trifluorometilo, respectivamente) un día después de la aplicación a aproximadamente 0,06 mg/kg (0,093 y 0,027 mg/kg para las etiquetas de 2-metoxifenilo y trifluorometilo, respectivamente) a los 35 días después de la aplicación. Los niveles totales de residuos radiactivos en el follaje de la manzana parecieron disminuir para la etiqueta de 2-metoxifenilo (reduciéndose de 8,499 a 6,726 mg/kg entre 14 y 35 días después de la última aplicación), mientras que parecían relativamente estables en aproximadamente 4,8 mg/kg para la etiqueta de trifluorometilo.

La mayor parte del total de los residuos radiactivos se recuperó de lavados superficiales; El 66,0 – 89,4% y el 70,6 – 86,6% del total de los residuos radiactivos se recuperaron en los lavados superficiales de las manzanas y el follaje, respectivamente. La mayor parte de la radiactividad restante se recuperó en los extractos de metanol y metanol: agua. Solo el 0,6 – 2,8% del residuo radiactivo total permaneció en los sólidos de las manzanas después de la extracción y solo el 1,6 – 3,7% del residuo radiactivo total permaneció sin extraer del follaje de la manzana.

En las manzanas, las identidades de los componentes de los residuos radiactivos en los lavados superficiales y el eluyente de metanol del análisis SPE del extracto de metanol se determinaron mediante cocromatografía con patrones de referencia por HPLC y TLC. Se encontró que los lavados superficiales contenían predominantemente flutianil parental con bajos niveles de los metabolitos OC 53279, OC 53276 y OC 56574. El eluyente de metanol contenía principalmente flutianil original y bajos niveles de los metabolitos OC 53279, OC 53276, OC 56574 y OC 56635 (este último derivado de [$CF_{3Ph\text{-}U\text{-}14C}$]-flutianil solamente). La porción del extracto metanol que pasó directamente a través del cartucho de SPE no pudo ser analizada por cromatografía debido a dificultades analíticas (esta fracción tenía un alto contenido de azúcar) y al bajo nivel de radiactividad en estas fracciones (0,002 – 0,008 mg/kg, <10% del residuo radiactivo total). El extracto de metanol: agua pudo ser analizado por TLC a partir del cual se identificó flutianil padre, OC 56635 (de [CF3Ph-U-14C]-flutianil) y material polar desconocido; Estos no pudieron ser cuantificados. El análisis TLC del metanol [MeOPh-U-14C]-flutianil: los extractos acuosos que se habían sometido a hidrólisis ácida indicaron la presencia de flutianil, los metabolitos OC 42121 o OC 56631 y material polar no identificado. Estos no se

cuantificaron debido al bajo nivel de radiactividad, y no se pudo determinar si estos metabolitos resultaron de la hidrólisis ácida o estaban presentes originalmente.

En el follaje del manzano, las identidades de los residuos radiactivos en los lavados superficiales y los extractos combinados de metanol y metanol: agua se determinaron por cocromatografía con patrones de referencia por HPLC y TLC. Se encontró que los lavados superficiales contenían predominantemente flutianil original junto con cantidades menores de los metabolitos OC 53279, OC 53276, OC 56574 y OC 56634. Se encontró que los extractos combinados de metanol y metanol: agua para [MeOPh-U-14C]-flutianil contenían flutianil junto con pequeñas cantidades de los metabolitos OC 53276, OC 56574 y OC 53279; los metabolitos OC 42121 o OC 56631 (no separados por TLC) y OC 53277 se identificaron tentativamente pero no se cuantificaron. Se encontró que los extractos combinados de metanol y metanol: agua para [CF3Ph-U-14C]-flutianil contenían flutianil junto con pequeñas cantidades de los metabolitos OC 56635, OC 53276, OC 56574, OC 56634 y OC 53279; las trazas de OC 42121 se identificaron tentativamente pero no se cuantificaron.

Conclusión

Cuando se trató con una pulverización foliar de [MeOPh-U-14C]-flutianil o [CF3Ph-U-14C]-flutianil a 3 × 75 g i.a./ha (3N), los residuos radiactivos totales en las manzanas tratadas disminuyeron de aproximadamente 0,17 mg/kg (0,151 y 0,188 mg/kg para las etiquetas de 2-metoxifenilo y trifluorometilo respectivamente) un día después de la aplicación a ca 0,06 mg/kg (0,093 y 0,027 mg/kg para las etiquetas de 2-metoxifenilo y trifluorometilo respectivamente) a los 35 días después de la aplicación. Los niveles totales de residuos radiactivos en el follaje de la manzana parecieron disminuir para la etiqueta de 2-metoxifenilo (reduciéndose de 8,499 a 6,726 mg/kg entre 14 y 35 días después de la última aplicación), mientras que parecían relativamente estables en aproximadamente 4,8 mg/kg para la etiqueta de trifluorometilo.

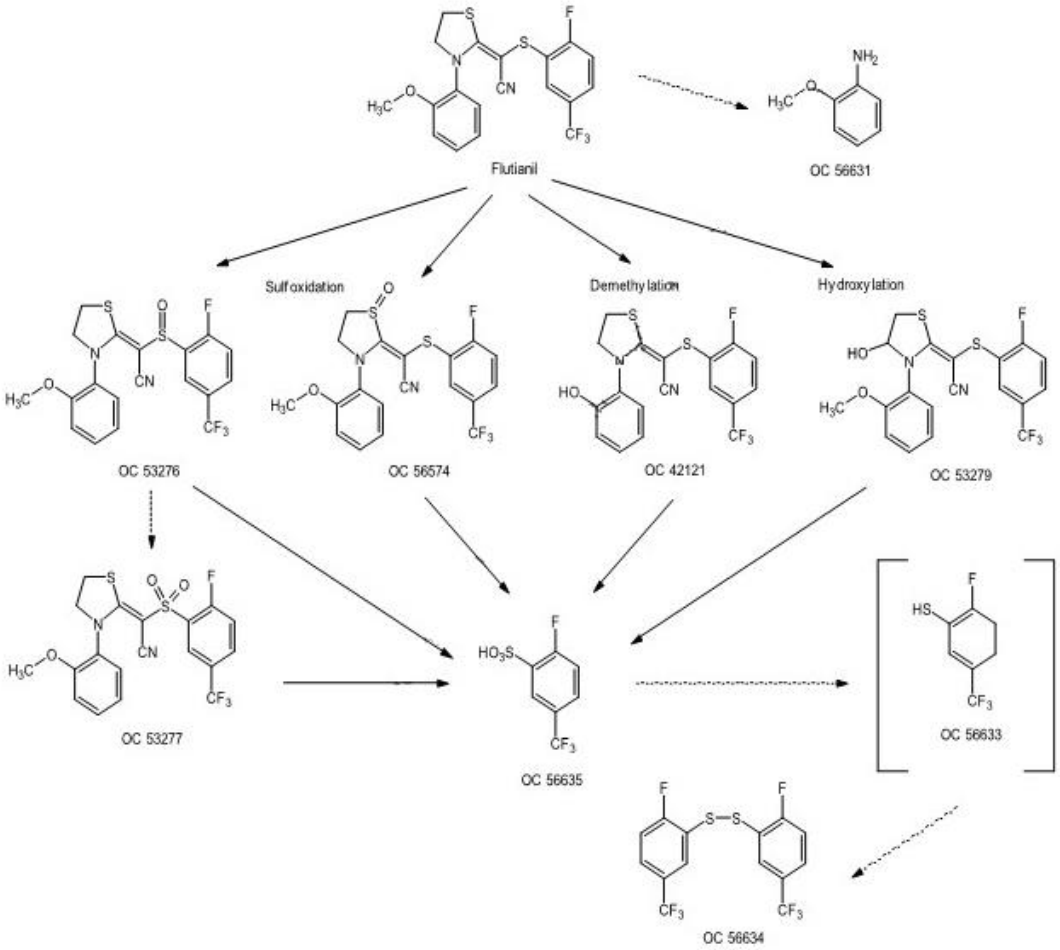
Se dispone de datos suficientes para demostrar que el flutianil no se absorbió bien en los tejidos de las plantas y que los residuos permanecieron en gran medida en las superficies de las plantas; Entre el 70,6 y el 73,7% del residuo radiactivo total permaneció en los lavados superficiales de manzanas y follajes a los 35 días después de la última aplicación. Los lavados superficiales están compuestos predominantemente por flutianil parental con pequeñas cantidades del metabolito OC 53279 en los lavados superficiales de la fruta y pequeñas cantidades de los metabolitos OC 53279, OC 56574, OC 53276 y OC 56634 detectados en los lavados foliares.

La mayor parte de la radiactividad restante pudo extraerse de las manzanas y el follaje de las manzanas utilizando metanol y metanol: agua (1:1 v/v); Poca más radiactividad fue extraída por agua, ácido, base o acetona. Solo entre el 0,6 y el 2,8% del residuo radiactivo total permaneció en los sólidos posteriores a la extracción de la manzana y entre el 1,6 y el 3,7% del residuo radiactivo total permaneció sin extraer del follaje de la manzana.

El extracto metanólico de la manzana requirió una limpieza para eliminar los coextractos acuosos polares / ricos en azúcar. Esta porción acuosa no pudo ser caracterizada por

cromatografía y representó entre el 1,3 y el 8,9% del residuo radiactivo total en la manzana. La porción orgánica restante del extracto de metanol se caracterizó por cromatografía y se determinó que contenía principalmente flutianil padre, pero también pequeñas cantidades de los metabolitos OC 53279, OC 56574, OC 53276 y OC 56635 (OC 56635 con [CF3Ph-U-14C]-flutianil solamente). El total de incógnitas y componentes no resueltos en los lavados superficiales y los extractos metanólicos de las manzanas representaron entre el 5,8 y el 11,5% del residuo radiactivo total, lo que corresponde a ≤0,01 mg/kg en las muestras de 14, 21 y 35 días.

Se propone la siguiente ruta metabólica para el flutianil en las manzanas.



En el follaje de la manzana, se analizaron extractos de agua combinados de metanol y metanol por cromatografía y se determinó que contenían principalmente flutianil junto con pequeñas cantidades de los metabolitos OC 53276, OC 56574, OC 53276, OC 56634 y OC 56635 (OC 56634 y OC 56635 con [CF3Ph-U-14C]-flutianil solamente). El total de incógnitas y componentes no resueltos en los lavados superficiales y el extracto metanólico del follaje de la manzana representaron entre el 18,9 y el 30,8% del residuo radiactivo total, lo que corresponde a aproximadamente 1,13 a 1,94 mg/kg. Se realizaron nuevos intentos de análisis de extractos foliares de manzana mediante TLC, lo que condujo a la formación de manchas y se propone que los componentes no resueltos

representan residuos polares o unidos. Los análisis adicionales de TLC permitieron la identificación tentativa de los metabolitos OC 56631, OC 53277 y OC 42121. Por lo tanto, el residuo radiactivo en el follaje de la manzana estaba menos bien caracterizado que en el de las manzanas y las cantidades de residuos no identificados en el follaje de las manzanas eran relativamente altas. Sin embargo, dado que no se consume follaje de manzana, esto no se considera un problema crítico.

A partir de la identidad de los metabolitos, se propone que el metabolismo del flutianil en las manzanas puede proceder a través de varias rutas, todas relativamente menores: Reacciones de sulfoxidación que conducen a OC 53276, OC 56574 y tentativamente OC 53277; desmetilación para dar OC 42121; hidroxilación a OC 53279; y tentativamente la división de anillos para dar OC 56631. El flutianil padre y todos los metabolitos identificados, excepto el OC 56631, podrían formar el OC 56635 tras la escisión de la unión entre los anillos aromáticos. El OC 56635 era un metabolito relativamente importante, y se propone que esto puede dar lugar al OC 56634 por dimerización a través del OC 56633.

En general, el flutianil parental representó entre el 68,8 y el 86,8% del residuo radiactivo total en las manzanas con la etiqueta en cualquiera de los anillos aromáticos y durante los cuatro períodos de muestreo de 1, 14, 21 y 35 días posteriores a la última aplicación; La cifra correspondiente en follaje fue de 50,2 a 74,1%. El metabolito identificado más prevalente fue el OC 53279, que comprendía hasta el 2,0% del residuo radiactivo total en la fruta y el 1,6-3,2% del residuo radiactivo total en el follaje. Por lo tanto, la degradación metabólica de flutianil en las manzanas parece ser relativamente menor. Por lo tanto, estos datos respaldarían que una definición de residuo de flutianil solo para fines de evaluación del riesgo y aplicación es apropiada en las manzanas.

Metabolismo en Pepino

Métodos: Directiva 91/414/CE (modificada por la Directiva 96/68/CE) documento 7028/VI/95 rev 3, julio de 1997. Guía de prueba de química de residuos de la EPA OPPTS 860.1300, Naturaleza del residuo en las plantas (agosto de 1996). Directrices japonesas MAFF 12-Nousan-8147, sección 2-4-1 (noviembre de 2000), bajo buenas practicas de laboratorio.

En 2006 se llevó a cabo un estudio del metabolismo del pepino (*Cucumis sativus*, variedad 'Telegraph Improved') en un invernadero de Harrogate, Reino Unido. Las plantas de pepino de prueba que crecían en macetas cerradas se trataron con [anillo de 2-metoxifenil-U-^{14}C]-flutianil (>98% de pureza radioquímica, actividad específica 3,770 MBq/mg) o [anillo de trifluorometilfluorobenceno-U-^{14}C]-flutianil (>98% de pureza radioquímica, 3,735 MBq/mg). Se prepararon como formulaciones separadas de 5% EC. Las plantas de pepino se trataron cerca de la cosecha con cuatro aplicaciones equivalentes a 60 g i.a./ha (sobre la base de una densidad de plantación comercial estimada de una planta por 0,2^{m2} en el campo) con un intervalo de aspersión de 13 a 14 días. La aplicación final fue 1 día antes de la primera cosecha de pepinos maduros. La dosis de aplicación corresponde a una dosis de 2,4 N por aplicación y una dosis total de 3,2 N con respecto a la BPA representativa propuesta en uvas del sur de la UE de 3

aplicaciones de 25 g i.a./ha.

Las muestras de pepino se tomaron a los 1, 3 y 15 días después de la última aplicación y las muestras de follaje se tomaron a los 3 y 15 días después de la última aplicación. Las muestras de fruto y follaje de pepino se lavaron con acetonitrilo para obtener una fracción de lavado superficial y luego se homogeneizaron con hielo seco y se sometieron a los siguientes procedimientos de extracción (en orden, mediante maceración): 3 × metanol, 3 × metanol: agua (1:1 v/v), 3 × agua, 3 × ácido clorhídrico 0,1 M y finalmente 3 × hidróxido de sodio 0,1 M.

Los lavados superficiales de la fruta y el follaje del pepino se concentraron para el análisis. Los extractos de metanol combinados se concentraron para su análisis. Los extractos acuosos de metanol y los extractos acuosos restantes no se caracterizaron más debido al bajo nivel de radiactividad que contenían.

El lavado superficial, los extractos y los sólidos posteriores a la extracción se analizaron para determinar la presencia de residuos radiactivos totales mediante el conteo de centelleo líquido (LSC). Análisis cromatográfico compuesto por HPLC en fase reversa utilizando un Genesis C18 de 150 mm × 4,6 mm de diámetro interior × columna de 4 µm eluida con un gradiente de agua: acetonitrilo (90:10 v/v) a agua: acetonitrilo (0:100 v/v) durante 30 min o un gradiente de 0,01% aq. Ácido trifluoroacético: acetonitrilo (90:10 v/v) a 0,01% aq. Ácido trifluoroacético: acetonitrilo (0:100 v/v) durante 30 min. Se realizó un análisis adicional de HPLC en fase normal utilizando un Sequant 2ic Hillic de 150 mm × 4,6 mm de diámetro i.d. × columna de 5 µm eluida con un gradiente de 0,05% aq. Ácido fórmico: acetonitrilo (5:95 v/v) a 0,05% aq. Ácido fórmico: acetonitrilo (60:40 v/v) durante 24 min. La detección se realizó por absorción UV a 254 m y por radiodetección por LSC de las fracciones colectadas. Las identidades de los componentes del residuo se determinaron por cocromatografía con patrones de referencia por HPLC o TLC. El sistema TLC está compuesto por una placa de gel de sílice Whatman K6F desarrollada con tolueno: acetato de etilo (1:1 v/v) o butanol: agua: ácido acético (4:1:1 v/v/v).

Resultados

Se detectaron residuos radiactivos insignificantes (≤0,001 mg/kg) en muestras de frutos y follajes de pepino de control. En las plantas tratadas, los residuos radiactivos totales fueron muy bajos en la fruta del pepino, pero mayores en el follaje. El residuo radiactivo total en los frutos de pepino tratados disminuyó de aproximadamente 0,019 mg/kg (0,12 y 0,26 mg/kg para las etiquetas de 2-metoxifenilo y trifluorometilo, respectivamente) un día después de la última aplicación a aproximadamente 0,003 mg/kg (0,004 y 0,001 mg/kg para las etiquetas de 2-metoxifenilo y trifluorometilo, respectivamente) a los 15 días después de la última aplicación. Los niveles totales de residuos radiactivos en el follaje del pepino disminuyeron de aproximadamente 2,7 mg/kg (2,108 y 3,238 mg/kg para las etiquetas de 2-metoxifenilo y trifluorometilo, respectivamente) tres días después de la última aplicación a aproximadamente 1,2 mg/kg (1,136 y 1,333 mg/kg para las etiquetas de 2-metoxifenilo y trifluorometilo, respectivamente) a los 15 días después de la última aplicación.

Inicialmente, la mayor parte del residuo radiactivo total se recuperaba de lavados superficiales, pero el residuo radiactivo se incorporó rápidamente a los tejidos vegetales; El 81,5 – 83,5% del residuo radiactivo total se recuperó en los lavados superficiales de los pepinos 1 día después de la última aplicación, disminuyendo al 22,6 – 34,8% a los 15 días después de la última aplicación. En el follaje, el 74,7 – 85,2% del residuo radiactivo total se recuperó en lavados superficiales a los 3 días después de la última aplicación, disminuyendo a 61,0 – 64,6% a los 15 días después de la última aplicación. La mayor parte de la radiactividad restante se recuperó en los extractos de metanol. En las fracciones acuosas se extrajo una cantidad insignificante de radiactividad. Solo el 0,3 – 6,4% del residuo radiactivo total permaneció en los sólidos post-extracción del pepino y solo el 0,5 – 1,1% del residuo radiactivo total permaneció sin extraer del follaje del pepino.

En el fruto del pepino, los lavados superficiales y los extractos de metanol combinados se analizaron por HPLC. Se encontró que estos contenían predominantemente flutianil padre junto con un componente no identificado "5A desconocido". "Unknown 5A" solo se detectó en muestras que contenían la etiqueta [MeOPh-U-14C]- flutianil y no se detectó en muestras que contenían la etiqueta [CF3Ph-U-14C]-flutianil. No se identificaron otros metabolitos por cocromatografía con los estándares de referencia disponibles; La baja radiactividad total en estas fracciones dificultó aún más dicha identificación. Por TLC, se identificaron trazas de los metabolitos OC 53279, OC 53276 y OC 56574 en los lavados superficiales y extractos de metanol, pero estas estuvieron por debajo del límite de cuantificación.

En el follaje del pepino, las identidades de los residuos radiactivos en los lavados superficiales y los extractos de metanol combinados se determinaron mediante HPLC. La mayor parte de la radiactividad se asoció con el flutianilo original. No se detectó ninguno de los metabolitos caracterizados en la fruta de pepino como "5A desconocido" en ninguna de las muestras de follaje de pepino. Se cuantificaron los niveles de trazas de los metabolitos OC 53279 y OC 56574 en los lavados superficiales de los 15 días posteriores a la última muestra de aplicación que contenía la etiqueta [MeOPh-U-14C]-flutianil, pero ninguna otra muestra de follaje contenía metabolitos cuantificables que pudieran identificarse. Mediante TLC, se pudieron detectar niveles de trazas de los metabolitos OC 53279, OC 53276 y OC 56574 en otras muestras, pero no se pudieron cuantificar.

Conclusión

Cuando se trató con una pulverización foliar de [MeOPh-U-14C]-flutianil o [CF3Ph-U-14C]-flutianil a 4 × 60 g i.a./ha (3,2N), los residuos radiactivos totales en los frutos de pepino tratados disminuyeron de aproximadamente 0,019 mg/kg (0,12 y 0,26 mg/kg para las etiquetas de 2-metoxifenilo y trifluorometilo, respectivamente) un día después de la última aplicación a aproximadamente 0,003 mg/kg (0,004 y 0,001 mg/kg para las etiquetas de 2-metoxifenilo y trifluorometilo, respectivamente) a los 15 días después de la última aplicación. Los niveles totales de residuos radiactivos en el follaje del pepino disminuyeron de aproximadamente 2,7 mg/kg (2,108 y 3,238 mg/kg para las etiquetas de

2-metoxifenilo y trifluorometilo, respectivamente) tres días después de la última aplicación a aproximadamente 1,2 mg/kg (1,136 y 1,333 mg/kg para las etiquetas de 2-metoxifenilo y trifluorometilo, respectivamente) a los 15 días después de la última aplicación.

Durante el período de muestreo de 15 días, los residuos radiactivos se translocaron a los tejidos vegetales. Los residuos en los lavados superficiales disminuyeron de aproximadamente el 83% del residuo radiactivo total en los frutos de pepino (81,5% y 83,5% para las etiquetas de 2-metoxifenilo y trifluorometilo, respectivamente) 1 día después de la última aplicación, a aproximadamente el 29% del residuo radiactivo total (34,8% y 22,6% para las etiquetas de 2-metoxifenilo y trifluorometilo, respectivamente) a los 15 días después de la última aplicación. Los residuos se extrajeron bien con metanol y se pudo extraer poca radiactividad adicional con metanol: agua, agua, ácido o base. Los residuos radiactivos que quedaban en los sólidos posteriores a la extracción de los frutos de pepino eran bajos, aproximadamente el 3,7% (<0,001 mg/kg) del residuo radiactivo total para la etiqueta de 2-metoxifenilo y aproximadamente el 1,9% (<0,001) del residuo radiactivo total para la etiqueta de trifluorometilo.

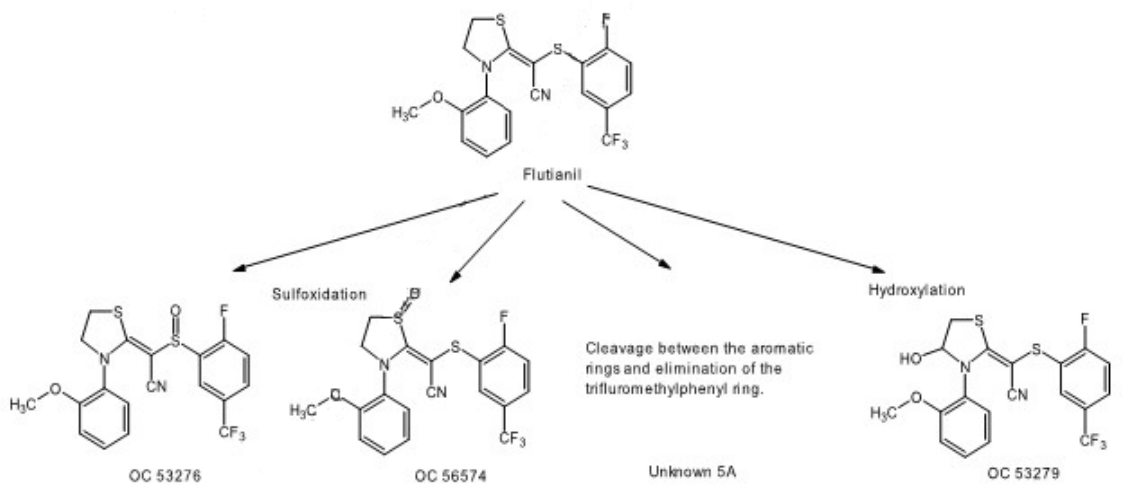
Los lavados superficiales y los extractos metanólicos de la fruta y el follaje del pepino se caracterizaron mediante HPLC y TLC. El componente principal del residuo estaba constituido por flutianil padre (33,8 – 47,1% del residuo radiactivo total en los frutos y 92,7 – 92,9% del residuo radiactivo total en el follaje a los 15 días después de la última aplicación). En los frutos de pepino, el metabolito "5A desconocido" fue el metabolito más grande caracterizado, comprendiendo el 29,2% del residuo radiactivo total a los 15 días después de la última aplicación, pero dado que solo correspondía a 0,001 mg/kg, la falta de identificación formal no es motivo de preocupación. "Unknown 5A" solo se identificó con la etiqueta [MeOPh-U-14C]- flutianil y presumiblemente es el resultado de la escisión entre los anillos aromáticos y no contiene la fracción de trifluorometilfenil. El bajo nivel de los residuos en los frutos de pepino dificultó la identificación y no se identificó ningún metabolito en los frutos de pepino tratados con [CF3Ph-U-14C]-flutianil. La TLC permitió identificar trazas de los metabolitos OC 53279, OC 53276 y OC 56574 en frutos, pero éstas estaban presentes por debajo del límite de cuantificación. En el follaje, no se detectó ninguno de los metabolitos caracterizados en el fruto del pepino como "5A desconocido". Se cuantificaron los niveles de trazas de los metabolitos OC 53279 y OC 56574 en los lavados superficiales de los 15 días posteriores a la última muestra de aplicación que contenía la etiqueta [MeOPh-U-14C]-flutianil, pero ninguna otra muestra de follaje contenía metabolitos cuantificables. Mediante TLC, se pudieron detectar niveles de trazas de los metabolitos OC 53279, OC 53276 y OC 56574.

Se realizaron nuevos intentos para identificar el metabolito "5A desconocido" cuantificado en la fruta de pepino tratada con la etiqueta [MeOPh-U-14C]-flutianil. Se realizó una extracción con metanol a mayor escala de la fruta de pepino, que se limpió utilizando un cartucho de extracción en fase sólida (SPE) Isolute ENV+. Los eluidos acuosos y orgánicos (metanol) del cartucho SPE se recogieron por separado. El 65% de la radiactividad aplicada a la columna SPE se recuperó en el eluido orgánico. Este eluido orgánico se limpió aún más utilizando un cartucho C18 SPE y, finalmente, mediante

cromatografía de sílice flash para aislar las fracciones que contenían el metabolito desconocido. La fracción aislada se sometió a hidrólisis (incubación nocturna en tampón de acetato pH 5 0,1 M con enzima β-glucosidasa a 37 °C o HCl 2 M a 60 °C). Después de la hidrólisis, las muestras se acidificaron a pH 1 con ácido clorhídrico concentrado y se dividieron en acetato de etilo. Solo una pequeña proporción de la radiactividad se dividió en la fase orgánica después de la hidrólisis, lo que sugiere que el metabolito 5A era resistente a la hidrólisis y era poco probable que fuera un conjugado. El análisis por LC/MS del aislado purificado antes y después de la hidrólisis resultó difícil; Se determinó un peso molecular de 235 m/z, aunque no se dispuso de información estructural. Se realizaron comparaciones cromatográficas adicionales para identificar 5A desconocidos en relación con extractos de estudios de metabolismo en uvas y ratas; estas comparaciones no fueron concluyentes, aunque se propone que el 5A desconocido puede coincidir con un metabolito menor en ratas. Por lo tanto, el metabolito 5A permanece caracterizado pero no identificado. Es probable que sea el resultado de la escisión entre los anillos aromáticos de flutianil y no contiene el sistema de anillos trifluorometilo. Estaba presente en solo 0,001 mg/kg en el fruto del pepino a los 15 días después de la última aplicación basada en equivalentes de flutianil y, como el peso molecular de este fragmento es menor que el de la molécula madre intacta, su concentración real será aún menor.

A partir de la identidad de los metabolitos, se propone que el metabolismo del flutianil en el pepino puede proceder a través de varias rutas, todas relativamente menores: reacciones de sulfoxidación que conducen a OC 53276 y OC 56574 e hidroxilación a OC 53279. Una ruta más significativa del metabolismo es la escisión entre los anillos aromáticos para dar lugar al metabolito desconocido "5A desconocido".

Se puede proponer la siguiente ruta metabólica para el flutianil en el pepino.



En general, el flutianil original constituyó entre el 33,8 y el 47,1% del residuo radiactivo total en la fruta del pepino con la etiqueta en cualquiera de los anillos aromáticos a los 15 días después de la última aplicación; la cifra correspondiente en el follaje fue del 92,7 al 92,9%. El metabolito identificado más prevalente fue el "5A desconocido", que

comprendió hasta el 29,2% del residuo radiactivo total en el fruto de pepino con la etiqueta [MeOPh-U-14C]-flutianil a los 15 días después de la última aplicación, lo que corresponde a un residuo de solo 0,001 mg/kg. Debido al bajo nivel de residuos, no se logró la identificación de este metabolito. Dado el nivel muy bajo de residuos en la fruta de pepino, los datos respaldan una definición de residuo de flutianil solo para fines de evaluación de riesgos y aplicación en pepinos.

Metabolismo en Lechuga

Métodos: Directiva 91/414/CE (modificada por la Directiva 96/68/CE) documento 7028/VI/95 rev 3, julio de 1997. Guía de prueba de química de residuos de la EPA OPPTS 860.1300, Naturaleza del residuo en las plantas (agosto de 1996). Directrices japonesas del MAFF 12-Nousan-8147, sección 2-4-1 (noviembre de 2000), bajo buenas prácticas de laboratorio.

En 2007 se realizó un estudio del metabolismo de la lechuga (*Lactuca sativa*, variedad 'Saladin' (tipo iceberg)) en un invernadero de Harrogate, Reino Unido. Las plantas de lechuga de prueba que crecían en macetas cerradas se trataron con [anillo de 2-metoxifenil-U-14C]-flutianil (>98% de pureza radioquímica, actividad específica 3,782 MBq/mg) o [anillo de trifluorometilfluorobenceno-U-14C]-flutianil (>98% de pureza radioquímica, 3,735 MBq/mg). Se prepararon como formulaciones separadas de 5% EC. Las plantas de lechuga se trataron con cinco aplicaciones de 45 g i.a./ha con un intervalo de aspersión de 7 días.

Las lechugas se cosecharon a los 7 días después de la última aplicación. Se eliminaron las hojas marchitas y descompuestas, y las muestras de lechuga restantes se dividieron en hojas y cabezas de envoltura. Las muestras de hojas y cabezas de envoltura se lavaron con acetonitrilo para dar fracciones de lavado superficial y luego se homogeneizaron con hielo seco y se sometieron a los siguientes procedimientos de extracción (en orden, mediante maceración): 3 × metanol, 3 × metanol: agua (1:1 v/v), 3 × agua, 3 × ácido clorhídrico 0,1 M, 3 × hidróxido de sodio 0,1 M y finalmente 3 × acetona.

Los lavados superficiales, los extractos y los sólidos posteriores a la extracción se analizaron para determinar la presencia de residuos radiactivos totales mediante el conteo de centelleo líquido (LSC). Los lavados superficiales de las hojas de envoltura y las cabezas de lechuga se concentraron y analizaron por HPLC o TLC como se describe a continuación. Las alícuotas de los extractos de metanol combinados de las hojas de envoltura y las muestras de cabezas de lechuga se dividieron dos veces con hexano; la radiactividad en las particiones de metanol y hexano se determinó mediante LSC. La partición de metanol se concentró y analizó por HPLC/TLC. La partición de hexano y el resto de metanol: agua y extractos acuosos no se caracterizaron más debido al bajo nivel de radiactividad que contenían.

Análisis cromatográfico compuesto por HPLC en fase reversa utilizando un Genesis C18 de 150 mm × 4,6 mm de diámetro interior × columna de 4 µm eluida con un gradiente de agua: acetonitrilo (90:10 v/v) a agua: acetonitrilo (0:100 v/v) durante 30 min o un gradiente de 0,01% aq. Ácido trifluoroacético: acetonitrilo (90:10 v/v) a 0,01% aq. Ácido

trifluoroacético: acetonitrilo (0:100 v/v) durante 30 min. La detección se realizó por absorción UV a 254 m y por radiodetección por LSC de las fracciones colectadas. Las identidades de los componentes del residuo se determinaron por cocromatografía con patrones de referencia por HPLC o TLC. El sistema TLC está compuesto por una placa de gel de sílice Whatman K6F desarrollada con tolueno: acetato de etilo (1:1 v/v) o butanol: agua: ácido acético (4:1:1 v/v/v).

Resultados

No se detectaron residuos radiactivos en las muestras de lechugas de control. En las plantas tratadas, los residuos radiactivos totales fueron mayores en las hojas de la capa (1,937 – 2,112 mg/kg) que en las cabezas de lechuga (0,026 – 0,050 mg/kg).

La mayor parte del total de los residuos radiactivos se recuperó de lavados superficiales o de extractos de metanol. Poca más radiactividad se extrajo por metanol: agua (1:1 v/v) o en las fracciones acuosa y acetona. Solo entre el 0,2 y el 0,8% del residuo radiactivo total permaneció en los sólidos posteriores a la extracción de la lechuga. En el extracto de metanol, cuando se particionó con hexano, la mayor parte de la radiactividad permaneció en la partición de metanol.

Por HPLC, en las hojas y cabezas de la envoltura de lechuga, la mayor parte de los residuos en los lavados superficiales y la partición de metanol del extracto de metanol se atribuyeron al flutianilo original. Con la marca [MeOPh-U-14C]-flutianil se cuantificaron cantidades menores de los metabolitos OC 53279, OC 56574 y OC 53276; se detectaron hasta siete componentes desconocidos, el mayor de los cuales representó el 2,3% del residuo radiactivo total (<0,05 mg/kg). Con la marca [CF3Ph-U-14C]-flutianil se cuantificaron cantidades menores de los metabolitos OC 53279, OC 56574, OC 53276 y OC 56635; se detectaron hasta cinco componentes desconocidos, el mayor de los cuales ascendió al 4,1% del residuo radiactivo total (<0,05 mg/kg). Los rastros de OC 56634 fueron detectados por TLC, pero no pudieron ser cuantificados.

Discusión

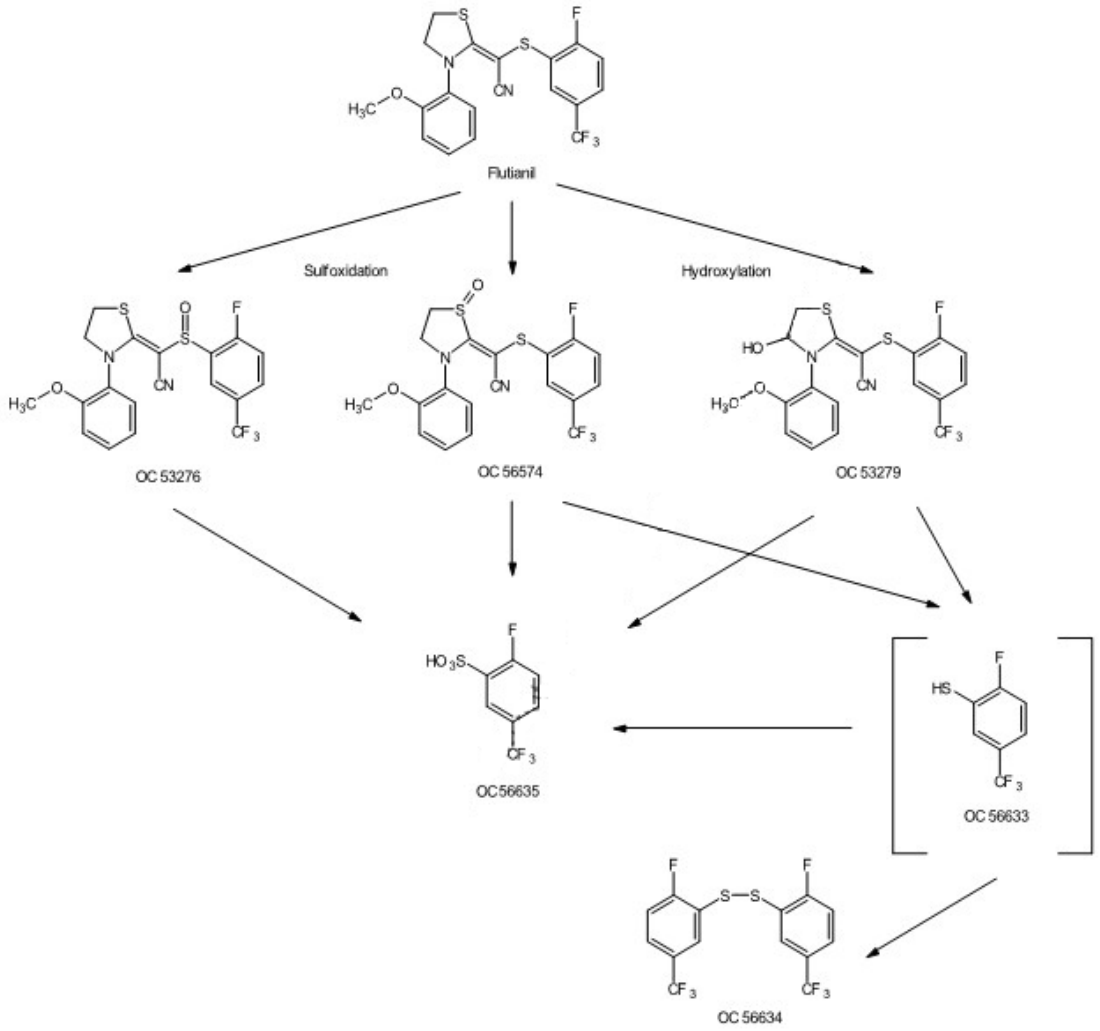
Cuando se trataron con una aspersión foliar de [MeOPh-U-14C]-flutianil o [CF3Ph-U-14C]-flutianil a 5 × 45 g i.a./ha y con un intervalo precosecha de 7 días, los residuos radiactivos totales en las cabezas de lechuga tratadas fueron de 0,050 mg/kg y 0,026 mg/kg para las etiquetas de 2-metoxifenilo y trifluorometilo, respectivamente, y en las hojas de envoltura de lechuga, los residuos radiactivos totales fueron de 2,112 y 1,937 mg/kg para las etiquetas de 2-metoxifenilo y trifluorometilo, respectivamente. La mayor parte de este residuo se encontró en los lavados superficiales y el residuo restante se extrajo bien con metanol. Con el metanol se pudo extraer poca radiactividad: agua, agua, ácido, base o acetona. Solo entre el 0,2 y el 0,8% de la radiactividad permaneció en los sólidos posteriores a la extracción.

Los lavados superficiales y los extractos metanólicos de las lechugas pudieron ser analizados por HPLC y TLC. La mayor parte de la radiactividad se asignó al flutianil original (83,7 – 89,4%). Solo se cuantificaron pequeñas cantidades de los metabolitos OC

53279, OC 56574, OC 53276 y OC 56635 (este último con la etiqueta [CF3Ph-U-14C]-flutianil solamente). Las incógnitas totales constituyeron aproximadamente el 6,1% del residuo radiactivo total (aproximadamente 0,125 mg/kg) en las hojas de envoltura y aproximadamente el 10% del residuo radiactivo total (aproximadamente 0,003 mg/kg) en las cabezas de lechuga. Las incógnitas individuales no estuvieron presentes en niveles significativos.

A partir de la identidad de los metabolitos, se propone que el metabolismo del flutianil en la lechuga puede proceder a través de varias rutas, todas relativamente menores: reacciones de sulfoxidación que conducen a OC 53276 y OC 56574, hidroxilación para dar OC 53279 y escisión entre los anillos aromáticos para dar OC 56635. Más tentativamente, el rastro de OC 56634 podría surgir por dimerización del intermedio inferido OC 56633 (no detectado).

Se puede proponer la siguiente ruta metabólica para el flutianil en la lechuga.



En general, el flutianil original constituyó entre el 83,7 y el 89,4% del residuo radiactivo total en las cabezas de lechuga y las hojas de envoltura a los 7 días después de la última

aplicación. Solo se identificaron niveles traza de metabolitos y no predominó ningún metabolito. Por lo tanto, los datos respaldarían que una definición de residuo de flutianil solo para fines de evaluación del riesgo y aplicación es apropiada en la lechuga.

Metabolismo, distribución y expresión del residuo en cultivos rotacionales

Para el uso representativo en las vides de uva, se considera un cultivo permanente no rotado para el cual no se requiere considerar la rotación de cultivos. En cuanto al uso representativo de los cultivos ornamentales protegidos, también deben considerarse no pertinentes para los residuos de los cultivos en rotación.

Resumen y evaluación del metabolismo, distribución y expresión de residuos en plantas

El metabolismo y la distribución de flutianil se han investigado después de un tratamiento foliar con flutianil marcado en los anillos aromáticos de metoxifenilo o trifluorometilo en los cultivos primarios: uvas, manzanas, pepinos y lechuga. Por lo tanto, estos estudios abordan el metabolismo en los grupos de cultivos de frutas y cultivos de hoja. Dada la naturaleza de las BPA para los usos representativos propuestos (vides y cultivos ornamentales protegidos), no es necesario tener en cuenta el metabolismo, la distribución y la expresión de los residuos de flutianil en los cultivos rotativos y siguientes.

Los estudios de metabolismo en uvas, manzanas, pepinos y lechugas se realizaron a tasas exageradas (2,1 – 3,2N en comparación con el GAP representativo en uvas); Tratamientos compuestos por 3 a 5 aspersiones foliares cerca de la cosecha de acuerdo con el patrón de uso propuesto. Estos estudios indicaron que en uvas, manzanas y lechuga, el flutianil se translocaba mal a los tejidos de las plantas y los residuos permanecían en gran medida como flutianil inalterado en los lavados superficiales de las frutas y el follaje. Los pepinos fueron una excepción, ya que la mayor parte de los residuos se translocaron a los frutos de pepino, aunque los residuos fueron muy bajos. En todos los casos, los residuos fueron resistentes a la hidrólisis y se extrajeron fácilmente con metanol; Quedaron pocos residuos en los sólidos posteriores a la extracción. Esto indica que la incorporación natural y la conjugación no fueron significativas durante el período de tiempo investigado (hasta 45 días después de la última aplicación). Los niveles generales de extracción y caracterización de los residuos alcanzados estuvieron de acuerdo con los requisitos de SANCO/7028/VI/95 rev. 3.

El patrón de metabolismo fue similar en todos los cultivos investigados, siendo las principales rutas de degradación (todas relativamente menores):

- Reacciones de sulfoxidación en cualquiera de las posiciones del azufre que conducen a la formación de los metabolitos OC 53276 y OC 56574 (uvas, manzanas, pepinos, lechuga).
- Hidroxilación del anillo de tiazolidina para formar el metabolito OC 53279 (uvas, manzanas, pepinos, lechugas).
- Escisión entre los anillos aromáticos para dar un fragmento de trifluorometilfenilo,

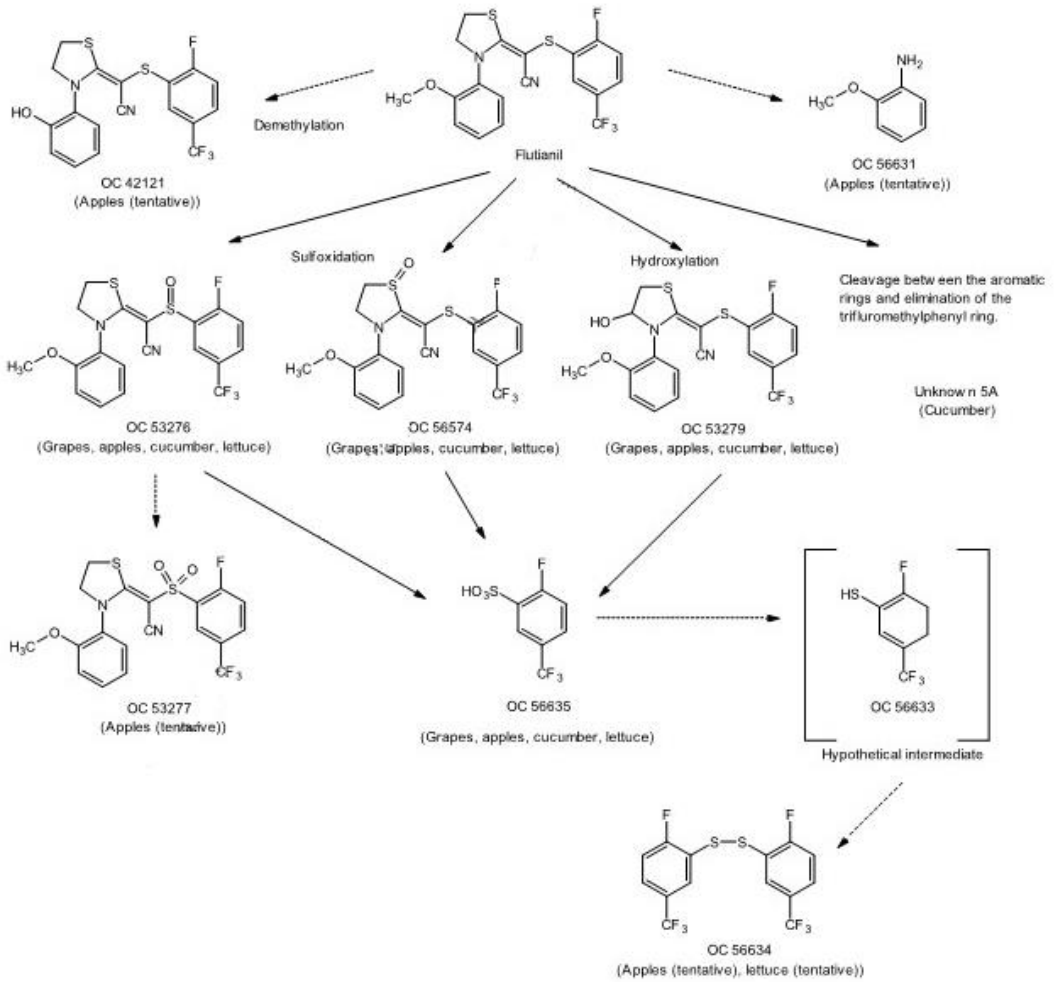
metabolito OC 56635 (uva (solo follaje), manzanas, pepinos, lechuga).

- Escisión entre los anillos aromáticos para producir un compuesto no identificado, "5A desconocido", que no contiene el anillo trifluorometilo (una ruta dominante en el fruto del pepino sobre la base de un residuo radiactivo total, pero presente en niveles muy bajos en términos absolutos).

Las rutas menos significativas del metabolismo pueden incluir:

- Escisión entre los anillos aromáticos para dar lugar a un fragmento de metoxifenilo, metabolito OC 56631 (manzanas (tentativo)).
- Desmetilación del anillo de metoxifenilo para dar OC 42121 (manzanas (tentativo)).
- Oxidación adicional del azufre en el metabolito OC 53276 produciendo el metabolito OC 53277 (manzanas (tentativo).
- Dimerización de un hipotético tio intermedio OC 56633 para dar metabolito OC 56634 (manzanas (tentativo), lechuga (tentativo)).

Se puede proponer la siguiente ruta metabólica general para el flutianil en las plantas.



En todos los cultivos investigados, el flutianil original siempre fue el componente principal

del residuo en el punto de muestreo final (88,5 – 96,2% del residuo radiactivo total en pomelos y follaje; 50,2 – 75,1% del residuo radiactivo total en la manzana y el follaje; 33,8 – 92,9% del residuo radiactivo total en la fruta y el follaje del pepino y 83,7 – 89,4% del residuo radiactivo total en el follaje de la lechuga. Los metabolitos identificados individualmente eran componentes minoritarios del residuo, que normalmente correspondían a menos del 5% del residuo radiactivo total. Sobre esta base, sería conveniente establecer una definición de residuo en los frutos y cultivos de hoja de flutianil parental únicamente con fines de evaluación del riesgo y seguimiento. Dado que no se ha investigado el metabolismo del flutianil en tres grupos de cultivos diferentes, no se puede proponer una definición general de los residuos de flutianil en las plantas.

Metabolismo, distribución y expresión de los residuos en el ganado

No se han presentado datos sobre el metabolismo del ganado para respaldar una definición de residuos de flutianil en los productos de origen animal, dados que los usos representativos del flutianil en los cultivos ornamentales y en la vid no darán lugar a productos forrajeros tratados que puedan formar una parte importante de la dieta del ganado. Para el uso representativo en cultivos ornamentales, estos cultivos no son forraje para animales, por lo que este argumento también es válido y aceptable.

Para EFSA, máximo ente regulatorio en la Comunidad Europea respecto a seguridad alimentaria, tanto los argumentos como cálculos de residualidad son suficientes para dar garantía de que no es necesario tener en cuenta el metabolismo, la distribución y la expresión de los residuos de flutianil en el ganado ya que el riesgo para los consumidores de los residuos de flutianil en los productos de origen animal es insignificante.

Definición del residuo

Definición de residuo en plantas: Flutianil solo para fines de evaluación y monitoreo de riesgos (solo frutos y cultivos de hojas).
Definición de residuo en cultivos rotativos: No se requiere para los usos notificados.
Definición de residuo en ganado: No se requiere para los usos notificados

Patrón de uso

Cultivo y/o situación	**Estado miembro o país**	**Concentración de i.a**	**intervalo precosecha PHI (días)**	**Observaciones**
Vid	Sur de la UE	50 g/L	14	Ninguno.
Cultivos ornamentales protegidos	Norte y sur de la UE	50 g/L	No se aplica.	Uso no comestible.

Residuos procedentes de ensayos supervisados en uva

Se han presentado datos sobre residuos de 12 ensayos realizados en el sur de la UE con vino y uvas de mesa en 2007 y 2008.

Métodos: Directiva 91/414/CEE del Consejo, de 15 de julio de 1991, modificada por la Directiva 96/68/CE de la Comisión, de 21 de octubre de 1996, y 7029/VI/95 rev.5 (22/7/97), Apéndice B - Recomendaciones generales para el diseño, la preparación y la realización de ensayos de residuos, bajo buenas prácticas de laboratorio.

Todos los ensayos se llevaron a cabo de manera aceptable. Los ensayos se realizaron utilizando la formulación representativa de flutianil al 5% de EC con un GAP objetivo de 3 × 30 g i.a./ha con un intervalo de pulverización de 12 días e intervalo precosecha de 14 días. Esto se sitúa aceptablemente dentro del 25 % del GAP representativo propuesto para las uvas en el sur de la UE. Las muestras de uvas se almacenaron congeladas hasta 6 meses entre la cosecha y el análisis, esto está dentro del intervalo de estabilidad demostrada de los residuos de flutianil en uvas congeladas. Las muestras de uva se analizaron para detectar residuos de flutianil según el método CLE 2554/019-01V (GC-ECD). Este método se propone como un método de aplicación para el análisis de residuos de flutianil en uvas. El LOQ de este método es de 0,01 mg/kg. Los residuos en muestras de uvas control no tratadas fueron de <0,01 mg/kg. Se realizaron fortificaciones procedimentales a 0,01, 0,05 y 0,1 mg/kg. Para el estudio 2554/027, las recuperaciones estuvieron dentro del rango de 84,2 a 111,5%, con una recuperación media del 98,3% y una DSR del 8,2% (n = 16). Para el estudio 2554/092, las recuperaciones estuvieron dentro del rango de 82,6 a 103,5%, con una recuperación media del 92,1% y una DSR del 8,3% (n = 6). Estos están dentro de rangos aceptables.

Se destacó que, si bien se pretendía que las muestras de uva comprendieran racimos enteros (bayas y tallos), en algunos ensayos solo se tomaron muestras de bayas. Por lo tanto, cuando se disponía de racimos enteros, se realizaron nuevos análisis de estas muestras para analizar solo las bayas con fines comparativos. Estos resultados indicaron que, aunque los racimos enteros generalmente daban un valor de residuo más alto, los niveles de residuos medidos no fueron significativamente diferentes para los racimos enteros o las bayas solamente. Por lo tanto, se considera que son aceptables los resultados de los ensayos en los que sólo se analizaron muestras de bayas.

Las muestras de uvas de mesa de los ensayos 2554/027/6 y 2554/027/7 se secaron al sol para formar pasas. En el sitio de ensayo 6, los residuos aumentaron de ~0,0079 mg/kg (por debajo del LOQ) en la uva cruda a 0,0151 mg/kg en la pasa correspondiente. En el sitio de ensayo 7, los residuos aumentaron de 0,1007 mg/kg a 0,2780 mg/kg. Estos corresponden a factores de transferencia de ~1,91 y 2,76 respectivamente para el aumento de los residuos de flutianil debido al secado de las uvas para formar pasas y, por lo tanto, se puede proponer un factor de transferencia medio de 2,3 para las pasas.

Ensayos supervisados de residuos en uvas

Se han presentado datos sobre residuos de 14 ensayos realizados en el norte de la UE con uvas de vinificación entre 2006 y 2008; obsérvese que el uso en uvas del norte de la UE no se propone como un uso representativo del flutianil según las BPA.

Métodos: Directiva 91/414/CEE del Consejo, de 15 de julio de 1991, modificada por la Directiva 96/68/CE de la Comisión, de 21 de octubre de 1996, y 7029/VI/95 rev.5

(22/7/97), Apéndice B - Recomendaciones generales para el diseño, la preparación y la realización de ensayos de residuos, bajo buenas prácticas de laboratorio.

Todos los ensayos se llevaron a cabo de manera aceptable utilizando la formulación comercial de 5% EC. Los ensayos del estudio 2554/021 se realizaron con un GAP objetivo de 4 × 25 g i.a./ha con un intervalo de pulverización de 14 días y un intervalo precosecha PHI de 14 días. Los ensayos de los estudios 2554/026 y 2554/091 se realizaron con un GAP objetivo de 3 × 30 g i.a./ha con un intervalo de pulverización de 14 días y un intervalo precosecha PHI de 14 días.

Las muestras de uvas se almacenaron congeladas hasta 6 meses entre la cosecha y el análisis, esto está dentro del intervalo de estabilidad demostrada de los residuos de flutianil en uvas congeladas. Las muestras de uva se analizaron para detectar residuos de flutianil según el método CLE 2554/019-01V (GC-ECD). Este método se propone como un método de aplicación para el análisis de residuos de flutianil en uvas. El LOQ de este método es de 0,01 mg/kg.

Los residuos en muestras de uvas control no tratadas fueron de <0,01 mg/kg. Se realizaron fortificaciones procedimentales a 0,01, 0,05 y 0,1 mg/kg. Para el estudio 2554/021, las recuperaciones estuvieron dentro del rango de 79,1 a 101,7%, con una recuperación media del 91,6% y una DSR del 7,1% (n = 10). Para el estudio 2554/026, las recuperaciones estuvieron dentro del rango de 95,1 a 121,9%, con una recuperación media de 100,6% y una DSR de 9,4% (n = 12). Para el estudio 2554/091, las recuperaciones estuvieron dentro del rango de 81,2 a 93,9%, con una recuperación media de 86,4% y una DSR de 5,2% (n = 6).

Resumen de los residuos resultantes de los ensayos supervisados

Situación de los cultivos	**Número de ensayos relevantes para la HUECO**	**Mercancía**	**Definición de residuo**	**Valores de residuos (mg/kg)**	**STMR (en inglés) (mg/kg)**	**HR (mg/kg)**	**LMR (OCDE calculadora)**
Vid (vino y mesa), sur de la UE.	12	Fruta: racimos enteros, aunque para algunos ensayos solo se tomaron muestras de bayas.	Flutianil	<0,01, <0,01, <0,01, 0,0127, 0.0154, 0.0170, 0.0180, 0.0219, 0.0363, 0.0371, 0.0439, 0.1007	0.018 mg/kg	0.101 mg/kg	Media + 4 DE = 0,131 mg/kg Factor de corrección × 3 media = 0,069 mg/kg **LMR redondeado = 0,15 mg/kg**

Situación de los cultivos	Número de ensayos relevantes para la HUECO	Mercancía	Definición de residuo	Valores de residuos (mg/kg)	STMR (en inglés) (mg/kg)	HR (mg/kg)	LMR (OCDE calculadora)
(Vid (vino), norte de la UE.)	(10)	Fruta: racimos enteros	Flutianil	0.0235, 0.0286, 0.0329, 0.0386, 0.0563, 0.0585, 0.0640, 0.0691, 0.0909, 0.0983	0.057 mg/kg	0.098 mg/kg	

Por lo tanto, los datos de los ensayos de residuos del sur de la UE se ajustarían a un LMR de 0,15 mg/kg en las uvas.

Se han llevado a cabo estudios de procesamiento de muestras de uvas que contienen residuos incurridos de flutianil. Estos estudios indican que no se transfieren residuos detectables de flutianil al zumo de uva o al vino, mientras que los residuos se concentran en el orujo húmedo de uva y en el orujo seco. No se requieren consideraciones específicas de los productos procesados para la evaluación del riesgo de exposición del consumidor humano.

Intervalos previos a la cosecha propuestos

El intervalo de precosecha propuesto para el uso en uva es de 14 días.

Propuesta de LMR para la UE

Mercancía	Propuesta de LMR de la UE	Comentario
Uvas (de mesa y vino)	0,15 mg/kg	Definición de residuo: Flutianil

Ingestas por parte de los seres humanos

La ingesta diaria admisible (IDA) propuesta de flutianil es de 2,49 mg/kg de peso corporal/día.

Persistencia en el suelo, adsorción y desorción en partículas de suelo, hidrólisis, fotolisis y biodegradación.

Suelo:

Compuesto	Persistencia	Ecotoxicología
flutianil	Persistencia de muy baja a alta. DT50 de primer orden único 263-338 días (humedad del suelo a 20°C pF 2). Estudios de disipación en campo europeos Cinética bifásica DT50 0,08-161 días (DT90 2,7-535 días)	El riesgo para los organismos del suelo se evaluó como bajo.

Compuesto	Persistencia	Ecotoxicología
Metabolito OC 56574	Persistencia de moderada a alta. DT50 de primer orden único 46-254 días (humedad del suelo a 20°C pF 2)	El riesgo para los organismos del suelo se evaluó como bajo.
Metabolito OC 56635	Muy alta persistencia No se observó disminución (humedad del suelo a 20°C pF 2)	El riesgo para los organismos del suelo se evaluó como bajo.
Metabolito OC 53276	No relevante	No relevante
Metabolito OC 53279	No relevante	No relevante

Compuesto	Movilidad	Clasificación
flutianil	Kf: 533-1093 mL/, Kfoc: 20631-79448 mL/g	Inmóvil
Metabolito OC 56574	Kf: 33.5-60.1 mL/g, Kfoc: 1057-2578 mL/g	Ligeramente móvil
Metabolito OC 56635	No relevante	-
Metabolito OC 53276	Kf: 9.55-31.94 mL/g, Kfoc: 444-761 mL/g	Ligeramente móvil
Metabolito OC 53279	No relevante	-

Identificación química:
OC 53276: (Z)-2-(2-fluoro-5-(trifluoromethyl)phenylsulfinyl)-2-(3,2-methoxyphenyl)thiazolidin-2-ylidene)acetonitrile
OC 56574: (Z)-2-(2-fluoro-5-(trifluoromethyl)phenylsulfinyl)-2-(3,2-methoxyphenyl) 1-oxo-thiazolidin-2-ylidene)acetonitrile
OC 53279: (Z)-2-(2-fluoro-5-(trifluoromethyl)phenylthio)-2-(4-hydroxy-3-(2-methoxyphenyl)thiazolin-2-ylidene)acetonitrile (Ref:)
OC 56635: 2-fluoro-5-(trifluoromethyl)benzenesulfonic acid

En incubaciones de laboratorio en suelo bajo condiciones aeróbicas en la oscuridad, el flutianil exhibió una alta persistencia, formando el metabolito principal (>10% de la radiactividad aplicada) OC 56574 (máximo 18.9% de la radiactividad aplicada) que exhibió una persistencia moderada a alta. El metabolito OC 53276 alcanzó niveles que desencadenaron una evaluación de la exposición a las aguas subterráneas (máximo 8,6 % de la radiactividad aplicada) que mostró una persistencia de alta a muy alta. La mineralización de los radiomarcadores de 14C del anillo CF3-fenilo y metoxifenilo a dióxido de carbono representó solo el 0,3 – 2,6 % de la radiactividad aplicada después de 120 días. La formación de residuos no extraíbles (no extraídos por acetonitrilo) para estos radiomarcadores representó entre el 6,3 y el 12 % de la radiactividad aplicada después de 120 días. En las incubaciones anaeróbicas del suelo, el flutianil fue esencialmente estable. En las investigaciones de fotólisis de laboratorio de suelos secados al aire, el flutianil se degradó más rápido en las muestras iluminadas que en los controles oscuros, formandose el metabolito principal OC 56635 (máximo 10,7% de la radiactividad aplicada). El flutianil se mantuvo inmóvil en el suelo. OC 56574 presentaba baja movilidad o inmovilidad. OC 53276 exhibió una movilidad media a baja y OC 56635 exhibió una movilidad en el suelo muy alta. Se concluyó que la adsorción de estos cuatro

compuestos no dependía del pH. En estudios satisfactorios de disipación de campo realizados en sitios de Alemania, el norte y el sur de Francia y España (aplicación de pulverización a la superficie del suelo en parcelas de suelo desnudo en junio), el flutianil mostró una persistencia muy baja a alta. Los análisis de muestras solo se llevaron a cabo para flutianil, OC 53276, OC 56574 y OC 56635. En los estudios de campo, OC 53276, OC 56574 y OC 56635 representaron máximos medidos en 18,5, 10,8 y 77,87 % del flutianil medido inicialmente, respectivamente, sobre una base molar.

Agua:

Hidrolisis: Flutianil es estable y por tanto persistente a la hidrolisis a pH 4, 7 y 9.
Fotolisis acuosa: DT50: 1.1 días – Fácilmente degradable
Biodegradación: se clasifica como no fácilmente biodegradable

En incubaciones de laboratorio en sistemas agua – sedimento bajo condiciones aeróbicas oscuras, el flutianil se disipó rápidamente del agua al sedimento, donde mostró una persistencia muy alta, formando el metabolito principal del sedimento OC 53279 (máximo 15,8% de la radiactividad aplicada). La fracción de sedimento no extraíble (no extraída por acetonitrilo) representó entre el 5 y el 15% de la radiactividad aplicada después de 100 días. La mineralización de estos radiomarcadores fue limitada, representando un máximo de 2,5% de la radiactividad aplicada al final del estudio.

Aguas subterráneas:

Compuesto	**Lixiviación**
flutianil	Poco lixiviable
Metabolito OC 56574	Poco lixiviable
Metabolito OC 56635	No relevante
Metabolito OC 53276	No relevante
Metabolito OC 53279	No relevante

Aire:

DT50 de degradación fotoquímica oxidativa en aire: 3.42 horas derivado del modelo de Atkinson
Volatilización: no volátil
Metabolitos en aire: ninguno