



CAPACITACIONES ICCAS

TALLER

ASPECTOS REGULATORIOS DE RESIDUOS Y COMERCIO INTERNACIONAL

Del miércoles 29 de septiembre hasta el miércoles 10 de noviembre



Modulo IV: Estudios regulatorios sobre cultivos. Metabolismo en Vegetales.
Ing. Agr. Paulina Marchant
Bayer S.A.



Presentación



Paulina Marchant
Especialista en Seguridad Dietética
para América Latina
paulina.marchant@bayer.com

Ingeniero Agrónomo, titulada de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Experiencia en Bayer por 19 años en cargos de ámbito regulatorio y de seguridad humana, con diversos cursos de especialización en el área. Jefe de Asuntos Regulatorios y coordinadora del Grupo de Residuos en Bayer Chile. Responsable de Residuos para países de América Latina. Actualmente se desempeña como Especialista en Seguridad Dietética en Bayer para la misma Región.



Agenda

- ❖ Introducción
- ❖ Estudios de Metabolismo en plantas
- ❖ Definición de Residuos



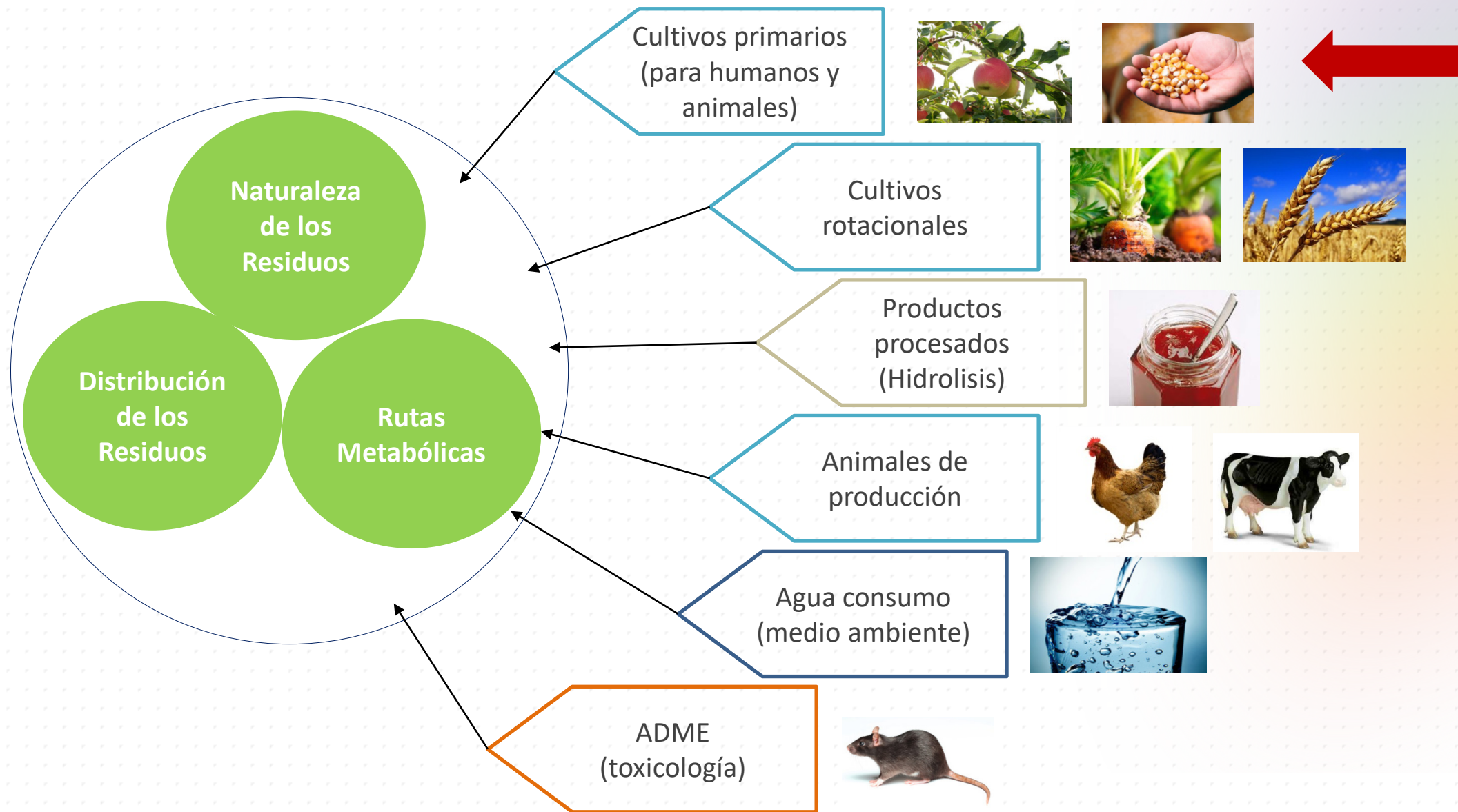
Introducción

Flujograma simplificado para establecimiento de Límites Máximos de Residuos.





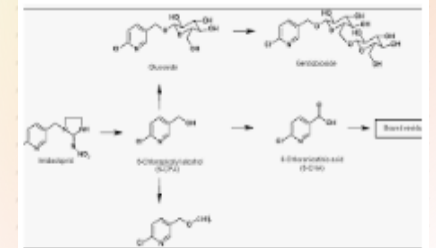
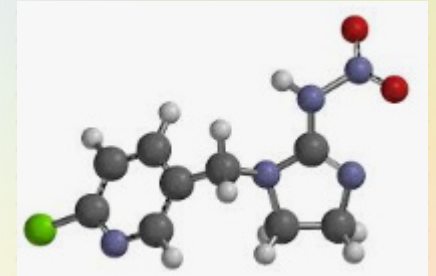
Introducción





Metabolismo

- El término “Metabolismo” en general, comprende la suma total de **todos los procesos físicos y químicos que ocurren dentro de un organismo**; en este caso, para un pesticida dentro de una planta o un animal.
- Incluye la **incorporación y distribución** (transporte o traslocación) dentro del organismo, **cambios (biodegradación) y eliminación** del **pesticida y sus metabolitos**.
- En los estudios en plantas, el término “metabolismo” es utilizado más ampliamente; incluyendo la formación de **todos los compuestos en la planta, independiente de si ellos se originan de procesos metabólicos internos, u otros procesos** como por ejemplo reacciones químicas (hidrólisis y fotólisis).





Metabolismo

Metabolito: cualquier producto de la biotransformación en plantas o animales.

Producto de degradación: cualquier producto de la degradación ambiental que pueda estar presente como residuo (por ejemplo; fotólisis en superficie de plantas).





Propósito de los estudios de metabolismo vegetal

- Determinar la naturaleza probable de los residuos que se encuentran en los alimentos y piensos.
- Caracterizar e identificar la estructura química de metabolitos de relevancia o de preocupación toxicológica.
- Evaluar la distribución de los metabolitos dentro de diferentes partes del cultivo.
- Establecer una vía (ruta) metabólica.
- Obtener las Definiciones de Residuos.

Descripción general – Estudio cultivos primarios

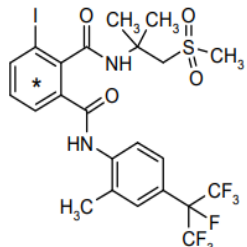
- Aplicación de la sustancia activa radio marcada, representando las recomendaciones de uso previstas (Buena Práctica Agrícola).
- Debe ser realizado en una especie para cada grupo de cultivos propuesto (5 grupos). Si la ruta metabólica es comparable en 3 grupos, no es requerido conducir en 2 adicionales.
- Se toman muestras en el momento de cosecha esperado de acuerdo a la Buena Práctica Agrícola.
- Las muestras son analizadas para la medición del Total de Residuos Radioactivos (TRR) que es expresado en mg/kg.
- Se procede a la extracción de residuos radioactivos mediante diferentes solventes.
- Elucidación del perfil metabólico (separación e identificación de metabolitos).



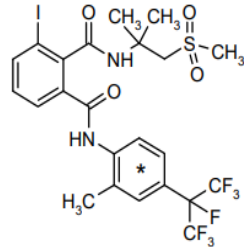
Descripción general – Estudio cultivos primarios

Ejemplo de posiciones de la marca ^{14}C en la molécula.

Flubendiamida

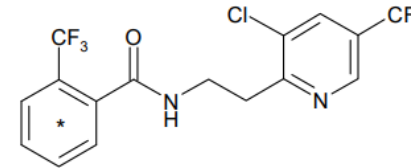


[phthalic acid ring-UL- ^{14}C] flubendiamide



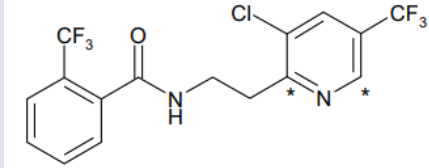
[aniline ring-UL- ^{14}C] flubendiamide

Fluopyram



* denotes position of radiolabel, uniformly labelled in the phenyl ring

[phenyl-UL- ^{14}C]-fluopyram



* denotes position of radiolabel, labelled in the 2- and 6-position of the pyridyl ring

[pyridyl-2,6- ^{14}C]-fluopyram

Los estudios de metabolismo son conducidos con sustancia test radiomarcada (preferentemente ^{14}C) para:

- Determinar el Total de Residuos Radioactivos (TRR)
- Cuantificar e identificar los metabolitos.

La marca radioactiva debe ser posicionada de manera estable para que todas las fracciones significativas puedan ser rastreadas. Así es posible determinar los metabolitos que son formados a partir de los fragmentos de la molécula, incluyendo formación de conjugados o incorporación a compuestos naturales de las plantas.

En estructuras con múltiples anillos o cadenas laterales significativas, usualmente se realizan estudios por separado si se prevé que puede ocurrir separación de esas fracciones moleculares.



Descripción general – Estudio cultivos primarios

Guía OECD/OCDE 501

ANEXO 1. Cultivos y Grupos de Cultivos para Propósito de Estudios de Metabolismo en Cultivos.

Código	Categoría	Cultivos
F	Fruta	Cítricos, nueces, pomáceas, carozos, berries, frutas pequeñas, uvas, hortalizas de fruto, banana, caqui
R	Cultivos de raíz	Hortalizas de raíz y tubérculo, hortalizas de bulbo
L	Cultivos de hoja	Hortalizas crucíferas, hortalizas de hoja, hortalizas de tallo, lúpulo, tabaco
C/G	Cultivos Cereales / gramíneas	Cereales, cultivos pastos y forraje
P/O	Legumbres y semillas oleaginosas	Hortalizas leguminosas, legumbres, semillas de oleaginosas, maní, cultivos de leguminosas forrajeras, cacao, café
-	Misceláneos	En general, cultivos no listados arriba o no cubiertos por un grupo son considerados como misceláneos y normalmente no serán aceptados como uno de los tres grupos de cultivos. Sin embargo, si se propone utilizar tal cultivo para cubrir uno de los tres grupos de cultivos debido a su importancia nacional/regional, se recomienda encarecidamente a los solicitantes consultar con las autoridades regulatorias.



TRR y Metabolitos

Total Residuos Radioactivos (TRR) es utilizado para describir la suma del compuesto original (parental compound), sus productos de degradación y metabolitos (libres o ligados).

Metabolito mayor:

OECD: $\geq 10\%$ TRR

EFSA: Origen vegetal (alimento): $\geq 10\%$ TRR y ≥ 0.01 mg/kg (o $< 10\%$ TRR amount $\geq 0,05$ mg/kg)
Origen vegetal (pienso): $\geq 10\%$ TRR y $\geq 0,01$ mg/kg

Metabolito menor:

OECD: $< 10\%$ TRR

EFSA: Origen vegetal (alimento): $< 10\%$ TRR y $< 0,05$ mg/kg
Origen vegetal (pienso): $< 10\%$ TRR



Identificación y Caracterización

Como resultado, el objetivo es la **Identificación** y **Caracterización** de al menos 90% TRR en cada matriz evaluada.

Una clara **identificación de metabolitos** en las muestras correspondientes a las partes comestibles es obligatoria para todas las marcas.

Caracterización: **características generales o naturaleza de los residuos radioactivos**. Ej.: soluble en solventes orgánicos o en agua, ácido o alcalino, no extraíble, etc. Tiempo de retención en cromatografía. Descripción según partes químicas comunes de las estructuras moleculares. (Los residuos perdidos durante los procedimientos de extracción y concentración no se definen como residuos caracterizados).

Identificación: **determinación estructural exacta de los componentes** del Total de Residuos Radioactivos (TRR). Usualmente, mediante estándares analíticos, espectrometría de masas o resonancia magnética nuclear, etc.

Todos los metabolitos mayores ($\geq 10\%$ of the TRR y > 0.01 mg/kg o $< 10\%$ TRR y ≥ 0.05 mg/kg), deben estar sujetos a una **identificación** estructural inequívoca.



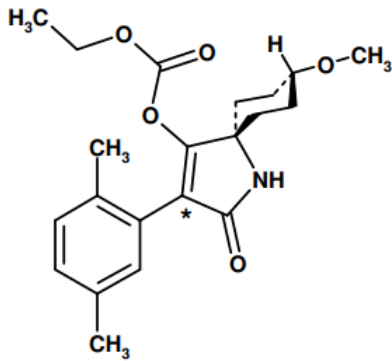
Identificación y Caracterización

Guía OECD/OCDE 501

Tabla 1. Estrategia para la identificación y caracterización de los Residuos Extraíbles de Metabolismo en Cultivos.

Cantidad Relativa (%)	Concentración (mg/kg)	Acción requerida
< 10	< 0,01	Ninguna acción si no hay preocupación toxicológica
< 10	0,01 – 0,05	Caracterizar. Solo intento de confirmar identidad si es sencillo, p. ej. , compuesto de referencia está disponible o la identificación se conoce a partir de un estudio anterior.
< 10	> 0,05	La caracterización/identificación debe decidirse caso a caso teniendo en cuenta cuánto se ha identificado.
> 10	< 0,01	Caracterizar. Solo intento de confirmar identidad si es sencillo, p. ej. , compuesto de referencia está disponible o la identificación se conoce a partir de un estudio anterior.
> 10	0,01 – 0,05	Se deben hacer intentos significativos de identificación, especialmente si es necesario para establecer una ruta, en última instancia, se podría aceptar la caracterización.
> 10	> 0,05	Identificar utilizando todos los medios posibles.
> 10	> 0,05 Radiomarcado no extraíble	Intentar la liberación de la radiactividad para una identificación más detallada.

Ejemplo: resultados estudio



[Azaspirodecenyl-3-¹⁴C]spirotetramat

- Metabolismo de [Azaspirodecenyl-3-¹⁴C]spirotetramat en manzanas.
- Aplicación por aspersion foliar.
- Dos aplicaciones de dispersion oleosa (OD 100) con dosis objetivo de 576 g ia/ha/aplicacion.
- Primera aplicacion en BBCH 69 (despues de cuaja de fruto) y segunda aplicacion 20 dias despues en BBCH 71 (caida de frutos despues de floracion).
- Muestreo 63 dias despues de la segunda aplicacion.



Table 6 Extractability of radioactive residues in apple fruits and leaves

Fraction	Apple Fruit		Apple Leaves	
	% TRR	mg/kg	% TRR	mg/kg
Dichloromethane (Surface Wash)	48.5	0.30	-	-
ACN/Water extract	49.5	0.31	94.6	34.6
Extracted Solids	2.1	0.01	5.4	1.97
Total (as sum of above)	100	0.61	100	36.6

Ejemplo: resultados estudio

Table 7 Distribution of the parent and the metabolites in apple matrices from trees treated with ¹⁴C-labeled spirotetramat at 2 × 576 g as/ha/, 63 day PHI

Metabolite Fraction	Apple Fruit		Apple Leaves	
	TRR = 0.61 mg/kg		TRR = 36.6 mg/kg	
	%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg
Organosoluble (Surface wash)	48.5	0.30	n/a	n/a
Spirotetramat (BYI08330)	48.5	0.30	ND ^a	ND
Soluble (ACN/Water phase)	49.5	0.31	94.6	34.6
Spirotetramat (parent)	2.8	0.02	72.0	26.37
BYI 08330-ketohydroxy	7.7	0.05	3.0	1.09
BYI 08330-enol	2.1	0.01	11.6	4.26
BYI 08330-mono-hydroxy	15.6	0.10	ND	ND
BYI 08330-desmethyl-ketohydroxy	3.8	0.02	ND	ND
BYI 08330-di-hydroxy	4.4	0.03	ND	ND
BYI 08330-desmethyl-ketohydroxy-glucoside (isomers), in leaves also +BYI 08330-ketohydroxy-formiate-glycoside	1.9	0.01	8.0	2.92
BYI 08330-enol-glycoside	5.1	0.03	ND	ND
Unidentified compound A1	1.4	0.01	ND	ND
Unidentified compound A3	2.2	0.01	ND	ND
Unidentified compound A4	1.2	0.01	ND	ND
Unidentified compound A5	1.2	0.01	ND	ND

^a Not detected.





Ejemplo: resultados estudio

Table 8: Characterization and identification of radioactive residues in apple matrices following target application of radiolabelled spirotetramat at 2×576 g as/ha, 63 day PHI



Compound	Apple Fruit		Apple Leaves	
	TRR = 0.61 mg/kg		TRR = 36.6 mg/kg	
	% TRR	mg/kg	% TRR	mg/kg
Spirotetramat (BYI08330)	51.3	0.32	72.0	26.4
BYI 08330-ketohydroxy	7.7	0.05	3.0	1.09
BYI 08330-enol	2.1	0.01	11.6	4.26
BYI 08330-mono-hydroxy	15.6	0.10	ND ^c	ND
BYI 08330-desmethyl-ketohydroxy	3.8	0.02	ND	ND
BYI 08330-di-hydroxy	4.4	0.03	ND	ND
BYI 08330-desmethyl-ketohydroxy-glucoside (isomers), in leaves also +BYI 08330-ketohydroxy-formiate-glycoside	1.9	0.01	8.0	2.92
BYI 08330-enol-glycoside	5.1	0.03	ND	ND
Total identified	91.9	0.57	94.6	34.6
Total characterized	6.0	0.04	ND	ND
Total extractable	98.0	0.60	94.6	34.6
Unextractable (PES) ^a	2.1	0.01	5.4	1.97
Accountability ^b	100.0	0.61	100.0	36.6

^a Residues remaining after extractions; post extraction solid.

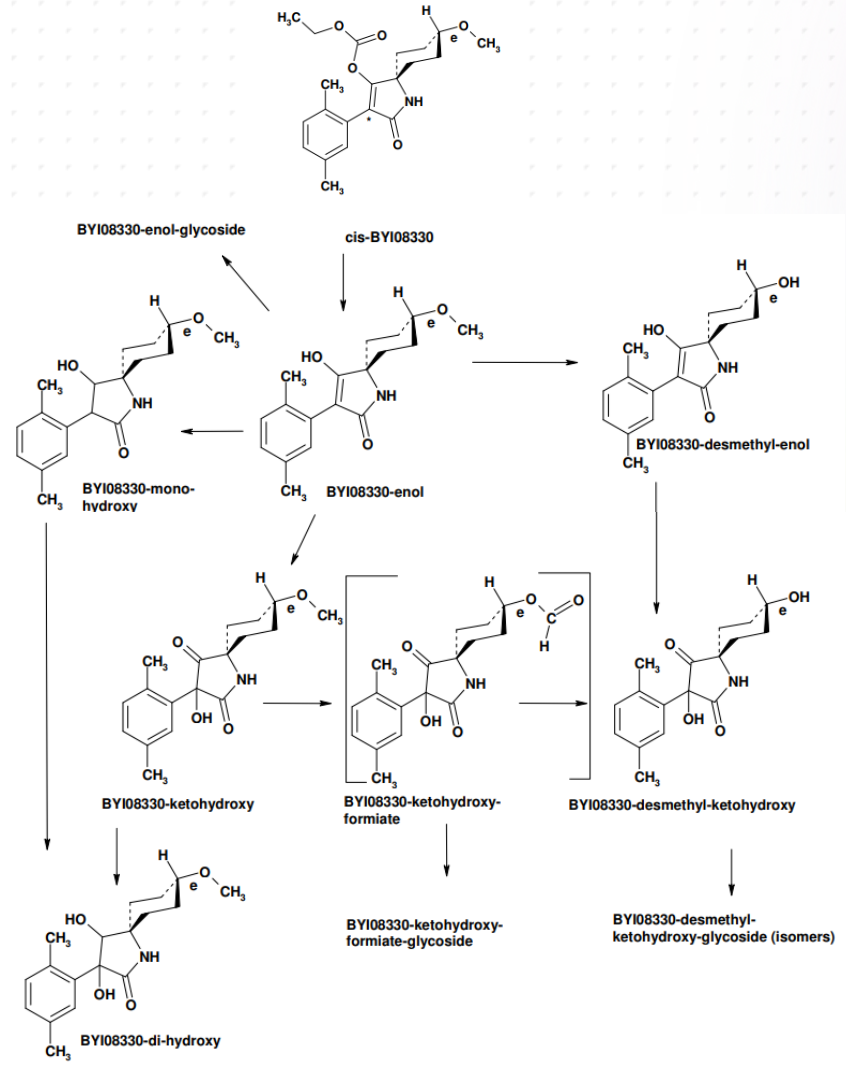
^b Accountability = (Total extractable + Total unextractable)/(TRR from combustion analysis) X 100.

^c Not detected.



Ejemplo Ruta Metabólica Propuesta

Ruta metabólica propuesta de [azaspirodecenyl-3-¹⁴C] BYI08330 en manzanos





Definiciones de Residuos (DoR)



Revisión de algunos conceptos.

Residuo de pesticida (OECD): es la combinación del agrotóxico y sus metabolitos, productos de degradación y otros productos de transformación en alimentos humanos, raciones para animales y agua potable.

Residuo de pesticida (CODEX): cualquier sustancia especificada en alimentos, productos agrícolas o piensos resultante del uso de un pesticida. El término incluye cualquier derivado de un pesticida, tal como productos de conversión, metabolitos, productos de reacción e impurezas consideradas de relevancia toxicológica.

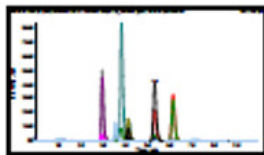
Definición de Residuos (DoR): esta terminología es utilizada para hacer referencia a los residuos empleados para finalidades de generación de datos y regulatorias. Tipos de Definiciones de Residuo.

- Definición de Residuos para Generación de Datos
- Definición de Residuos para Evaluación de Riesgo Dietético
- Definición de Residuos para establecimiento de Límite Máximo de Residuo



Definiciones de Residuos (DoR)

→ Definición de Residuos para **Generación de Datos**: asegurar que todos los componentes potencialmente relevantes son medidos en los estudios de residuos en campo



Active
substance

→ Definición de Residuos para **Evaluación de Riesgo Dietético**: para la evaluación del riesgo dietético



→ Definición de Residuos para establecimiento de **Límite Máximo de Residuo**: para establecer LMRs



Para todos aquellos analitos debe sintetizarse los estándares analíticos y desarrollar la metodología analítica junto con los estudios de estabilidad en almacenamiento.



Definiciones de Residuos (DoR)

Factores que pueden ser considerados en el proceso de definición de residuos:

- ✓ Composición y nivel de residuos encontrados en estudios de metabolismo en plantas y animales (incluyendo ratas);
- ✓ Propiedades toxicológicas de los metabolitos (incluyendo la comparación con el ingrediente activo);
- ✓ Metabolitos encontrados en estudios de procesamiento y rotación de cultivos;
- ✓ Magnitud de residuos encontrados en estudios supervisados de residuos y estudios de alimentación animal;
- ✓ Posibilidad de ocurrencia de un metabolito (y productos de degradación y transformación) común a otro pesticida;
- ✓ Disponibilidad de metodología analítica específica y practicidad de análisis por métodos analíticos regulatorios;
- ✓ Definición de residuos ya establecida por otras autoridades;
- ✓ Cuando existe presencia de residuos en alimentos de origen animal, evaluar y armonizar con casos para medicamentos veterinarios;
- ✓ La posibilidad del residuo ser una sustancia naturalmente presente.



Definiciones de Residuos (DoR)



Definición de Residuos para Evaluación de Riesgo Dietético:

El propósito es evaluar la seguridad al consumidor y por lo tanto debe incluir todos los metabolitos y compuestos de degradación de relevancia toxicológica.

Debe incluir los metabolitos que significativamente contribuyen al riesgo dietético. Dos factores deben ser considerados:

- El potencial de **exposición** (por medio de la dieta) a los consumidores
- La **toxicidad** del metabolito (relativa al ingrediente activo – parental)

OECD - mayor **probabilidad** de ser incluido en la DoR para evaluación de riesgo dietético:

- Compuesto parental es altamente tóxico.
- Metabolito/degradado probable de estar presente en alimentos para humanos.
- Niveles de metabolito/degradado en los estudios de residuo excede lo esperado a partir de los estudios de metabolismo.
- Metabolito/degradado probable de causar toxicidad a través del mismo mecanismo de acción que el compuesto parental
- Metabolismo/degradado no es formado a través del metabolismo en ratas.
- El compuesto parental no fue detectable, pero los metabolitos son encontrados en altos niveles en los estudios de metabolismo.



Definiciones de Residuos (DoR)



Definición de Residuos para Límite Máximo de Residuos:

Debe ser lo más práctica posible, idealmente basada en un solo componente como indicador o marcador del residuo significativo total.

Este marcador puede ser el compuesto original (opción preferida), un metabolito o un derivado producido en un procedimiento analítico.

Que permita el uso de una metodología analítica simple (multi residuos), de fácil implementación y costo razonable, con disponibilidad de estándares analíticos.

Mayor **probabilidad** de ser incluido en la DoR para evaluación de riesgo dietético (Metabolito Mayor):

- Método multi residuos disponible
- Concentración de metabolito es mayor que el compuesto parental
- Probable ocurrencia en alimentos para humanos
- Compuesto parental no presente; por lo tanto no es un marcador adecuado
- Niveles de metabolitos adecuados para indicar un uso incorrecto
- Compuesto parental altamente tóxico y metabolito presenta toxicidad por un mismo mecanismo de acción.



Ejemplo de Definiciones de Residuos (DoR)

Las definiciones de residuo pueden ser iguales o variar si se trata de Evaluación de Riesgo Dietético (DRA) o LMR, o bien si se trata de alimentos de origen vegetal o animal. Ejemplo CODEX:

Ingrediente Activo	DoR LMR (vegetal)	DoR DRA (vegetal)	DoR LMR (animal)	DoR DRA (animal)
Ethephon	Ethephon Exc.: para granos de cereales y paja: Ethephon y sus conjugados, expresados como ethephon	Ethephon Exc.: para granos de cereales y paja: Ethephon y sus conjugados, expresados como ethephon	Ethephon	Ethephon
Prothioconazole	Prothioconazole-desthio	Prothioconazole-desthio	Prothioconazole-desthio	Suma of prothioconazole-desthio, prothioconazole-desthio-3-hydroxy, prothioconazole-desthio-4-hydroxy y sus conjugados expresados como prothioconazole-desthio
Deltamethrin	Suma de deltamethrin y sus isómeros α -R- y trans.	Suma de deltamethrin y sus isómeros α -R- y trans.	Suma de deltamethrin y sus isómeros α -R- y trans.	Suma de deltamethrin y sus isómeros α -R- y trans.



Ejemplo de Definiciones de Residuos (DoR)

En ocasiones, las definiciones de residuo difieren entre diferentes Agencias evaluadoras.

Spirotetramat

Fuente	LMR uva (mg/kg)	Definición de Residuo (DoR) para LMR
Codex	2	Suma de Spirotetramat + 1 metabolito (-enol), expresado como Spirotetramat
Unión Europea	2	Suma de Spirotetramat + 4 metabolitos (-enol, -ketohydroxy, -monohydroxy, -enol glucosido), expresado como Spirotetramat
Estados Unidos	1,3	Suma de Spirotetramat + 4 metabolitos (-enol, -ketohydroxy, -monohydroxy, -enol glucosido), expresado como Spirotetramat

Trifloxystrobin

Fuente	LMR uva (mg/kg)	Definición de Residuo (DoR) para LMR
Codex	3	Trifloxystrobin
Unión Europea	3	Trifloxystrobin
Estados Unidos	2	Suma de Trifloxystrobin + 1 metabolito (CGA 321113), expresado como Trifloxystrobin



Consideraciones finales

- Los estudios de metabolismo entregan la base para la conducción de los estudios de residuos.
- Ambos estudios, de metabolismo y de residuos permiten concluir respecto a las moléculas (parental y/o metabolitos) de relevancia que han de ser considerados para establecer las definiciones de residuos.
- Aunque existen orientaciones en guías internacionales, el establecimiento de Definiciones de Residuos involucra una evaluación caso a caso de diversos aspectos.
- Las Definiciones de Residuo para Evaluación de Riesgo Dietético y para establecimiento de los Límites Máximos de Residuos, pueden ser iguales o diferentes dependiendo del caso.
- La Definición de Residuos es uno de los aspectos que impacta en la armonización de los Límites Máximos de Residuos a nivel mundial.



Muchas gracias por su amable
atención.

Preguntas?

Ing. Agr. Paulina Marchant
paulina.marchant@bayer.com