

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL CALLAO**  
**FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERIA QUIMICA**



**“DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO  
ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS  
BENZOILUREAS EN PESCADO Y LANGOSTINO POR  
CROMATOGRFÍA LÍQUIDA ACOPLADO A  
ESPECTROMETRÍA DE MASAS TRIPLE CUADRUPOLO EN  
EL CITEACUÍCOLA UPCH”**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
INGENIERO QUÍMICO**

**PRESENTADO POR**

**VEGA CORNELIO ROY ANGELLO**

**CALLAO – 2022**

**PERÚ**

A handwritten signature in blue ink, appearing to be the author's name, Vega Cornelio Roy Angello.

A handwritten signature in black ink, appearing to be the author's name, Vega Cornelio Roy Angello.



## PRÓLOGO DEL JURADO

La presente tesis fue sustentada por el Bachiller **VEGA CORNELIO, ROY ANGELLO** ante el **JURADO DE SUSTENTACIÓN DE TESIS** conformado por los siguientes docentes ordinarios de la Universidad Nacional del Callao:

Ing. Julio Cesar Calderon Cruz	Presidente
Ing. Cesar Gutiérrez Cuba	Secretario
Lic. Cesar Cabrera Arista	Vocal
Ing. Ricardo Rodríguez Vilchez	Asesor

Tal como está asentado en el Libro de Actas N° 02 de sustentación de tesis sin ciclo de tesis Folio N° 146 y Acta N° 327 de fecha 13 de Julio del 2022, para optar el Título profesional de Ingeniero Químico en la Modalidad de Titulación de Tesis sin Ciclo de Tesis, de conformidad establecido por el Reglamento de grados y título aprobado por Resolución de Consejo Universitario N° 099-2021- CU del 30 de Junio del 2021.

## **DEDICATORIA**

A Dios, por guiarme y mantenerme de pie cuándo más lo necesitaba.

A mis padres, Porfirio Vega Azaña y Mery Cornelio Salas por siempre brindarme su apoyo incondicional en éste camino.

A mis Hermanos, Sebastian Vega Cornelio, Valerie Vega Cornelio y Martin Vega Riveros por ser el motor y motivo de mi perseverancia.

A mis Tíos: Juan Ramirez Perez, Percy Cornelio Salas, Angel Cornelio Salas y Angel Obregon Vargas porque desde el cielo están apoyándome como siempre lo hicieron.

A mi Abuelo Pedro Vega Ventura porque desde su partida, su recuerdo me ayudó a perseverar en la finalización de ésta tesis.

A toda mi familia por enseñarme a siempre estar unida a pesar de las adversidades y los momentos más complicados.

## **AGRADECIMIENTO**

Al Centro de Innovación Productiva y Transferencia Tecnológica Privado Acuícola de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (CITEacuícola UPCH) por brindarme sus instalaciones y el financiamiento económico para el desarrollo de la Tesis. Además, un agradecimiento a Alex Alcántara Rubira Encargado del Laboratorio de Control de Calidad y Seguridad Alimentaria (LACCSA) en el periodo que estuve realizando la tesis, por ser un co-asesor, guía y compartirme sus conocimientos en el transcurso del desarrollo de la tesis hasta su finalización, además, porque me brindó su apoyo a nivel personal y profesional.

A la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional del Callao, que, en conjunto con su plana de docentes, me formaron profesionalmente y brindaron los conocimientos necesarios para aplicarlos en el campo industrial.

Al Ing. Rodriguez Vilchez Ricardo por su tiempo, apoyo y asesoramiento durante el periodo del desarrollo de la Tesis y siempre estar al pendiente de todo el proceso.

A las personas que me acompañaron, aportaron y dejaron huella en este camino largo y exhaustivo que tuve.

# ÍNDICE

	Pág.
<b>TABLA DE CONTENIDOS</b>	3
<b>RESUMEN</b>	7
<b>ABSTRACT</b>	8
<b>INTRODUCCIÓN</b>	9
<b>I PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	11
1.1 Descripción de la realidad problemática	11
1.2 Formulación del problema de investigación	12
1.2.1 Problema general	12
1.2.2 Problemas específicos	12
1.3 Objetivos de la investigación	13
1.3.1 Objetivo general	13
1.3.2 Objetivos específicos	13
1.4 Limitantes de la investigación	13
1.4.1 Limitación Teórica	13
1.4.2 Limitación Temporal	13
1.4.3 Limitación espacial	13
<b>II MARCO TEORICO</b>	14
2.1 Antecedentes	14
2.1.1 Antecedentes Internacionales	14
2.1.2 Antecedentes Nacionales	18
2.2 Bases teóricas	19
2.2.1 Bases legales nacionales	19
2.2.2 Bases legales internacionales	19
2.2.3 Pesticidas en el sector acuícola y su clasificación	20
2.2.4 Pesticidas y su clasificación	21
2.2.5 El sector acuícola en el Perú	23
2.2.6 Sanidad en el Sector acuícola	24
2.2.7 Validación de un método analítico	26
2.2.8 Parámetros de Validación	28
2.3 Marco conceptual	33
2.4 Definición de términos básicos	34

<b>III</b>	<b>HIPÓTESIS Y VARIABLES</b>	36
3.1	Hipótesis	36
3.1.1	Hipótesis general	36
3.1.2	Hipótesis específicas	36
3.2	Definición conceptual de variables	36
3.2.1	Operacionalización de variables	37
<b>IV</b>	<b>DISEÑO METODOLÓGICO</b>	38
4.1	Tipo y diseño de investigación	38
4.2	Método de investigación	38
4.3	Población y muestra	41
4.3.1	Población	41
4.3.2	Muestra	41
4.4	Lugar de estudio y periodo desarrollado	41
4.5	Técnica e instrumentos para la recolección de datos	41
4.6	Análisis y procesamiento de datos	59
<b>V</b>	<b>RESULTADOS</b>	60
5.1	Resultados descriptivos	60
5.2	Resultados inferenciales	82
5.3	Otro tipo de resultados estadísticos, de acuerdo a la naturaleza del problema y la Hipótesis.	82
<b>VI</b>	<b>DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b>	83
6.1	Contrastación y demostración de la hipótesis con los resultados	83
6.2	Contrastación de los resultados con otros estudios similares	100
6.3	Responsabilidad ética de acuerdo con los reglamentos vigentes	101
<b>VII</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	102
<b>VIII</b>	<b>RECOMENDACIONES</b>	103
<b>IX</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	104
<b>X</b>	<b>ANEXOS</b>	108

# TABLA DE CONTENIDOS

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
<b>Tabla 1</b> Propiedades fisicoquímicas del Teflubenzuron	22
<b>Tabla 2</b> Propiedades fisicoquímicas del Diflubenzuron	23
<b>Tabla 3</b> Cosecha por especie proveniente de la acuicultura, 2019 en toneladas métricas	24
<b>Tabla 4</b> Límites máximos residuales (LMR) para el Diflubenzuron y Teflubenzuron	25
<b>Tabla 5</b> Lista de plaguicidas indicando sus límites máximos permisibles para la acuicultura	26
<b>Tabla 6</b> Criterios de los parámetros de Validación	30
<b>Tabla 7</b> Operacionalización de variables	37
<b>Tabla 8</b> Instrumentos y Equipos	42
<b>Tabla 9</b> Materiales de trabajo	44
<b>Tabla 10</b> Solventes para la determinación de Pesticidas Benzoilureas	44
<b>Tabla 11</b> Reactivos para la Determinación de Pesticidas Benzoilureas	45
<b>Tabla 12</b> Estándares de Pesticidas Benzoilureas	45
<b>Tabla 13</b> Curva de calibración del Diflubenzuron y Teflubenzuron.	48
<b>Tabla 14</b> Condiciones de LC para el análisis de Diflubenzuron y Teflubenzuron	51
<b>Tabla 15</b> Parámetros de la fuente para un sistema I-CLASS-Xevo-TQXS UPLC-MS/MS (Waters)	52
<b>Tabla 16</b> Condiciones de fragmentación para un sistema I-CLASS-Xevo-TQXS UPLC-MS/MS (Waters).	52
<b>Tabla 17</b> Diseño factorial para el proceso de extracción de pesticidas benzoilureas en Trucha	53
<b>Tabla 18</b> Diseño factorial para el proceso de extracción de pesticidas benzoilureas en Langostino	53
<b>Tabla 19</b> Combinaciones para el análisis de Robustez.	57
<b>Tabla 20</b> Combinaciones para el análisis de Robustez.	58
<b>Tabla 21</b> Resultados para el diseño experimental del método de extracción de pesticidas Benzoilureas en Trucha arcoíris.	60
<b>Tabla 22</b> Resultados para el diseño experimental del método de extracción de pesticidas Benzoilureas en Langostino.	61
<b>Tabla 23</b> Lectura de los blancos fortificados para el cálculo del LD y LC para el Diflubenzuron y Teflubenzuron en Trucha Arcoíris.	64
<b>Tabla 24</b> Estimación del LD y LC del Método al 99% de confianza – Trucha Arcoíris.	65
<b>Tabla 25</b> Límite de detección y del Límite de cuantificación calculado para el Diflubenzuron y Teflubenzuron en la matriz Trucha Arcoíris.	65
<b>Tabla 26</b> Lectura de los blancos fortificados para el cálculo del LD y LC del Diflubenzuron y Teflubenzuron en Langostino.	66
<b>Tabla 27</b> Estimación del LD y LC del Método al 99% de confianza – Langostino.	66

<b>Tabla 28</b>	Límite de detección y del Límite de cuantificación calculado del Diflubenzuron y Teflubenzuron en la matriz Langostino.	67
<b>Tabla 29</b>	Curvas de calibración en 3 días diferentes para el Diflubenzuron.	68
<b>Tabla 30</b>	Análisis regresión y análisis de varianza para el Diflubenzuron.	69
<b>Tabla 31</b>	Análisis de regresión y análisis de varianza para el Teflubenzuron.	70
<b>Tabla 32</b>	Rango de trabajo del método para el Diflubenzuron y Teflubenzuron.	71
<b>Tabla 33</b>	Resultados del % Recuperación del DFB respecto a los tres niveles de fortificación en Trucha.	71
<b>Tabla 34</b>	Resultados del % Recuperación del TFB respecto a los tres niveles de fortificación en Trucha.	72
<b>Tabla 35</b>	Resultados del % Recuperación del DFB respecto a los tres niveles de fortificación en Langostino.	73
<b>Tabla 36</b>	Resultados del % Recuperación del TFB respecto a los tres niveles de fortificación en Langostino.	74
<b>Tabla 37</b>	RSDr experimental del DFB y TFB para la precisión en Trucha Arcoíris.	76
<b>Tabla 38</b>	RSDr experimental del DFB y TFB para la precisión en Langostino.	76
<b>Tabla 39</b>	Resultados de los ensayos para la Robustez del DFB y TFB en Trucha Arcoíris.	77
<b>Tabla 40</b>	Cálculo de la diferencia de respuesta para cada parámetro de la robustez en Trucha Arcoíris.	78
<b>Tabla 41</b>	Resultados de los ensayos para la Robustez del DFB y TFB en Langostino.	78
<b>Tabla 42</b>	Cálculo de la diferencia de respuesta para cada parámetro de la robustez en Langostino.	79
<b>Tabla 43</b>	Criterio de aceptación del LDM para el DFB y TFB en Trucha arcoíris.	85
<b>Tabla 44</b>	Criterio de aceptación del LDM para el DFB y TFB en Trucha arcoíris.	85
<b>Tabla 45</b>	Cálculo del Z-score para el Diflubenzuron en trucha y en los tres niveles de fortificación.	92
<b>Tabla 46</b>	Cálculo del Z-score para el Teflubenzuron en trucha y en los tres niveles de fortificación.	93
<b>Tabla 47</b>	Cálculo del Z-score para el Diflubenzuron en Langostino y en los tres niveles de fortificación.	94
<b>Tabla 48</b>	Cálculo del Z-score para el Teflubenzuron en Langostino y en los tres niveles de fortificación.	95

# ÍNDICE DE GRÁFICOS

	Pág.
<b>Gráfico 1</b> Resultados del % de recuperación del DFB y TFB en Trucha arcoíris para las pruebas de extracción.	83
<b>Gráfico 2</b> Resultados del % de recuperación del DFB y TFB en Langostino para las pruebas de extracción.	84
<b>Gráfico 3</b> Regresión lineal para el Diflubenzuron	86
<b>Gráfico 4</b> Regresión lineal para el Teflubenzuron	86
<b>Gráfico 5</b> Porcentaje de Recuperación del DFB en los tres niveles de fortificación para Trucha arcoíris.	88
<b>Gráfico 6</b> Porcentaje de Recuperación del TFB en los tres niveles de fortificación para Trucha arcoíris.	88
<b>Gráfico 7</b> Porcentaje de Recuperación del DFB en los tres niveles de fortificación para Langostino.	89
<b>Gráfico 8</b> Porcentaje de Recuperación del TFB en los tres niveles de fortificación para Langostino.	89
<b>Gráfico 9</b> Prueba de normalidad Anderson-Darling para el Diflubenzuron en Trucha arcoíris.	90
<b>Gráfico 10</b> Prueba de normalidad Anderson-Darling para el Teflubenzuron en Trucha arcoíris.	91
<b>Gráfico 11</b> Prueba de normalidad Anderson-Darling para el Diflubenzuron en Langostino.	91
<b>Gráfico 12</b> Prueba de normalidad Anderson-Darling para el Teflubenzuron en Langostino.	92
<b>Gráfico 13</b> Comparación del RSDexperimental en los 3 niveles de fortificación para el DFB y TFB en Trucha arcoíris.	97
<b>Gráfico 14</b> Comparación del RSDexperimental en los 3 niveles de fortificación para el DFB y TFB en Langostino.	97
<b>Gráfico 15</b> Robustez del Diflubenzuron en Trucha arcoíris.	98
<b>Gráfico 16</b> Robustez del Teflubenzuron en Trucha arcoíris.	99
<b>Gráfico 17</b> Robustez del Diflubenzuron en Langostino.	99
<b>Gráfico 18</b> Robustez del Diflubenzuron en Langostino.	100

# ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1</b> Proceso del planteamiento y validación de un método de ensayo	29
<b>Figura 2</b> Diseño de la Investigación	39
<b>Figura 3</b> Diseño Experimental	40
<b>Figura 4</b> Homogenizado de la Matriz Trucha	42
<b>Figura 5</b> Fases Móviles para pesticidas Benzoilúreas	46
<b>Figura 6</b> Estándares de trabajo de Diflubenzuron y Teflubenzuron.	47
<b>Figura 7</b> Propuesta del Diagrama de Flujo del proceso de extracción de Pesticidas Benzoilureas según el análisis factorial.	50
<b>Figura 8</b> Fuentes principales de incertidumbre para la determinación de pesticidas benzoilureas.	59
<b>Figura 9</b> Cromatograma del estándar mix de Diflubenzuron y Teflubenzuron.	61
<b>Figura 10</b> Cromatograma de la muestra blanco matriz-Trucha Arcoíris.	62
<b>Figura 11</b> Cromatograma de la muestra blanco matriz de Trucha Arcoíris más la fortificación (spiked) del estándar mix de Diflubenzuron y Teflubenzuron.	62
<b>Figura 12</b> Cromatograma del estándar mix de Diflubenzuron y Teflubenzuron.	63
<b>Figura 13</b> Cromatograma de la muestra blanco matriz-Langostino.	63
<b>Figura 14</b> Cromatograma de la muestra blanco de matriz de Langostino más la fortificación (spiked) del estándar mix de Diflubenzuron y Teflubenzuron.	64
<b>Figura 15</b> Factores de la Robustez en Trucha Arcoíris y Langostino.	77

## RESUMEN

En los últimos años, el control de los residuos de pesticidas, veterinarios y otros agentes contaminantes en productos acuícolas ha sido más riguroso debido al incremento de consumo per cápita de productos marinos a nivel mundial, por esta razón la Food and drugs administration (FDA) solicita métodos de ensayo para la determinación y control de éstos agentes contaminantes.

La presente investigación está enfocada en el desarrollo y validación de un método de ensayo para la determinación de pesticidas benzoilúreas en matrices de pescado Trucha arcoíris y Langostino por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas triple cuadrupolo, utilizando un equipo Waters ACQUITY I-CLASS XEVO TQ-XS. El desarrollo de la metodología consistió en la extracción del Diflubenzuron y Teflubenzuron utilizando Acetonitrilo y una extracción sólida en fase dispersa con amina primaria secundaria (PSA), C18 y NaCl, obteniendo porcentajes de recuperación aceptables dentro del criterio propuesto por el documento N° SANTE 12682/2019.

Así mismo, la validación del método según la Directriz para la validación de métodos de ensayo DA-acr-20D de la NTP ISO/IEC 17025:2017 se llevó a cabo mediante 10 parámetros de validación de Selectividad/Especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad, rango de trabajo, veracidad, precisión en términos de repetibilidad intermedia, robustez e incertidumbre, logrando demostrar estadísticamente que el método cumple con todos los parámetros de validación mencionados y que los resultados emitidos son confiables, veraces y precisos.

**Palabras claves:** Validación, pesticidas benzoilúreas, parámetros de validación, extracción de pesticidas, cromatografía líquida.

## ABSTRACT

In the last years, the control of pesticide residues, veterinary and other contaminating agents in aquaculture products has been more rigorous due to the increase in per capita consumption of marine products worldwide, for this reason the Food and drugs administration (FDA) requests test methods for the determination and control of these contaminating agents.

This research is focused on the development and validation of a test method for the determination of benzoylurea pesticides in rainbow trout and shrimp fish matrices by liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry, using a Waters ACQUITY I-CLASS XEVO TQ-XS equipment. The development of the methodology consisted in the extraction of Diflubenzuron and Teflubenzuron using Acetonitrile and a solid extraction in dispersed phase with primary secondary amine (PSA), C18 and NaCl, obtaining acceptable recovery percentages within the criteria proposed by document N° SANTE 12682 /2019.

Likewise, the validation of the method according to the Guideline for the validation of DA-acr-20D test methods of the NTP ISO / IEC 17025: 2017 was carried out through 10 validation parameters of Selectivity / Specificity, limit of detection, limit of quantification, linearity, working range, veracity, precision in terms of intermediate repeatability, robustness and uncertainty, being able to statistically demonstrate that the method complies with all the mentioned validation parameters and that the results issued are reliable, truthful and precise.

**Keywords:** Validation, benzoylurea pesticides, validation parameters, pesticide extraction, liquid chromatography.

## INTRODUCCIÓN

La producción y el consumo de pescado a nivel mundial en el sector acuícola han incrementado notablemente, manifestándose con un nuevo récord de producción histórico de 114,5 millones de toneladas de peso expresadas en un valor total de venta de 363 600 millones de USD. Además, se observa que la tasa media anual de crecimiento de consumo de pescado comestible en el periodo de 1961 – 2017 incrementó un 3,1%. Los valores per cápita de consumo de pescado indican que en el año de 1961 al 2017 aumentó de 9,0 Kg a 20,3 Kg respectivamente. Así mismo, la situación per cápita de consumo de pescado actual es de 20,5 Kg. (FAO, 2020)

La actividad pesquera en el Perú es muy importante y conocida, logrando así un crecimiento rápido, pero en pocas especies como trucha, langostinos, pectinidos amazónicos y tilapia en regiones como Puno, Tumbes, Áncash, Piura, Huancavelica, entre otros. Es así como en los últimos años la producción en el sector acuícola en los últimos años ha ido creciendo desde 6 000 toneladas anuales en el 1993 hasta 100 000 toneladas en el 2018 y proyectándose a una producción de 200 000 toneladas para el año 2025. (Christian B., 2020). Según el Ministerio de la producción (PRODUCE) destacó que en el periodo 2013 – 2019, el consumo per cápita de productos hidrobiológicos (pescado fresco, congelado, enlatado y mariscos) aumentó de 14,6 Kg en el 2013 a 17,4 Kg en el 2019, lo que representa un aumento del 2,8 Kg en dicho periodo, para lo cual se busca alcanzar en el año 2025 un consumo per cápita de 27,6 Kg establecida por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. (FAO)

El uso de plaguicidas a través de la historia ha sido muy frecuente para el control de plagas y/o enfermedades. Éstos han llegado hasta una producción mundial de tres millones de toneladas anuales debido a su alta eficiencia en control de plagas, sin embargo, indirectamente afecta al sector acuícola y a sus productos marinos porque algunos pesticidas y sobre todo los pesticidas organoclorados (POC) son moléculas donde su principal característica es presentar propiedades lipofílicas y debido a esto, su degradación puede llegar a ser demasiado

persistente y resistente, teniendo como vida media en humanos aproximadamente de 10 años. Las prácticas de éstos agentes tóxicos en el sector marino, la acuicultura y piscifactorías, pueden traer consigo consecuencias graves de no ser controlado y supervisado, produciendo efectos ecológicos como: muerte del organismo marino, cáncer, tumores y lesiones en peces y animales, inhibición o fracaso productivo, daños celulares y en el ADN; así como posibles repercusiones contra la salud humana como oncológica, pulmonar, hematológica y deficiencia del sistema inmunitario. (Codex Alimentarius, 2020).

Por lo tanto, los productos acuícolas no se encuentran exentos a la exposición de pesticidas, por lo que se ve en la necesidad de contar con técnicas analíticas y equipo sofisticados para certificar la inocuidad de los mismos. Por tal motivo, el presente trabajo de investigación, desarrollará y validará una metodología que garantice la determinación de pesticidas con resultados confiables, respaldados estadísticamente con parámetros de veracidad, precisión, selectividad/especificidad, rango de trabajo, linealidad, Límite de detección, Límite de cuantificación, incertidumbre y Robustez.

# **I PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

## **1.1 Descripción de la realidad problemática**

En los últimos años, el consumo per cápita de Kg de pescado por persona ha ido aumentando de 9,9 Kg promedio de consumo de pescado en 1960 a 19,7 Kg promedio de consumo de pescado en el 2013, estimando actualmente a más de 20 Kg de consumo de pescado per cápita; un ejemplo claro es Corea del Sur que, según la ONU, su consumo per cápita de pescado es de 58,4 Kg Sin embargo, a causa de diversos contaminantes como: Medicamentos veterinarios, metales pesados, pesticidas y otros agentes químicos existen efectos indeseables para la salud. (Dasom S. et al., 2021)

Los plaguicidas son los agentes químicos más usados a nivel mundial, llegando a una producción promedio de tres millones de toneladas anuales debido a su alta eficiencia en control de plagas, favoreciendo a los productos agroindustriales. Pero, por otro lado, perjudica indirectamente al medio ambiente presentando un riesgo para el ecosistema y la salud humana. Es por esto que se presentan diversas medidas regulatorias y además se establecieron estándares de calidad (EQS). (Barbieri M. et al., 2019)

Hoy en día la preocupación de la ciencia ambiental es la contaminación de las aguas superficiales o sedimentos, determinando, que una de las principales causantes son las actividades agrícolas, generando un impacto a la salud de los peces en centros acuícolas o piscifactorías además de la acumulación de éstos plaguicidas en los tejidos comestibles de productos orgánicos marinos produciendo un riesgo potencial para la salud humana. (Angélique L. et al., 2011)

Es casi seguro que en diferentes países se promueva el uso de los medicamentos, pesticidas o agentes químicos en acuícolas y piscifactorías sin que su regulación y supervisión sea exigente debido a la falta de recursos para la determinación de éstos agentes, es por eso que la FDA (Food and Drugs Administration) de EE.UU requiere métodos para una variedad de especies marinas que se puedan utilizar para la determinación de éstos agentes y así proteger a los consumidores contra los residuos inseguros. (Shani S. et al., 2009)

Por ello, técnicas tradicionales como HPLC, UPLC–MS/MS y debido a su amplio rango de polaridad de plaguicidas y su detección directa de analitos en varias matrices son adecuadas para éste caso, como, por ejemplo, residuos de pesticidas, carbamatos, organofosforados y pesticidas piretroides. (Dasom S. et al., 2021)

En la actualidad el uso de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem con triple cuadrupolo LC–MS/MS es adecuado para la determinación de pesticidas de tipo organoclorados y especialmente para metabolitos y productos de transformación que a menudo suelen ser mucho más polares que el compuesto original. Su alta sensibilidad y selectividad hacen que el equipo LC-MS/MS sea considerado una técnica poderosa. (Borja G. et al., 2019)

El método QueChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged & Safe) parecía ser una forma correcta de extracción de pesticidas para matrices complejas. Sin embargo, se demostró que no era tan efectivo para algunas matrices, es por eso que el método necesitaba modificaciones dependiendo de la matriz y de las investigaciones que se hagan sobre ella, especialmente en pescados con mayor contenido graso porque éstos podrían contener residuos polares y no polares, por esta razón la cromatografía Líquida (LC) acoplada a masa es una opción idónea para poder determinar una amplia gama de pesticidas, desde compuestos pocos volátiles hasta compuestos polares medios-altos. (Angélique L. et al., 2011)

## **1.2 Formulación del problema de investigación**

### **1.2.1 Problema general**

¿Cómo se validará el desarrollo de un método de ensayo para la determinación de pesticidas Benzoilúreas en pescado y langostino por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa LC–MS/MS, según la NTP ISO/IEC 17025:2017 para el laboratorio de control de calidad y de seguridad alimentaria del CITEacuícola?

### **1.2.2 Problemas específicos**

- a) ¿Cuáles serían las condiciones fisicoquímicas apropiadas de la metodología para una extracción de pesticidas Benzoilúreas eficiente?

- b) ¿Cuáles son las condiciones de análisis instrumentales del método de ensayo que se desarrollará en el laboratorio de control de calidad y seguridad alimentaria?

### **1.3 Objetivos de la investigación**

#### **1.3.1 Objetivo general**

Validar el desarrollo de un método analítico según NTP ISO/IEC 17025:2017 para el laboratorio de control de calidad y seguridad alimentaria del CITEacuícola UPCH, para la determinación de pesticidas Benzoilúreas en pescado y langostino por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas triple cuadrupolo.

#### **1.3.2 Objetivos específicos**

- 1) Desarrollar un método de ensayo eficiente para la extracción de pesticidas Benzoilúreas en pescado y langostino.
- 2) Establecer las condiciones de análisis instrumentales óptimas del LC-MS/MS para la determinación de los pesticidas Benzoilúreas en pescado y langostino.

### **1.4 Limitantes de la investigación**

#### **1.4.1 Limitación Teórica**

Durante el desarrollo de la investigación, se limitó a encontrar referencias bibliográficas nacionales semejantes a la Tesis. Caso contrario sucedió con Referencias bibliográficas internacionales y artículos, donde sí se pudo encontrar bibliografías semejantes.

#### **1.4.2 Limitación Temporal**

No hubo limitación temporal, debida a que el desarrollo y validación de la metodología estaba dentro del plazo máximo de ejecución. Además, mi persona estuvo a tiempo completo en el desarrollo de la investigación.

#### **1.4.3 Limitación espacial**

La investigación se limita a sólo ser replicada y usada en el laboratorio de control de calidad y seguridad alimentaria del CITEacuícola UPCH porque la validación y el desarrollo se realizaron a las condiciones del laboratorio.

## **II MARCO TEORICO**

### **2.1 Antecedentes**

#### **2.1.1 Antecedentes Internacionales**

Carro, A., García, D., Gonzales, P., y Lorenzo, R., (2012), en su artículo de investigación “Determinación de agentes quimioterapéuticos en pescados y mariscos mediante dispersión en fase sólida de matriz y espectrometría de masas en tándem de cromatografía líquida” desarrollan y validan un método simple y rápido para la determinación y monitoreo de ocho pesticidas, de las cuales entre ellos se destaca 2 pesticidas del tipo Benzoilúreas (teflubenzuron y diflubenzuron) en 8 peces y mariscos, las que fueron: berberechos, mejillones, rodaballo, panga, almejas, vieiras y dos muestras de salmón. Así mismo, el método se desarrolló a través de MSPD con sulfato de sodio anhidro y C18 como dispersante y sílice como adsorbente. Además, de la evaluación de la linealidad usando patrones de matriz aplicados a un rango de 5 a 500 g/Kg obteniéndose buena linealidad para todos los fármacos y con un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) superiores a 0,996; la repetibilidad del método evaluando seis muestras repetidas en el mismo día obteniéndose % RSD de 2,2 a 6,3, exactitud del método estudiando la recuperación donde en promedio fue de 103,4% en un intervalo del 95,5% al 114,2% y la precisión mediante cuatro muestras repetidas.

Shin, D., Kim, J., y Kang, H., (2021), en su artículo “Determinación simultánea de residuos de pesticidas múltiples en peces y camarones mediante extracción en fase sólida dispersiva con cromatografía líquida y espectrometría de masas en tándem” desarrollaron y optimizaron un método analítico para la determinación de 66 multi-residuos de pesticidas en 6 diferentes tipos de productos pesqueros (peces y camarones) mediante LC- MS/MS y donde se detectaron seis compuestos de los 66 pesticidas presentes en los productos pesqueros. Las muestras se trataron por el procedimiento QuEChERS modificado (Quick, Easy, Cheap, effective, Rugged and Safe) mediante solventes para la extracción de los residuos y precipitación de las proteínas y la adición de sales para aumentar las fuerzas iónicas de la fase acuosa y aumentar la recuperación. Además, se evaluaron siete parámetros para la validación: La Selectividad, debido a la ausencia de una señal por encima de la relación

señal/ruido de tres en los tiempos de retención de los compuestos objetivo indicó que no hay interferencia en el análisis de la muestra; La Linealidad, se obtuvo un  $R^2 > 0,98$  para todos los compuestos; La exactitud, se evaluó en base a la recuperación la cual oscilaron entre 70% a 125%; La precisión, representado por el RSD, donde todos los pesticidas fueron inferiores al 20%; el LOD (límite de detección), obteniendo como resultado  $< 5 \mu\text{g/Kg}$ ; El LOQ (Límite de cuantificación), obteniendo como resultado  $< 10 \mu\text{g/Kg}$ ; El efecto matriz, observándose efectos de mejora y supresión de la señal en los compuestos diana, organizándolos en cinco grupos: Supresión de señal alta (ME  $< -50\%$ ), Supresión moderada (ME  $< -10\%$  a  $-50\%$ ), sin efecto matriz (ME  $> -10\%$  a  $< 10\%$ ), mejora de señal moderada (ME  $> 10$  a  $< 50\%$ ) y mejora de señal alta (ME  $> 50\%$ )

Garlito, B., Ibáñez, M., Portolés, T., Serrano, R., Amlund, H., Lundebye, A., Sanden, M., Berntssen, M., y Hernández, F., (2019), en su trabajo de investigación "LC-MS/MS method of the determination of organophosphorus pesticides and their metabolites in salmon and zebrafish fed with plant-based feed ingredients" desarrollan un método analítico para la cuantificación de pesticidas organofosforados (Pirimifos-Metilo y Clorpirifos-Metilo) y sus dos principales metabolitos en pez cebra y también en músculo, bilis, riñón, grasa e hígado de salmón, realizándose el cribado LC-TOF de hígado, riñón y músculo de salmón con el fin de analizar posibles metabolitos y el análisis por LC-MS/MS de músculo de pez cebra o salmón y para grasa. Se aplicó un método analítico rápido, moderno y sensible para la extracción de pesticidas organofosforados, las cuales fueron con Acetonitrilo: acetona en medio ácido. Se realizó una validación cuantitativa, evaluando los parámetros siguientes: Linealidad, donde se inyectaron 10 estándares de referencia en un rango de 0,025 a 25 ng/ml resultando los coeficientes de correlación  $R^2$  superiores a 0,99 y residuos menores al 20%; La Veracidad, se evaluó en términos de recuperación analizando tres concentraciones, y para las muestras que no tenían matrices blanco se analizaban en sus muestras con bajas contaminaciones resultando recuperaciones de 72% a 106% para PM y recuperaciones de 71% a 112% para CLP-M; La Precisión, se evaluó en términos de desviación estándar relativo

(RSD), resultando esto para “PM y sus metabolitos” un  $RSD \leq 16$  y para “CLP–M y TCP” con un  $RSD \leq 12\%$ ; LOQ, se evaluó como la concentración más baja validada satisfactoriamente, resultando  $1 \mu\text{g/Kg}$  para PM y sus metabolitos,  $10 \mu\text{g/Kg}$  para CLP–M y TP; LOD donde se evaluó con la concentración del analito que produjo relación de señal/ruido de tres del cromatograma en la fortificación más pequeña; la especificidad se evaluó con la ausencia de picos interferentes en los tiempos de retención y el efecto matriz.

Choi S., Kim S., Shin J., Kim M., y Kim J., (2014), en su artículo publicado en la *Journal Food Chemistry* bajo la denominación de “Development and verification for analysis of pesticides in eggs and egg products using QuEChERS and LC-MS/MS” desarrollan y validan una metodología para la determinación de 18 residuos de pesticidas en huevos y productos de huevos, donde el Diflubenzuron es uno de los residuos de pesticidas determinado por una separación cromatográfica HPLC Agilent 1200. Se obtuvo buenas recuperaciones usando la metodología QuEChERS con una extracción con acetonitrilo-ácido y adicionalmente se le agregó un kit de extracción conformada por sulfato de magnesio y acetato de sodio para luego pasar por una limpieza por d–SPE (dispersive Solid Phase Extraction) que consistía en amina primaria secundaria, C18 y negro de humo grafitizado (GCB). Para la validación del método se basaron en la directriz SANCO/12495/2011. La exactitud (con recuperaciones entre 70% a 120%) y precisión ( $RSD < 20\%$ ) resultaron dentro de los parámetros establecidos, las cuales se realizaron adiciones a tres concentraciones de 10, 20 y 50 ng/g, resultando recuperaciones que varían entre 80% a 108% para 10 ng/g 72% a 101% para 20 ng/g y 72 a 89% para 50 ng/g y con respecto a los RSD obtenidos fueron de 2% al 13%, 35% al 12% y 5% al 12% respectivamente para cada adición. Para el caso del Diflubenzuron se obtuvo un Límite de detección de  $0.553 \text{ ng/g}$  y un Límite de cuantificación de  $1.674 \text{ ng/g}$ . Para la Linealidad, se obtuvo una regresión lineal con un coeficiente de correlación  $r^2 > 0.98$  para todos los compuestos.

Así mismo Lazartigues, A., Wiest, L., Baudot, R., Thomas, M., Feidt, C., y Cren–Olivé, C., (2011), en su artículo “Método de residuos múltiples para cuantificar pesticidas en músculo de pescado mediante extracción basada por

QueChERS y LC–MS/MS” cuyo objetivo del trabajo fue el desarrollo de un método para la determinación de 13 pesticidas (azoxistrobina, clomazona, diflufenican, dimetacloro, carbendazima, iprodión, isoproturón, mesosulfuron–metil, metazacloro, napropamida, quizalofop y thifensulfuron–metil) en 3 diferentes peces: Carpa (*Cyprinus carpio*), Cucaracha (*Rutilus rutilus*), Perca (*Perca fluviatilis*). Cuya metodología se basó en una homogenización de la muestra por ultra–turrax a una velocidad media que fue acoplada al método QueChERS modificada. En éste estudio se utilizó el método estándar EN 15662 que utiliza sales de acetonitrilo y citrato para obtener una extracción óptima, además se usó hexano para purificar y eliminar los lípidos de las muestras lo que condujo a recuperaciones satisfactorias. Se evaluaron siete parámetros para el desempeño de la validación del método: La exactitud, la cual se determinó como la recuperación enriqueciendo las muestras por triplicado con una mezcla de analitos a 50 µg/L (diflufenican–d<sub>3</sub>, carbendazim–d<sub>4</sub> e isoproturon–d<sub>3</sub>) y haciendo una comparación entre la muestra extraída enriquecida y las muestras de pescado en blanco enriquecidas con la misma concentración después de la extracción; La especificidad, se determinó mediante el análisis de tres muestras de pescado en blanco mediante el método después de la extracción y se determinó que no hay interferencias en el tiempo de retención del analito; La precisión se evaluó en términos de reproducibilidad y repetibilidad expresadas como la desviación estándar relativa RSD % donde los resultados fueron menores para las tres especies diferentes 28% (análisis intradiario – repetibilidad) y 29% (análisis interdiario – reproducibilidad); La linealidad, obteniéndose un buen ajuste de  $R^2 > 0,99$ ; LOQ, estableciéndose por debajo de 1ng/g excepto en algunos analitos; LOD, de igual manera que el LOQ; El efecto matriz, donde se observaron fuertes efectos de supresión de la señal porque se tuvo que compensar este efecto matriz y así evitar cualquier subestimación o sobreestimación de pesticidas, se utilizó una calibración matriz emparejada en 8 puntos.

### 2.1.2 Antecedentes Nacionales

Campos, C., y Palacios, A., (2010), en su Tesis de Pregrado Titulada “Determinación por HPLC de residuos de insecticida organofosforado (Methamidophos) en tomates comercializados en Lima-Perú”, realizando una investigación en 25 muestras de tomates de centros comerciales aledañas a la zona, mediante la técnica de cromatografía en Capa Fina (CCF) mediante RF y por HPLC mediante los tiempos de retención (TR). La extracción se realizó con una mezcla de Hexano: Acetona por 5 minutos y éter etílico por 5 minutos adicionales.

Chirinos, P. (2019), en su Tesis de pregrado denominada “Evaluación de residuos del pesticida clorpirifos en semillas de quinua (*Chenopodium quinoa* W.) Por cromatografía gaseosa), desarrolló un método de extracción con Acetato de etilo por 35 minutos, así mismo, se usaron cartuchos C18 con el fin de limpiar la muestra para luego usar la técnica GC-ECD. La validación del método se realizó en términos de: Selectividad, con comparaciones de muestra de quinua en blanco y fortificado con 0.025ppm de plaguicida; Linealidad, mediante 5 niveles de concentración de 0.005, 0.025, 0.05, 0.075 y 0.1 mg/Kg; Exactitud, se calculó en términos de recuperaciones mediante fortificaciones en tres niveles de 0.025, 0.05 y 0.1 ppm usando como referencia el SANTE/11945/2017; Precisión, en términos de precisión intermedia; Límite de detección y cuantificación, se calculó como 3.3 y 10 veces la desviación estándar respectivamente.

Huarca, E. (2019), con su tema de pregrado “Análisis de la residualidad de plaguicidas en el cultivo de brócoli (*Brassica Oleracea*) mediante HPLC (cromatografía Líquida) para las zonas de Sachaca y Cayma del Departamento de Arequipa”, desarrollando un método de extracción en dos etapas, la primera con Acetonitrilo y la segunda con extracción sólida en fase dispersa de  $MgSO_4$  + Citrato de sodio, para luego hacer una inyección al equipo HPLC. La Validación del método consistió en Linealidad, mediante 5 niveles de concentración de 0.1, 0.21, 0.41, 0.61, 0.81 y 1.01 mg/L obteniéndose un coeficiente de determinación de 0.9969; Precisión, en términos de desviación estándar; exactitud, en términos de % recuperación y obteniéndose un promedio de 93.59%; Límite de detección y cuantificación, obteniéndose 0.06335 mg/L y 0.03011 mg/L respectivamente.

## 2.2 Bases teóricas

### 2.2.1 Bases legales nacionales

- a) **Ley N°30063 – Ley de Creación del Organismo Nacional de Sanidad Pesquera (SANIPES).**- En tu **Art. 1 Objeto de la ley**; describe que SANIPES es el organismo encargado de garantizar la inocuidad en toda la cadena productiva de origen hidrobiológico como los piensos, así como la del sector pesquero y acuícola, aportando al fortalecimiento de la autoridad sanitaria y pesquera, y adquiriendo una mayor competitividad tanto en lo técnico como en lo científico a fines de salvaguardar la vida y la salud pública.
- b) **Decreto supremo N° 012–2012–PRODUCE – Reglamento de la Ley N°30063, Ley de Creación del Organismo Nacional de Sanidad Pesquera (SANIPES).** - Describe disposiciones generales de la ley, Funciones del organismo nacional de SANIPES, de las entidades de apoyo y de la participación de otras instituciones, organismos de gobierno y otros.
- c) **Procedimiento: Control de residuos de Medicamentos Veterinarios, Sustancias Prohibidas y Plaguicidas en la Acuicultura PR–DSANIPES/CSMAA–02.**- Describe principalmente el control y la vigilancia de presencia de residuos de medicamentos veterinarios, sustancias prohibidas, plaguicidas y metales pesados en la acuicultura. Además, adjunta una tabla sobre los límites máximos permisibles de sustancias químicas en la acuicultura.

### 2.2.2 Bases legales internacionales

- a) **Directiva 96/23/CE del consejo de 29 de abril de 1996 – Relativa las medidas de control aplicables respecto de determinadas sustancias y sus residuos en los animales vivos y sus productos y por las que se derogan las Directivas 85/358/CEE y 86/469/CEE y las Decisiones 89/187/CEE y 91/664/CEE – Consejo de la Unión Europea.**- Describe las medidas de control, planes de vigilancia para la detección de residuos o sustancias, Autocontrol y corresponsabilidad de los operadores, controles oficiales, Medidas que deberán tomarse en caso de infracción, importaciones procedentes de países terceros y algunas disposiciones generales.

- b) Directrices para el uso de la espectrometría de masas (EM) en la identificación, confirmación y determinación cuantitativa de residuos CAC/GL 56 – 2005 – CODEX ALIMENTARIUS
- c) Directrices sobre buenas prácticas de laboratorio en el análisis de residuos de plaguicidas CAC/GL 40–1993 – CODEX ALIMENTARIUS
- d) Directrices sobre criterios de rendimiento para métodos de análisis para la determinación de residuos de plaguicidas en los alimentos y los piensos CXG 90–2017 – CODEX ALIMENTARIUS.
- e) CPG Sec. 575.100 Pesticides Chemical Residues in food – Enforcement criteria (CPG 7141.01), en donde se estipulan los niveles de acción para residuos químicos de plaguicidas inevitables en alimentos.

### **2.2.3 Pesticidas en el sector acuícola y su clasificación**

En el manual sobre la elaboración y uso de las especificaciones de plaguicidas de la FAO y la OMS en su tercera revisión de la primera edición, definen el término pesticida o su equivalente a plaguicida como “aquellos ingredientes activos en cualquier forma, independiente o en el grado en el que hayan sido formuladas para su aplicación, y asocia usualmente a materiales destinados a matar o controlar plagas (insecticidas, fungicidas, herbicidas, entre otros). Así mismo, también pueden controlar el comportamiento o la fisiología de las plagas y controlar la fisiología o comportamiento de los cultivos, durante la producción o almacenamiento”

De igual manera la Organización Mundial de la Salud, define a los Pesticidas o Plaguicidas, como “cualquier sustancia o mezcla de sustancias, microorganismos incluyendo virus destinados a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo los vectores de enfermedades humanas o de los animales, plagas molestas, las especies de plantas o animales indeseables que causan perjuicio o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte, o comercialización de alimentos, productos agrícolas, maderas y productos de madera o alimentos para animales o que pueden administrarse a los animales para combatir insectos, arácnidos u otras plagas en o sobre sus cuerpos”.

## **2.2.4 Pesticidas y su clasificación**

Según su composición química los pesticidas se clasifican en diversos grupos, entre las principales tenemos: carbamato, organofosforados, organoclorados, ciclodieno organoclorados, peritroides, benzoilureas, avemectín, tiocarbamatos, triazinas, arsenicales, dinitrocompuestos, entre otros.

El enfoque de la presente investigación se basará en los pesticidas Benzoilureas, específicamente en el Diflubenzuron y Teflubenzuron:

### **a) Pesticidas Benzoilúreas**

Son aquellos inhibidores de la biosíntesis de quitina, la cual inhiben la formación normal del esqueleto de los insectos, provocando una malformación de la cutícula del insecto y de la deshidratación, por lo que ocasionan la muerte de los organismos. Sin embargo, se desconoce la lesión bioquímica exacta. Dentro de éste grupo encontramos al Teflubenzuron, diflubenzuron, Nocaluron, Hexaflumurón, etc.

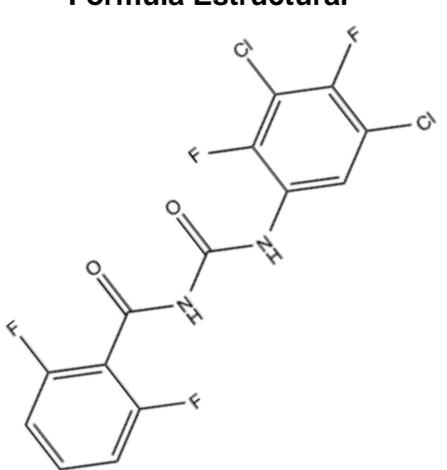
Existe una estimación que los plaguicidas Benzoilúreas presentes en los piensos para peces, un 10% se adhieren a éstos y el 90% son excretados por las heces

#### **1) Teflubenzuron**

En el atlántico es utilizado para los tratamientos de piojos de mar para la especie de salmón. Además, controla las plagas de polilla en manzanas, minadores de hojas, orugas en árboles frutales, soja, algodón entre otros. El teflubenzuron es un insecticida del tipo acilurea con dos tipos de empleos, la primera como un medicamento veterinario para controlar los piojos de mar en pescado salmón, y la segunda como pesticida, la cual controla plagas de insectos de modo que luego de su ingestión inhibe la síntesis de quitina en la cutícula. (FAO/WHO, 2015)

En la Tabla 1 (Ver p. N° 22) se muestran las características fisicoquímicas del Teflubenzuron.

**Tabla 1***Propiedades fisicoquímicas del Teflubenzuron*

<b>TEFLUBENZURON</b>		
<b>Fórmula Estructural</b> 	<b>Peso Molecular</b>	381,1 g/mol
	<b>Fórmula Molecular</b>	C <sub>14</sub> H <sub>6</sub> C <sub>12</sub> F <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
	<b>CAS</b>	83121-18-0
	<b>Ingrediente activo puro</b>	Teflubenzuron (pureza >95%)
	<b>Apariencia</b>	Sólido cristalino de color blanco a blanquecino
	<b>Punto de fusión</b>	222,5°C
	<b>Solubilidad en Agua</b>	0,6 g/L a 20°C
	<b>Solubilidad en Acetonitrilo</b>	1,1 g/L a 20°C
	<b>Solubilidad en Diclorometano</b>	1,8 g/L a 20°C
	<b>Solubilidad en Metanol</b>	1,8 g/L a 20°C

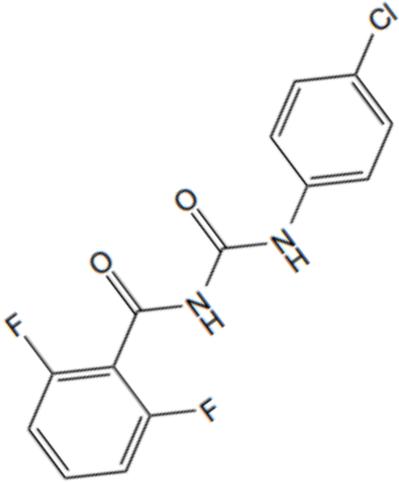
*Datos extraídos de Monograph Residue – Teflubenzurón, 81st Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) meeting, (2015).*

## 2) Diflubenzuron

Es utilizado en diversos campos, desde la agricultura, horticultura y silvicultura, hasta como medicamento veterinario en el tratamiento de piojos de mar. Actúa como un interferente de la síntesis de la quitina. En la muda durante la etapa de crecimiento de los insectos es mayor la demanda de la síntesis de quitina, por eso que los parásitos mueren al interferirlo. (FAO/WHO, 2015)

En la Tabla 2 (Ver p. N° 23) se muestran las características fisicoquímicas del diflubenzuron.

**Tabla 2***Propiedades fisicoquímicas del Diflubenzuron*

<b>DIFLUBENZURON</b>		
<b>Fórmula Estructural</b>	<b>Peso Molecular</b>	310,7 g/mol
	<b>Fórmula Molecular</b>	C <sub>14</sub> H <sub>9</sub> ClF <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
	<b>CAS</b>	35367-38-5
	<b>Ingrediente activo puro</b>	Diflubenzuron (pureza >95%)
	<b>Apariencia</b>	Sólido cristalino blanco
	<b>Punto de fusión</b>	228°C
	<b>Solubilidad en Agua</b>	0,08 g/L a 20°C en pH 7
	<b>Solubilidad en Acetonitrilo</b>	2,0 g/L
	<b>Solubilidad en Acetona</b>	6,5 g/L
	<b>Solubilidad en Metanol</b>	1,8 g/L
	<b>Solubilidad en n-hexano</b>	0,063 g/L

*Datos extraídos de Monograph Residue – Diflubenzurón, 81st Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) meeting, (2015).*

### 2.2.5 El sector acuícola en el Perú

La acuicultura en el Perú es una actividad que puede llegar a ser un rubro muy importante para el país debido a las condiciones marítimas que posee el Perú. En los últimos años, las proyecciones de crecimiento en la acuicultura han sido de manera positiva destacando departamentos donde ya se han convertido en focos de producción acuícola del país como es el caso de Tumbes (mayor actividad acuícola en el cultivo de langostinos blancos), Piura y anchas (cultivo de conchas de abanico), San Martín y Piura (cultivo de tilapia), Puno (principal cultivo de trucha arcoíris), entre otros.

Tal y como se observa por los diversos departamentos del Perú con mayor producción de especies marinos, actualmente la Acuicultura del Perú se orienta a la producción de: Langostino blanco, concha de abanico, Trucha arcoíris, tilapia

y algunas especies de las amazonas como la gamitana, el paco y el paiche. En la Tabla 3 se presenta las principales especies de producción en el Perú.

**Tabla 3**

*Cosecha por especie proveniente de la acuicultura, 2019 en toneladas métricas*

<b>Nº</b>	<b>Especie</b>	<b>Cosecha (TM)</b>	<b>Porcentaje</b>
<b>1</b>	Trucha	48 753,7	35%
<b>2</b>	Tilapia	1 930,8	1%
<b>3</b>	Concha de abanico	56 654,6	41%
<b>4</b>	Langostinos	26 942,8	20%
<b>5</b>	Otras	3 475,4	3%
	<b>TOTAL</b>	<b>137 757,3</b>	<b>100%</b>

*Extraída del Informe de la subdirección de la Sanidad Acuícola 2017-2019, PRODUCE, (2020).*

### **2.2.6 Sanidad en el Sector acuícola**

En las proyecciones realizadas por las FAO, se estima un aumento de producción de la acuicultura de 54 000 miles de toneladas entre los años de 1997 y 2030, así como una proyección del consumo per cápita con un aumento de 19 a 21 Kg hasta el año 2030, estando actualmente en unos 16 Kg per cápita.

En el Perú se está estimando un consumo per cápita de consumo de productos hidrobiológicos de 30 Kg en los próximos cuatro años, estando actualmente en 16,8 Kg per cápita.

Es debido a esto, que poder salvaguardar la integridad humana y la de los propios animales brindando un protocolo de sanidad para los productos hidrobiológicos es de suma importancia.

Los plaguicidas son tóxicos por exposición a corto o largo plazo para los animales hidrobiológicos debido que presentan una alta sensibilidad, llegando a presentar muchas veces neurotoxicidad, mutagénesis, carcinogenia y actividad hormonal. Sin embargo, el uso clandestino y no regulado puede llegar a ocasionar problemas de enfermedad no sólo para las especies hidrobiológicas sino también para la salud humana.

Debido a esto la FAO en trabajo conjunta con la OMS realizan evaluaciones de riesgo para la salud humana a fin de garantizar que el suministro de alimentos sea seguro, posterior a esto, el comité del códex de residuos de

plaguicidas es el encargado de establecer los límites máximos de residuos de plaguicidas, las cuales son apreciables en el índice de plaguicidas del CODEX ALIMENTARIUS.

Así mismo, en la monografía sobre residuos por la reunión del comité Mixto FAO/OMS de Expertos en aditivos Alimentarios (JECFA), 81<sup>ava</sup> reunión del 2015, se establecen los Límites de Residuos Máximos (MRL) recomendado para el Teflubenzuron y el Diflubenzuron:

- a) Teflubenzuron → MRL de 500 µg/Kg en músculo y tejido de Salmón.
- b) Diflubenzuron → MRL de 1000 µg/Kg en músculo de Salmón

De igual manera el reglamento de la Unión Europea (UE) N° 37/2010 de la comisión de 22 de diciembre de 2009, relativo a las sustancias farmacológicamente activas y su clasificación por lo que se refiere a los límites máximos de residuos en los productos alimenticios de origen animal, nos brinda información del Diflubenzuron y Teflubenzuron en salmónidos, tal y como se observa en la Tabla 4.

**Tabla 4**

*Límites máximos residuales (LMR) para el Diflubenzuron y Teflubenzuron*

<b>Categoría</b>	<b>Principio Activo</b>	<b>Residuos</b>	<b>Especies</b>	<b>Tejido</b>	<b>LMR (µg/Kg)</b>
Agente Antiparasitario	Diflubenzuron	Diflubenzuron	Salmón /trucha	Músculo y piel	1 000
Agente Antiparasitario	Teflubenzuron	Teflubenzuron	Salmón	Músculo y piel	500

*Extraído del Reglamento de la Unión Europea N° 37/2010, (2016).*

Así mismo, en el Perú, existe el procedimiento de control de residuos de medicamentos, sustancias prohibidas y plaguicidas en la acuicultura del SANIPES, determina una lista de sustancias químicas con sus límites máximos permisibles para la acuicultura, entre ellas están las sustancias prohibidas, Medicamentos veterinarios, plaguicidas y Metales pesados, descritos en la Tabla 5 (Ver p. N° 26).

**Tabla 5**

*Lista de plaguicidas indicando sus límites máximos permisibles para la acuicultura*

<b>Plaguicida</b>	<b>LMP(ppm)</b>	<b>Plaguicida</b>	<b>LMP(ppm)</b>	<b>Plaguicida</b>	<b>LMP(ppm)</b>
<b>2,4-Dc</b>	1,0	DDT	0,04	Mirex	0,1
<b>Aldrin</b>	0,01	Diquat	0,1	PCB's	2,0
<b>Clordano</b>	0,02	Heptacloro	0,01	TDE	0,04
<b>DDE</b>	0,04	Heptacloro Epóxico	0,01		

*PR-DSANIPES/CSMAA-02 Procedimiento: Control de residuos de medicamentos veterinarios, sustancias prohibidas y plaguicidas en la acuicultura, (2008).*

### **2.2.7 Validación de un método analítico**

#### **a) ¿Qué es la validación de un método?**

- 1) Según la ISO/IEC 17025 define a la validación como la confirmación, a través del examen y aportación de evidencias objetivas, que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto.
- 2) La decisión de la comisión (2002), por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados, define a la validación como los criterios relativos que cumple un método analítico y sus características de funcionamiento aplicables.
- 3) En las Directrices sobre las buenas prácticas de laboratorio en el análisis de residuos de plaguicidas CAC/GL 40-1993, define a la validación de un método como el proceso que establece la capacidad de cumplir una finalidad prevista, la cual puede desenvolverse internamente, extraerse de alguna literatura o sujetarse de terceros por cualquier medio. Posteriormente podrá estar sujeto a modificación o adaptación, según sea los requerimientos, capacidades y propósitos del laboratorio a las cuales sea utilizado. Por lo general la validación se realiza posterior de haber definido y desarrollado bien el método analítico. Así mismo, en la directriz menciona que el analista debe decidir el grado de validación del método, la cual debe ser necesario para determinar que el método sea

idóneo para cumplir la finalidad prevista y producir consecuentemente los datos de validación necesarios.

- 4) Validar un método es un proceso de confirmación de un método de que cuenta con capacidades consistentes para las aplicaciones requeridas. (Eurachem, 2016)

**b) ¿Por qué es necesario validar un método?**- En un trabajo de rutina existen miles de pruebas que se realizan diariamente a nivel mundial y en diferentes laboratorios como análisis de agua potables, análisis de la composición de una aleación de metal o la composición de un agente químico en muestra orgánica, entre otros; todo esto se realiza con la finalidad de confirmar la idoneidad de lo que el cliente quiere analizar, es debido a esto que de alguna u otra manera la sociedad se apoya en los trabajos analíticos desarrollados cotidianamente. La emisión de resultados errados o ensayos que demuestren incongruencias como la presencia de alguna sustancia tóxica en algún alimento sin que realmente exista, esto puede llegar a ocasionar indemnizaciones, sanciones económicas o encarcelamiento o hasta incluso sanciones realmente graves. Es por esta razón que existe la necesidad de los laboratorios en realizar el desarrollo de un método con una correcta medición capaz de demostrar que el resultado es impecable y además de demostrar el grado de conocimiento técnico y brindar la confianza al cliente con resultados confiables.

**c) Proceso de validación de un método.** – La directriz para la validación de métodos de ensayo DA-acr-20D de la NTP ISO/IEC 17025:2017 establece el procedimiento para el planteamiento y validación de métodos de ensayo descritos en la Figura 1 (Ver p. N° 29).

Así mismo como parte del proceso de validación, la comisión de la decisión de la comunidad europea establece dos tipos de enfoques:

- 1) Conjunto de características comunes de funcionamiento, independiente del modelo de validación empleado
- 2) Procedimientos más específicos que dependen del modelo

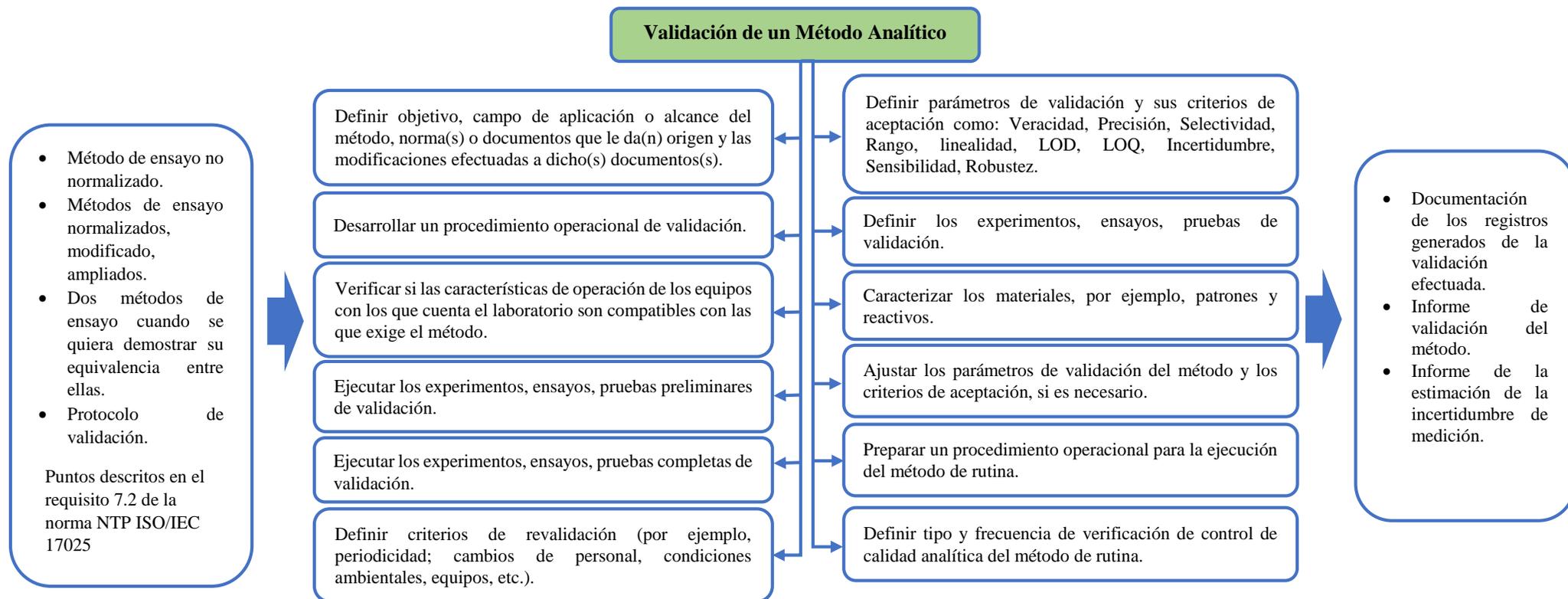
## 2.2.8 Parámetros de Validación

a) **Selectividad-Especificidad.** - Para la directriz 14-DA-acr-20D ver.00- Directriz para la validación de métodos de ensayo de la NTP ISO/IEC 17025:2017, lo señala como la determinación particular de un analito dentro de una muestra compleja sin poder ser presentar interferencia alguna por otros analitos presentes en la muestra o matriz. Además, la directriz CAC/GL 40–1993 del Códex Alimentarius y la Eurachem, define a la selectividad como el grado de probabilidad en el que el analito se pueda distinguir de otros componentes dentro de una muestra o matriz ya sea por separación o respuesta de detección del sistema, y a la especificidad como la medida en que un método proporciona una respuesta por parte del sistema en el que se consideran propias y exclusivas del analito de estudio.

Así mismo, la AEFI 2001 – validación de métodos señala que para ensayos separativos como el HPLC no es suficiente con mostrar sólo el tiempo de retención, sino que además se necesitaría de una técnica adecuada complementaria como por ejemplo Espectrometría de masas (MS), la cual confirmaría la selectividad del método a validar. Por otro lado, también señala que para comprobar la selectividad del método es necesario comparar resultados del análisis con y sin analito.

**Figura 1**

*Proceso del planteamiento y validación de un método de ensayo*



*Directriz DA-acr-20D de la NTP ISO/IEC 17025:2017, (2017).*

En la Tabla 6, se estipula los criterios de aceptación de los parámetros de validación en pesticidas, planteado por la SANTE/12682/2019 de la Unión europea.

**Tabla 6**

Criterios de los parámetros de Validación

PARAMETER	WHAT/HOW	CRITERION
<b>LOQ</b>	Lowest spike level meeting the method performance criteria for trueness and precision	≤ MRL
<b>Trueness (bias)</b>	Average recovery for each spike level tested	70-120 %
<b>Precision (RSD<sub>r</sub>)</b>	Repeatability RSD <sub>r</sub> for each spike level tested	≤ 20%
<b>Precision (RSD<sub>wR</sub>)</b>	Within-laboratory reproducibility, derived from on-going method validation / verification	≤ 20%
<b>Robustness</b>	Average recovery and RSD <sub>wR</sub> , derived from on-going method validation / verification	See SANTE/2019/12682

*Extraídos del: Document N° SANTE/2019/12682 with respect to the previous version (document N° SANTE/2017/11813), Analytical Quality Control and Method Validation procedures for Pesticides Residues Analysis in Food and Feed, (2019).*

**b) Límite de Detección (LOD).** - La Eurachem define como, dentro de un nivel de confianza determinado existe una concentración más baja del analito que puede ser detectada. Así mismo, la Directriz DA-acr-20D ver00 de la NTP ISO/IEC 17025:2017, lo señala como la concentración menor e una analito que puede ser detectada pero no necesariamente ésta puede ser cuantificada.

El límite de detección del método está determinado por la siguiente ecuación (1):

$$LDM = t_{(n-1,1-\alpha)} \times (s) \dots (1)$$

Donde:

- t: T-student a un determinado nivel de confianza y grados de libertad.
- S: Desviación estándar del conjunto de datos.

**c) Límite de Cuantificación (LOQ).** - Es la concentración más baja del analito de estudio la cual puede ser determinada a un nivel de precisión, repetibilidad y veracidad. Así mismo la Eurachem (2016), lo define como 10 veces (se pueden usar otros valores como 5 o 6) la desviación estándar estimado en muestras blanco o muestras de ensayo que tengan una baja concentración de analito. Para la Directriz DA-acr-20D de la NTP ISO/IEC 17025:2017 lo determina como la menor concentración cuantificable y además tenga aceptabilidad en precisión y exactitud.

**d) Linealidad.** - Es la representación gráfica de los datos obtenidos por la regresión lineal de las respuestas a las concentraciones en un conjunto de calibración. Una buena regresión implica la obtención de un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) aproximado a 1 Sin embargo, no siempre es consecuente, debido a que esto da lugar a concentraciones más elevadas, por lo que se podría considerar un factor ponderado como  $1/x$  o  $1/x^2$  para poder minimizar el impacto en concentraciones relativos o bajos. (Codex Alimentarius CXG 90, 2017). De igual manera, la directriz DA-acr-20D de la ISO 17025:2017 comenta que cuándo la linealidad no sea posible, se deberá encontrar un algoritmo adecuado.

Para efectos de cálculo, la linealidad es la capacidad de un método analítico de proporcionar un resultado directamente proporcional a la señal obtenida por el sistema de cuantificación.

Si la ecuación es lineal, la ecuación de la recta viene dada por la ecuación (2):

$$Y = ax + b \dots (2)$$

Donde:

- Y: Respuesta medida (Absorbancia, altura o área del pico, etc)
- X: Concentración
- a: Inclinación de la curva de calibración, sensibilidad.
- b: Intersecto dela curva con el eje y.

**e) Veracidad.** - No es una magnitud y mucho menos se expresa numéricamente. La exactitud es la obtención de un mínimo error de medida o la proximidad entre los valores medidos propios atribuidos al mensurando.

(VIM, 2012). LA DA-acr-20D, indica que debe de existir un grado de concordancia entre un valor aceptado como referencia y el valor medio producto de una serie de resultados.

Así mismo, la Eurachem lo define como la proximidad de un único resultado a un valor de referencia. Éste valor de referencia puede ser una muestra fortificada a una concentración deseada y expresarlo como porcentaje de recuperación (R%) como indica en la ecuación (3)

$$R\% = \frac{Q_{hallada} - Q_{original}}{Q_{añadida}} \dots (3)$$

Donde,  $Q_{hallada}$  es la cantidad de analito recuperado luego de procesar la muestra,  $Q_{original}$  es la cantidad de analito que se encuentra al inicio antes de procesar la muestra y  $Q_{añadida}$  es la cantidad de analito conocido u original. Para aplicar criterio de veracidad para pesticidas ver Tabla 6 (Ver p. N° 30).

**f) Precisión.** - Es una medida de cuán cerca están los resultados entre sí. La precisión se puede determinar en términos de Reproducibilidad o Repetibilidad. (Eurachem, 2016)

**1) La Repetibilidad.** - Es la más pequeña variación entre los resultados, así mismo es la medida de la variabilidad que expresan los resultados cuando es llevado a cabo por un solo analista en las mismas condiciones, las cuales incluyen mismo procedimiento de determinación, el mismo instrumento de medición con las mismas condiciones, mismo lugar y bajo repeticiones en periodos cortos de tiempo.

**2) La Reproducibilidad.** - Es la mayor variación de resultados, así mismo es la medida de la variabilidad de los resultados entre laboratorios. Además, se realiza bajo condiciones variables como observador o analista, diferente instrumento de medición, diferentes condiciones, diferentes patrones de referencia, tiempo.

**3) Desviación estándar (RSD).** – La desviación estándar de Repetibilidad ( $RSD_r$ ) y la desviación estándar de reproducibilidad ( $RSD_R$ ) sirven como un parámetro para evaluar esencialmente la repetibilidad y reproducibilidad de un método con respecto a un grupo de condiciones establecida. Así mismo, evalúa tolerancias permitidas de valores declarados. En el documento N° SANTE/2019/12682 con algunos

cambios respecto a la versión anterior (Documento N° **SANTE/2017/11813**) – Analytical Quality Control and Method Validation procedures for Pesticides Residues Analysis in Food and Feed, establece que para condiciones de repetibilidad para, un RSD<sub>r</sub> consistente debe ser <20%, ver Tabla 6 (Ver p. N° 30).

**g) Robustez.** - La robustez de un procedimiento analítico es la capacidad de permanecer no afectado por las variaciones mínimas permitidas de los parámetros del método. Además, indica la fiabilidad del método durante el uso rutina. (Eurachem, 2016)

Es la resistencia al cambio de los resultados obtenidos mediante pequeñas variaciones al método, algunos actores que pueden influir en la obtención de que un método cuente con una buena robustez son los cambios de instrumentos, concentración de un reactivo, pH de una solución, Temperatura de reacción, entre otras. (Codex Alimentarius CXG 90, 2017)

**h) Incertidumbre.**- Según la Guía para la expresión de la incertidumbre de medida 2008 (3<sup>ra</sup> Edición en esp. 2009) – Anexo D – D.5.2, la incertidumbre de medida, “es una expresión del hecho de que, para un mensurando y un resultado de medida del mismo datos, no existe un único valor, sino un infinito número de valores dispersos en torno al resultado, que son compatibles con todas las observaciones, datos y conocimientos que se poseen del mundo físico, y que, con diferentes grados de credibilidad, pueden ser atribuidos al mensurando”.

### **2.3 Marco conceptual**

El Diflubenzuron y Teflubenzuron son pesticidas con alto grado de contaminación en los productos acuícolas por poseer propiedades lipofílicas, derivando indirectamente al consumo humano, por esta razón la regulación internacional mediante lo límites máximos de residuos de plaguicidas presentada por la unión europea y el Codex Alimentario en la industria acuícola es de suma importancia porque nos ayudará a tener una referencian normativa para su regulación. Sin embargo, se necesita poseer un equipo y técnica adecuada para la cuantificación de éstos plaguicidas.

Los laboratorios de ensayo proponen técnicas para la determinación de estos plaguicidas con el fin de brindar un servicio. Así mismo, para poder

desenmascarar estos pesticidas de la matriz en estudio se necesitan métodos de extracción adecuados y propios del laboratorio para su posterior cuantificación mediante un equipo instrumental. Sin embargo, no todo resultado es completamente confiable. El laboratorio necesita demostrar estadísticamente mediante evidencias que los resultados que emiten en un informe de ensayo son confiables, precisos y veraces. Estas evidencias estadísticas se logran mediante la validación del método de ensayo para la determinación de los analitos en estudio (en nuestro caso los pesticidas benzoilúreas).

La validación del método de ensayo consiste en la determinación de parámetros de validación, dependiendo de la necesidad del método, tales como la Selectividad/Especificidad, Límite de detección, Límite de cuantificación, Linealidad, Rango de trabajo, Veracidad, Precisión, Robustez e Incertidumbre, las cuales se rigen bajo criterios de aceptación. Cabe resaltar que la validación de métodos de ensayo es un requisito obligatorio para la acreditación de un método de ensayo según la NTP ISO/IEC 17025:2017, dando un plus adicional que el método de ensayo emite con certeza resultados confiables, precisos y veraces.

Por lo tanto, el desarrollo y validación de un método analítico para la determinación de pesticidas benzoilúreas en pescado y langostino por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas triple cuadrupolo, ayudará al laboratorio de control de calidad y seguridad alimentaria del CITEacuícola UPCH a que los resultados emitidos sean confiables, precisos y veraces además de estar respaldados estadísticamente.

#### **2.4 Definición de términos básicos**

- a) Pienso.** – Es la porción de alimento seco que se da al ganado. La palabra pienso se refiere a productos de alimentación de los animales.
- b) Piscifactoría.** – Instalación donde se crían diversas especies de peces y mariscos con fines comerciales. Lugar donde se producen pececillos en masa año tras año para distribuirlos a los criaderos.

- c) **Verificación del método.** – Según la ISO 9000, lo define como, la confirmación, a través de la aportación de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos especificados.
- d) **Protocolo de validación.** – Es un plan escrito que indica cómo la validación será conducida, incluyendo los parámetros de prueba. Las características del producto, equipo de fabricación, y productos de decisión en lo que constituye un resultado de prueba aceptable.
- e) **Cromatografía líquida.** – Es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla. Consiste en una fase estacionaria no polar (Columna) y na fase móvil.
- f) **Espectrometría de masas.** – Es una técnica de análisis cualitativo, está basada en la obtención de iones a partir de moléculas orgánicas en fase gaseosa; una vez obtenidos estos iones, se separan de acuerdo a su masa y su carga, y finalmente se detectan por medio de un dispositivo adecuado.
- g) **Elución isocrática.** – solvente de composición constante.
- h) **Matriz.** – Es aquel material que contiene o no el analito de interés.
- i) **Metabolitos.** – Son productos de la degradación parcial o total de las materias activas.
- j) **Biota.** – Se define como el conjunto de especies de plantas, animales y otros organismos que habitan un área determinada.
- k) **FAO.** – Organización de las Naciones Unidad para la Alimentación y la Agricultura.
- l) **SANIPES.** – Organismos Nacional de Sanidad Pesquera
- m) **UPCH.** – Universidad Peruana Cayetano Heredia

### III HIPÓTESIS Y VARIABLES

#### 3.1 Hipótesis

##### 3.1.1 Hipótesis general

La validación del desarrollo de un método analítico para la determinación de pesticidas benzoilúreas realiza una eficiente extracción del Diflubenzuron y Teflubenzuron y cumple con todos los parámetros de validación según la NTP ISO/IEC 17025:2017.

##### 3.1.2 Hipótesis específicas

- a) El desarrollo del método analítico realiza una extracción de pesticidas Benzoilúreas en términos de %recuperación del 70% al 120%.
- b) Las condiciones de análisis instrumentales del LC-MS/MS para la determinación de pesticidas Benzoilúreas son satisfactorias para realizar lecturas confiables, precisas y veraces.

#### 3.2 Definición conceptual de variables

##### a) Variables independientes

- **$X_1$  = Extracción de pesticidas benzoilúreas**

Parámetros físicos que son influyentes para una mayor extracción de pesticidas Benzoilúreas.

- **$X_2$  = Condiciones de análisis instrumentales para la determinación de pesticidas benzoilúreas**

La determinación de pesticidas, es la obtención de la concentración de los analitos y se realiza por LC – MS/MS, donde las condiciones de análisis del espectrómetro de masas y las condiciones cromatográficas necesitan ser optimizados, lo que servirán para lograr un nivel máximo de sensibilidad de análisis.

##### b) Variable dependiente

- **$Y = F(X_1, X_2)$  = Desarrollo y validación de un método analítico**

La validación de un método es la demostración, a través de pruebas para que el método sea suficientemente confiable para producir un resultado previsto dentro de un alcance definido.

### 3.2.1 Operacionalización de variables

**Tabla 7**

*Operacionalización de variables*

VARIABLES DEPENDIENTES	DEFINICIÓN DE LAS VARIABLES	Y = (X1, X2)		INDICADORES	MÉTODOS
			DIMENSIONES		
F (x) = Desarrollo Y Validación de un método analítico	La validación de un método es la demostración, a través de pruebas para que el método sea suficientemente confiable para producir un resultado previsto dentro de un alcance definido	Y1 = Selectividad-Especificidad Y2 = Límite de detección (LOD) Y3 = Límite de cuantificación (LOD) Y4 = Rango y linealidad Y5 = Veracidad Y6 = Precisión Y7 = Robustez Y8 = Incertidumbre		Libre de interferentes LODcal < Bk-fortificado < 10 x LODcal LOQ = 10 x DS R <sup>2</sup> ≥ 0.98 % Recuperación RSDr (experimental) < RSDr (referencia) Efecto $ V_A  \geq (\text{Raiz}(2)) \times S_r$ Combinada y expandida	- Instrumental lectura por LC- MS/MS -Análisis estadístico por Minitab
VARIABLES INDEPENDIENTES	DEFINICIÓN DE LA VARIABLE		DIMENSIONES	INDICADORES	MÉTODOS
X1 = Extracción de pesticidas Benzoilúreas	Parámetros físicos que son influyentes para una mayor extracción de pesticidas Benzoilúreas.	X1.1 = Tiempo de extracción X1.2 = Temperatura de sequedad		Minutos (min) Grados Celsius (°C)	Método experimental
X2 = Condiciones de análisis instrumentales para la determinación de pesticidas Benzoilúreas	La determinación de pesticidas, es la obtención de la concentración de los analitos y se realiza por LC – MS/MS, donde las condiciones de análisis del espectrómetro de masas y las condiciones cromatográficas necesitan ser optimizados, lo que servirán para lograr un nivel máximo de sensibilidad de análisis.	X2.1 = Polaridad, voltaje capilar, temperatura de fuente, temperatura de desolvatación, gas de desolvatación, gas de colisión. X2.2 = Columna cromatográfica, Flujo de fases, Volumen de inyección, Temperatura de la columna, tipo de elución, Fases móviles.		ES– y/o ES+, Kilovoltios (KV), Temperatura (°C), Temperatura (°C), L/h, L/h. Tiempo de retención, mL/min, µL, Temperatura (°C), Isocrática, Fase móvil A y B.	Instrumental - LC – MS/MS

*Elaboración propia*

## **IV DISEÑO METODOLÓGICO**

### **4.1 Tipo y diseño de investigación**

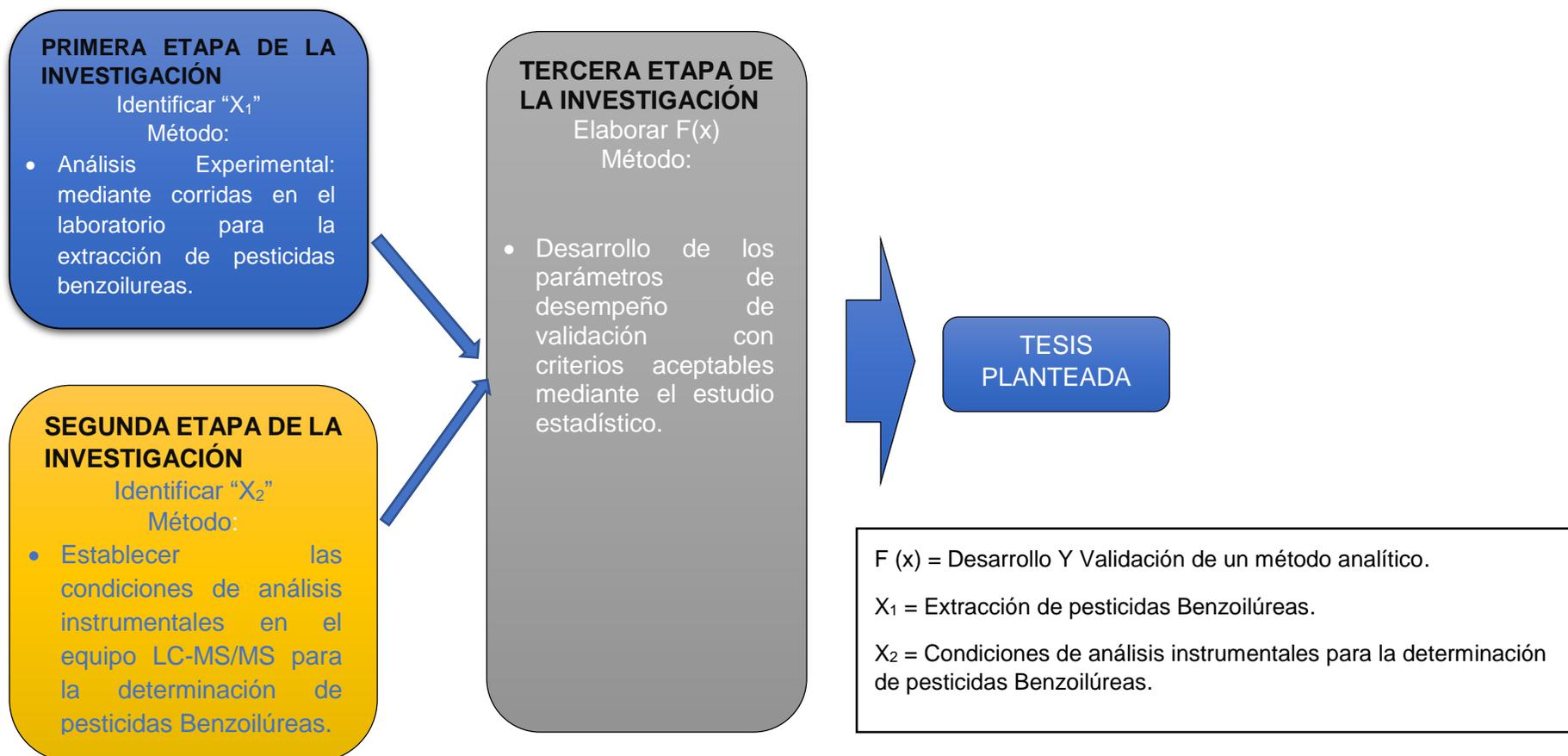
- a) Por su finalidad.** - La presente investigación es de tipo aplicada, porque, al obtener resultados favorables, podrá permitir convertir ésta metodología en un ensayo de rutina, con resultados confiables respaldado estadísticamente.
- b) Por el ámbito de desarrollo.** - La investigación se desarrolló en el laboratorio de control de calidad y seguridad alimentaria del CITEacuícola UPCH, Lima, Perú.
- c) Por su nivel de estudio.** - Es de tipo exploratorio, debido a que, busca desarrollar nuevas metodologías, dentro de un campo donde la información no es suficiente y así aportar como una alternativa para la aplicación del método.
- d) Por su diseño interpretativo.** - Esta investigación es de tipo experimental porque se consideran parámetros físico-químicos obtenidos a partir del análisis experimental desarrollada en el laboratorio.
- e) Por el énfasis en la naturaleza de los datos manejados.** - Los datos obtenidos son del tipo cuantitativo debido a que las variables descritas son medibles.

### **4.2 Método de investigación**

Para el desarrollo y validación de un método analítico para la determinación de pesticidas Benzoiúreas en pescado y langostino por LC-MS/MS se ha propuesto desarrollar en tres etapas según el diseño de investigación planteada en la Figura 2 (Ver p. N° 39) y seguir el diseño experimental propuesto en la Figura 3 (Ver p. N° 40).

**Figura 2**

*Diseño de la Investigación*



*Elaboración Propia*

**Figura 3**

*Diseño Experimental*



### **I. Pre-Tratamiento de la muestra Matriz**

- Matrices (trucha y langostino) homogenizado de las muestras.



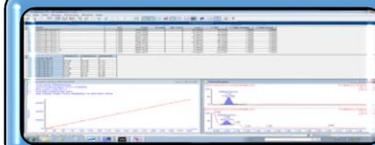
### **II. Optimización de las condiciones de operación del UPLC-MS/MS**

- Condiciones cromatográficas.
- Optimización del espectrómetro de masas.

Tiempo de extracción (min)	Temperatura de sequedad (°C)
$X_{1,1}(T_1)$	$X_{1,2}(T_1)$
$X_{1,1}(T_2)$	$X_{1,2}(T_2)$
$X_{1,1}(T_1)$	$X_{1,2}(T_2)$
$X_{1,1}(T_2)$	$X_{1,2}(T_1)$

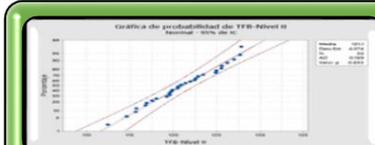
### **III. Pruebas experimentales para el desarrollo del método**

- Desarrollo de un diseño factorial de 2x2, para las variables de Tiempo de extracción y temperatura de evaporación.



### **IV. Parámetros de validación**

- Veracidad y precisión, límite de detección y cuantificación, linealidad, rango de trabajo, selectividad/Especificidad, robustez, incertidumbre (combinada y expandida).



### **V. Evaluación de resultados de la validación**

- Análisis estadístico de los resultados según criterios establecidos.

*Elaboración Propia*

### **4.3 Población y muestra**

#### **4.3.1 Población**

Se utilizó de 2 a 3 Kg de cada matriz (pescado Trucha arcoíris y langostino) que se adquirieron de un centro comercial cerca al laboratorio de control de calidad y seguridad alimentaria del CITEacuícola UPCH.

#### **4.3.2 Muestra**

Se utilizó de 2g de matriz por cada análisis.

### **4.4 Lugar de estudio y periodo desarrollado**

El presente trabajo de investigación se realizó en las instalaciones del laboratorio de control de calidad y seguridad alimentaria (LaCCSA) del CITEacuícola de la UPCH dentro su centro de Laboratorio de investigación y Desarrollo (LID) ubicada en la Av. Honorio delgado N° 430 Urb. Ingeniería – San Martín de Porres.

En cuanto al periodo de desarrollo de la presente investigación, tiene lugar del 02 al 30 de noviembre del 2021.

### **4.5 Técnica e instrumentos para la recolección de datos**

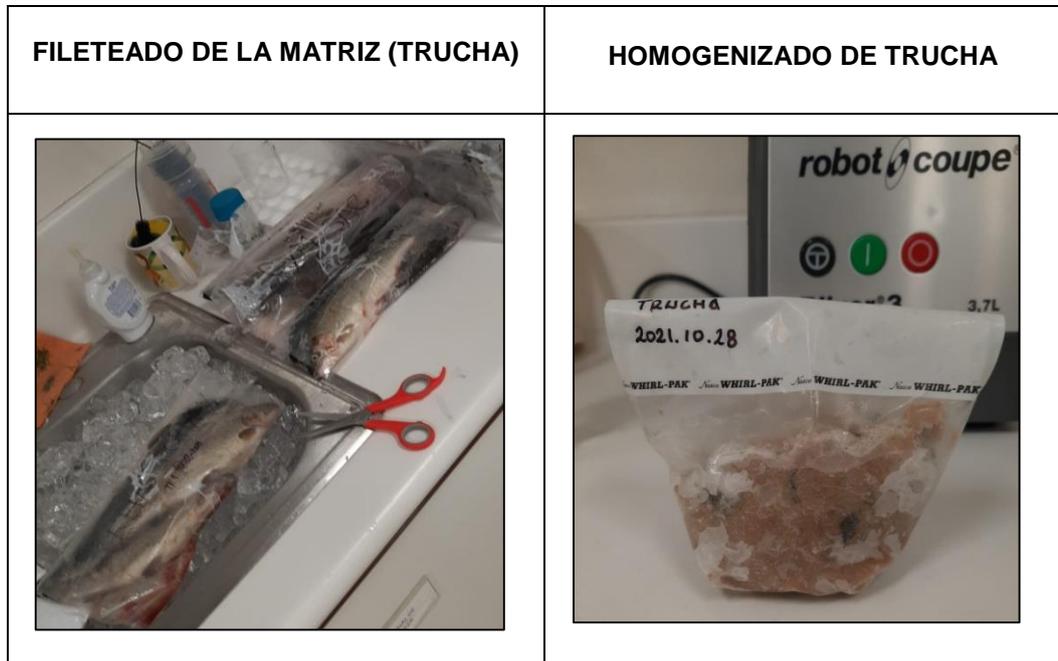
#### **4.5.1 Instrumentos para el desarrollo de la metodología**

##### **A. Pre tratamiento de la Muestra-Matriz**

- **Fileteado**, con ayuda de un cuchillo, para el caso del pescado (Trucha arcoíris) se cortó la cabeza y se retiró las vísceras, sólo se consideró el músculo. Para el langostino, se cortó las antenas. Además, para un muestreo representativo se recolectó entre 100 a 150g de muestra.
- **Homogenizado**, una vez cortado la matriz se procederá a ingresarlos al homogenizador de tejidos con ayuda del Homogenizador marca **ROBOT COUPE**, modelo **BLIXER 3D**.
- **Almacenamiento**, Una vez homogenizado se procede a trasvasar la matriz a una bolsa whirl pack, codificando la muestra y la fecha de homogenizado tal y como se muestra en la Figura 4 (Ver p. N° 42), luego para su almacenamiento y posteriores análisis se realizará bajo congelación de  $-18^{\circ}\text{C} \pm 6^{\circ}\text{C}$ .

**Figura 4**

*Homogenizado de la Matriz Trucha*



*Fotos tomadas por el autor en el laboratorio del CITEacuícola UPCH (2021-11-09)*

## **B. Procedimiento para la extracción y cuantificación**

### **1. Equipos, materiales e instrumentos**

Los instrumentos y equipos que se usaron para el desarrollo y validación del método para la determinación de pesticidas Benzoilureas se especifican en la Tabla 8, así como los materiales utilizados están detallados en la Tabla 9 (Ver p. N° 44).

**Tabla 8**

*Instrumentos y Equipos*

INSTRUMENTOS/ EQUIPOS	MARCA	MODELO	SERIE
Homogenizador	Robot coupe	Blixer 3D	K4460111204
Balanza Analítica	Ohaus	PA224	B635946035

<b>INSTRUMENTOS/ EQUIPOS</b>	<b>MARCA</b>	<b>MODELO</b>	<b>SERIE</b>
Equipo de filtración al vacío	-	-	-
Concentrador de Nitrógeno	Organomation	13165	52827
Centrífuga refrigerada	Thermo Scientific	ST8R	42159788
Vortex	Heidolph	Multireax	2001161530817
Micropipeta (0.5µL-10µL)	Eppendorf	Research plus	R35772F
Micropipeta (2µL-20µL)	Eppendorf	Research plus	K41591G
Micropipeta (10µL-100µL)	Eppendorf	Research plus	N40343F
Micropipeta (100µL-1000µL)	Eppendorf	Research plus	G26391E
Micropipeta (0.5mL-5mL)	Eppendorf	Research plus	H34411H
Columna cromatográfica	Waters	ACQUITY UPLC BEH C18 1.7µm 2.1 x 100mm	0313380261515 4
Columna cromatográfica	Waters	ACQUITY UPLC HSS T3 1.8µm 2.1 x 100mm	0215390391516 5
Cromatógrafo Líquido de Ultra Performance acoplado a un detector Triple cuadripolo UPLC-MS/MS	Waters	ACQUITY I- CLASS XEVO TQ-XS	WBA0233
Purificador de Agua	Sartorius	Arium Mini	39304544

*Elaboración propia.*

**Tabla 9***Materiales de trabajo*

<b>MATERIALES</b>	<b>MARCA</b>
Bolsa Whirl pack	Whirl Pack
Probetas graduadas	Pyrex
Tubos de centrífuga de polipropileno de 50mL	Falcon
Tubos de centrífuga de polipropileno de 15mL	Tarsons
Jeringas descartables de 5mL	Segurimaxx
Filtros de Jeringa 0.2µm de poro y 13mm de diámetro.	Chromafil
Filtro de membrana Celulosa, tamaño de poro 0.2µm	Sartorius
Viales para HPLC	Waters
Tips 0.5-5mL; 100-1000µL; 2-20 µL.	Eppendorf
Viales de almacenamiento de Estándares	Supelco
Fiolas de 10mL y 250mL	Isolab
Frascos de 500mL para fases móviles	Isolab
Vaso de precipitado de 10mL y 100mL	Isolab
Plumones indeleble negro	Faber Castell
Pisetas de plástico, gradillas.	-
Guantes de nitrilo y mascarillas	-
Papel aluminio	-
Cuchillo, espátulas y tijeras	-

*Elaboración propia.***2. Reactivos, solventes y Estándares**

Debido a la sensibilidad que posee el UPLC-MS/MS se trabajó con solventes y reactivos de alta pureza, están especificadas en la Tabla 10, Tabla 11 (Ver p. N° 45) y Tabla 12 (Ver p. N° 45).

**Tabla 10***Solventes para la determinación de Pesticidas Benzoilureas*

<b>SOLVENTE</b>	<b>MARCA</b>	<b>LOTE</b>	<b>GRADO / PUREZA</b>
Acetonitrilo (ACN)	Honeywell	EB304-US	LC-MS
Metanol (MeOH)	Merck	I1030935	LC-MS
Acetona	J.T. Baker	V20C53	Reactivo

*Elaboración propia.*

**Tabla 11***Reactivos para la Determinación de Pesticidas Benzoilureas*

REACTIVO	MARCA	LOTE	GRADO / PUREZA
Formiato de amonio	Sigma Aldrich	BCBX5107	Masas, >99%
C-18 adsorbente	Cole-Parmer	M01053U0409	-
Amina Primaria-Secundaria (PSA)	Supelco	128648	-
Sulfato de Magnesio anhidro (MgSO <sub>4</sub> )	J.T. Baker	208378	Reactivo
Cloruro de Sodio (NaCl)	Merck	K49426004	ACS para análisis
Gas Nitrógeno	-	-	Grado 5.0 UAP

*Elaboración propia.***Tabla 12***Estándares de Pesticidas Benzoilureas*

ESTÁNDAR	MARCA	LOTE	GRADO / PUREZA
Diflubenzuron (DFB), PESTANAL, Teflubenzuron (TFB), PESTANAL,	Sigma-Aldrich	BCBW8049	Analytical standard / 99.6%
	Sigma-Aldrich	BCBT3800	Analytical standard / 98.5%

*Elaboración propia.*

### 3. Fases Móviles

- **Fase Móvil A.** – 5mM de formiato de amonio en agua. Con ayuda de una balanza analítica con una división de escala de 0.0001g se pesó 0.1577g de formiato de amonio, y se llevó a una fiola de 500mL hasta enrase con agua ultra pura (H<sub>2</sub>O UP) que se obtuvo del equipo purificador de agua marca Sartorius. Posteriormente, la solución pasó por el equipo de filtración al vacío y listo para su uso.
- **Fase Móvil B.** – Acetonitrilo 100%, grado LC-MS

## Figura 5

*Fases Móviles para pesticidas Benzoilúreas*



*Foto tomada por el autor de la tesis en el CITEacuícola UPCH (2021-11-08).*

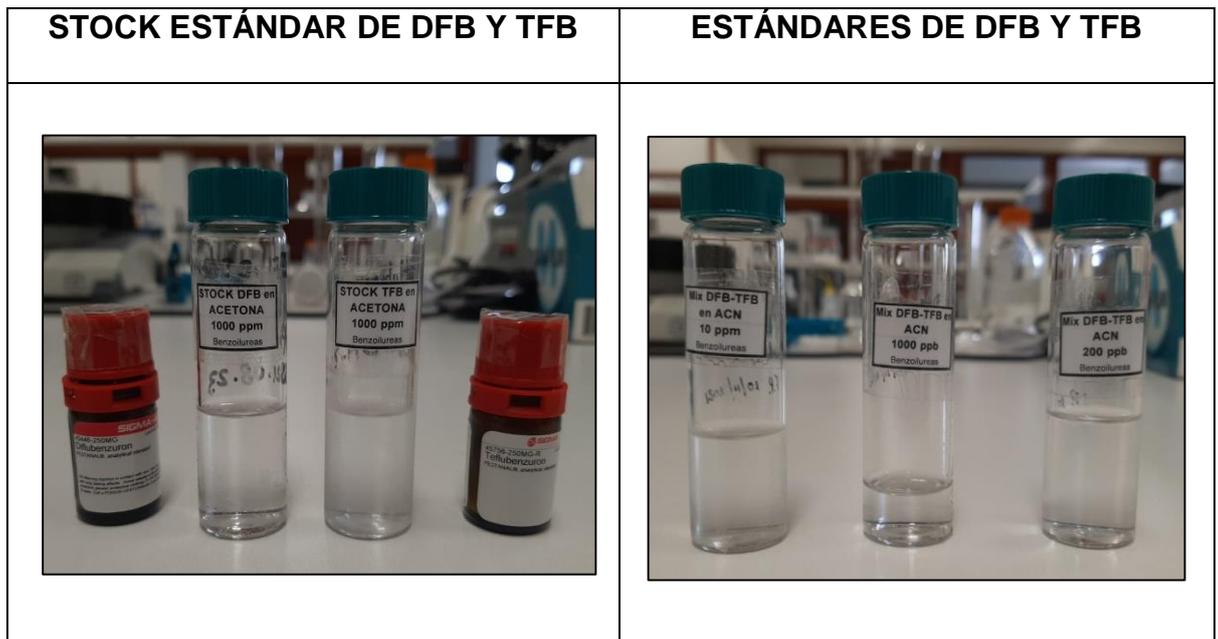
### 4. Preparación de soluciones estándar

- **Stock estándar de DFB y TFB de 1000ppm**, Se pesó 10mg de cada estándar en vaso de precipitado de 10mL por separado, se disolvieron con acetona y se llevó cada uno a su fiola respectiva de 10mL, se enjuagó el vaso para arrastrar trazas de cada estándar y cada fiola se enrasó con acetona. Se almacenó en congelación a  $\leq -20^{\circ}\text{C}$ , por un máximo de 12 meses.
- **Estándar de DFB y TFB de 100ppm**, Se Pipeteó 1000 $\mu\text{L}$  con ayuda de la Micropipeta Eppendorf (100 $\mu\text{L}$ -1000 $\mu\text{L}$ ) de cada estándar STOCK de 1000 ppm de DFB y TFB, se llevó cada a su propia fiola de 10mL y se enrasó con Acetonitrilo. Almacenar en congelación a  $\leq -20^{\circ}\text{C}$  por un máximo de 08 meses.
- **Estándar de DFB y TFB de 10ppm**, Se Pipeteó 100 $\mu\text{L}$  con ayuda de la Micropipeta Eppendorf (10 $\mu\text{L}$ -100 $\mu\text{L}$ ) de cada estándar STOCK de 1000 ppm de DFB y TFB, se llevó cada a su propia fiola de 10mL y se enrasó con Acetonitrilo. Almacenar en congelación a  $\leq -20^{\circ}\text{C}$  por un máximo de 06 meses.
- **Estándar de TFB de 2000ppb**, Pipetear 20 $\mu\text{L}$  con ayuda de la Micropipeta Eppendorf (100 $\mu\text{L}$ -1000 $\mu\text{L}$ ) de la solución estándar Mix de DFB y TFB de 1000ppm, llevar a fiola de 10mL y enrasar con Acetonitrilo. Almacenar en congelación a  $\leq -20^{\circ}\text{C}$ , por un máximo de 05 meses.

- **Estándar Mix de DFB y TFB de 200ppb**, Pipetear 200μL con ayuda de la Micropipeta Eppendorf (100μL-1000μL) de la solución estándar Mix de DFB y TFB de 10ppm, llevar a fiola de 10 mL y enrasar con Acetonitrilo. Almacenar en congelación a  $\leq -20^{\circ}\text{C}$ , por un máximo de 03 meses.

**Figura 6**

*Estándares de trabajo de Diflubenzuron y Teflubenzuron.*



*Fotos tomadas por el autor de la tesis en el laboratorio del CITEacuícola (2021-11-08)*

### 5. Preparación de la Curva de Calibración

- Para cada punto de la curva de calibración se trabajará en Blanco Matriz.
- Se preparará un blanco matriz y para la curva de calibración 6 niveles de 100, 200, 300, 400, 600 y 800 ng/mL para el Diflubenzuron y de 10, 20, 50, 100, 200 y 400 ng/mL para el Teflubenzuron
- Para cada punto de la curva se realizarán los pasos del item 6 del proceso de extracción del paso a) al paso e). Posteriormente añadir los volúmenes equivalentes a los puntos de la curva de calibración a

partir de los estándares de 10ppm de DFB y 2000ppb TFB tal y como se muestra en la Tabla 13.

**Tabla 13**

*Curva de calibración del Diflubenzuron y Teflubenzuron.*

ESTÁNDAR	30%FMA- 70%FMB ( $\mu$ L)	ACN ( $\mu$ L)	Vol. de 10 ppm DFB( $\mu$ L)	Vol. de 2000 ppb TFB( $\mu$ L)	Vol. Final ( $\mu$ L)	C. Final DFB (ng/mL)	C. Final TFB (ng/mL)
STD-1	400	585	10	5	1000	100.00	10.00
STD-2	400	570	20	10	1000	200.00	20.00
STD-3	400	545	30	25	1000	300.00	50.00
STD-4	400	510	40	50	1000	400.00	100.00
STD-5	400	440	60	100	1000	600.00	200.00
STD-6	400	320	80	200	1000	800.00	400.00

*Elaboración propia en Microsoft Excel.*

- Una vez elaborada la curva, continuar desde el paso g) a la i) del ítem 6 del proceso de extracción.

## 6. Proceso de extracción

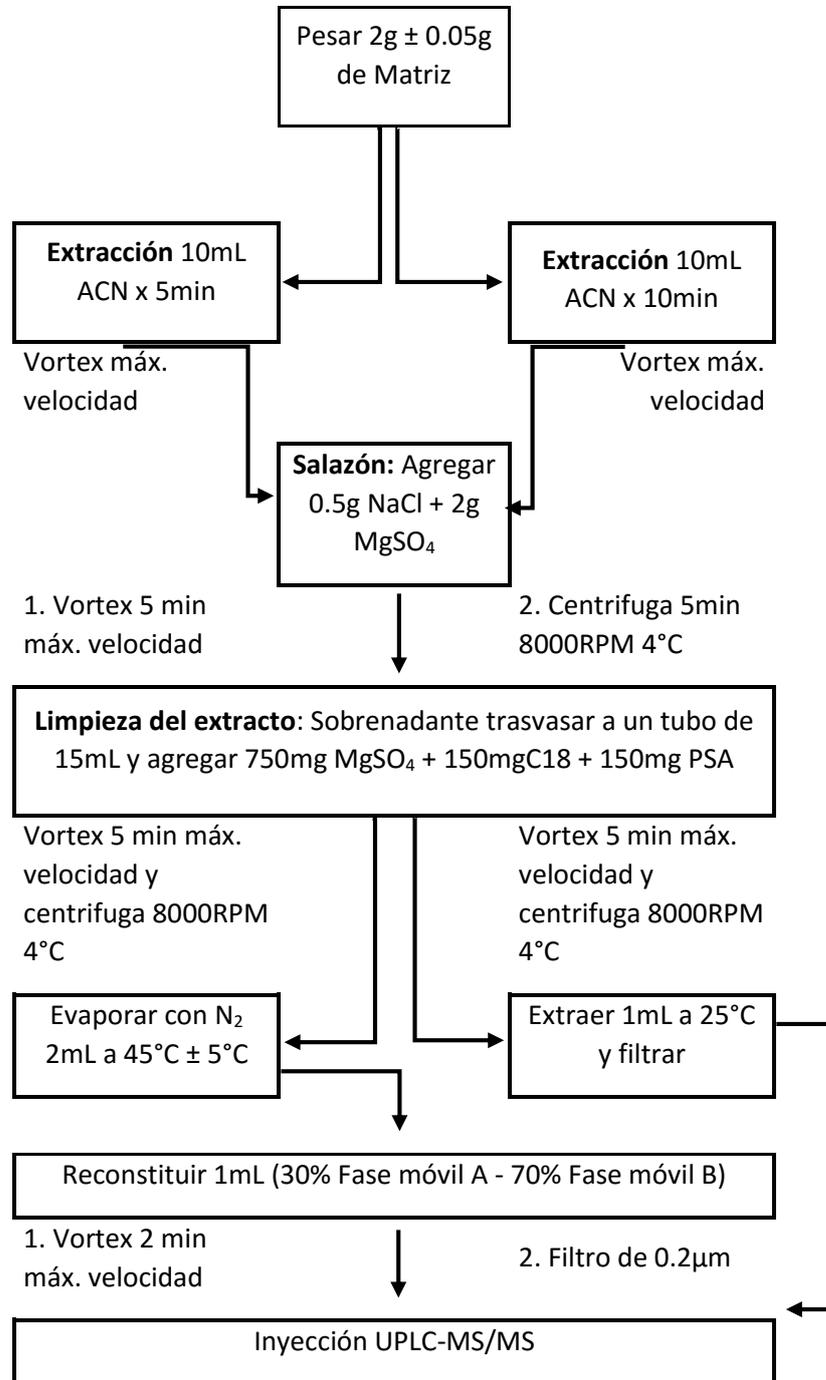
Para nuestro proceso de extracción se toma como referencia y base teórica a Guimaraes L., Ramkumar A., Moloney M., Scherer M., Ferreira F., Damian P., y Danaher M., (2019), en su artículo publicado por la revista Analytical and Bioanalytical Chemistry titulado "Vibrational extraction QuEChERS for analysis of antiparasitic agents in fish by liquid chromatography couple with tandem mass spectrometry". El diagrama de flujo propuesto para el proceso de extracción de pesticidas Benzoilureas se observa en la Figura 7 (Ver p. N° 50). Así mismo, la secuencia detallada de los pasos a seguir es de la siguiente manera:

- a) Pesar  $2\text{g} \pm 0.05\text{g}$  en tubo centrifuga de polipropileno de 50mL, para cada muestra.

- b) Para esta parte se realizará una de las 2 formas, según nuestro análisis factorial.
1. Añadir 10mL de ACN a cada tubo, agitar en vortex por 5 min a máxima velocidad (nivel 10).
  2. Añadir 10mL de ACN a cada tubo, agitar en vortex por 10 min a máxima velocidad (nivel 10).
- c) Agregar a cada tubo 0.5g de NaCl y 2g de MgSO<sub>4</sub> anhidro, agitar en vortex a máxima velocidad (nivel 10) por 5 minutos y posteriormente centrifugar a 8000RPM a 4°C por 5min.
- d) Trasvasar el sobrenadante a un tubo de polipropileno de 15mL que contiene 750mg MgSO<sub>4</sub> anhidro, 150mg C-18 y 150mg PSA, agitar en vortex a máxima velocidad (nivel 10) por 5 min y posteriormente centrifugar a 8000RPM a 4°C por 5min.
- e) De igual manera, para esta parte realizará una de las 2 formas, según nuestro análisis factorial.
1. Extraer 2mL del sobrenadante a un tubo de polipropileno de 15mL y evaporar hasta sequedad con nitrógeno en el baño de calentamiento a 45°C ± 5°C y continuar de paso f) a la i).
  2. Extraer 1mL del sobrenadante a condiciones ambientales de 25°C y proseguir con el paso h) a la i).
- f) Reconstituir el extracto seco con 1mL de solución (30% Fase móvil A – 70% Fase móvil B).
- g) Agitar durante 2 min en un vortex a máxima velocidad (Nivel 10).
- h) Pasar por un filtro jeringa de 0.2µm y colocar en vial de 2mL.
- i) Inyectar al equipo UPLC-MS/MS

**Figura 7**

*Propuesta del Diagrama de Flujo del proceso de extracción de Pesticidas Benzoilureas según el análisis factorial.*



*Elaboración propia.*

#### 4.5.2 Técnicas para la obtención de resultados de las condiciones de operación del equipo UPLC-MS/MS

##### a) Condiciones cromatográficas

Para las condiciones cromatográficas se usaron dos tipos de eluciones en gradiente e isocrática. Sin embargo, la elución en gradiente presentó algunos inconvenientes por presentar picos en muestras blancos sin fortificar; caso contrario para a la elución isocrática donde se obtuvieron picos cromatográficos bien definidos y con buena resolución. Los parámetros para la elución isocrática se muestra en la **Tabla 14**.

**Tabla 14**

*Condiciones de LC para el análisis de Diflubenzuron y Teflubenzuron*

<b>Columna</b>	ACQUITY UPLC BECH C18,100 mmx 2.1 mm, 1.7 $\mu$ m		
<b>Flujo</b>	0.4 mL/min		
<b>Volumen de inyección</b>	2 $\mu$ L		
<b>Temperatura de columna</b>	40 °C		
	<b>Time (min)</b>	<b>% Fase móvil A</b>	<b>% Fase móvil B</b>
<b>ISOCRÁTICO</b>	<b>Inicial</b>	30	70
	3.5	30	70

*Extraídos del sistema Inlet File - UPLC-MS/MS del CITEacuícola UPCH (2021).*

##### b) Detección de espectrometría de Masas (MS)

- Con el propósito de lograr un máximo nivel de sensibilidad en el análisis, se optimizó los parámetros del espectrómetro de masas (MS) con los estándares de DFB y TFB. se realizó monitoreando 2 transiciones por cada analito. Éstas transiciones se realizaron de 2 maneras; para el Diflubenzuron, se realizó con el detector tune manual; y el Teflubenzuron con el IntelliStart generado por el propio equipo. Así mismo, estos parámetros se optimizaron para generar una mejor resolución de los picos cromatográficos. Los parámetros finales de la fuente para el sistema UPLC-MS/MS se observan en la Tabla 15 (Ver p. N°52).

**Tabla 15**

*Parámetros de la fuente para un sistema I-CLASS-Xevo-TQXS UPLC-MS/MS (Waters)*

PARÁMETROS DE LA FUENTE DE IONIZACIÓN	VALORES
Polaridad	ES +
Voltaje del Capilar (KV)	3.0
Temperatura de la fuente (°C)	150
Temperatura de desolvatación (°C)	500
Gas de Desolvatación (L/H)	1000
Gas de Cono (L/H)	150

*Extraídos del MS Tune File - UPLC-MS/MS (Waters) del CITEacuícola UPCH (2021).*

- De las 2 transiciones encontradas, la transición de mayor intensidad será utilizada para fines de cuantificación, y la de menor intensidad con fines de confirmación de la identidad encontrada. En la **Tabla 18** se describen las condiciones de adquisición en modo de Monitorio de Reacción Múltiple (MRM) para cada analito.

**Tabla 16**

*Condiciones de fragmentación para un sistema I-CLASS-Xevo-TQXS UPLC-MS/MS (Waters).*

ANALITO	Q1 (M/Z)	Q3 (M/Z)	* TIPO DE ION	ENERGÍA DE COLISIÓN (EV)	CONO(V)
Diflubenzuron	311.1	158.0	1	12	34
	311.1	141.0	2	15	34
Teflubenzuron	380.9	158.0	1	20	30
	380.9	140.9	2	30	30

*Extraídas del sistema Inlet File - UPLC-MS/MS (Waters), luego del Tuneo Manual y por IntelliStart;(\*)1: Ion de cuantificación, 2: Ion de Confirmación (2021).*

### 4.5.3 Técnica para el desarrollo del método de extracción de pesticidas benzoilureas

De acuerdo a nuestro proceso de extracción propuesto en la Figura 7 (Ver p. N° 50), se realizará mediante un análisis factorial, se tomarán 2 factores las cuales se consideran críticos para la extracción de pesticidas benzoilureas, el tiempo de extracción ( $X_{1.1}$ ) para 2 variaciones de  $t_1=5\text{min}$  y  $t_2=10\text{min}$ ; y la temperatura de evaporación ( $X_{1.2}$ ) para 2 variaciones de  $T_1=45^\circ\text{C}$  y  $T_2=25^\circ\text{C}$  (temperatura ambiente sin evaporación), debido a esto se realizará un diseño factorial de  $2 \times 2$  para cada matriz, con 2 factores, 4 corridas y en un solo bloque, tal y como se observa en la Tabla 17 para trucha y en la Tabla 18 para langostino. Además, se tomará como proceso de extracción efectivo al que obtenga mayor %recuperación.

**Tabla 17**

*Diseño factorial para el proceso de extracción de pesticidas benzoilureas en Trucha*

N° Prueba	TIEMPO DE EXTRACCIÓN (min)	TEMPERATURA (°C)
1	$X_{1.1}(t_2)$	$X_{1.2}(T_2)$
2	$X_{1.1}(t_2)$	$X_{1.2}(T_1)$
3	$X_{1.1}(t_1)$	$X_{1.2}(T_2)$
4	$X_{1.1}(t_1)$	$X_{1.2}(T_1)$

*Elaboración propia en Microsoft Excel.*

**Tabla 18**

*Diseño factorial para el proceso de extracción de pesticidas benzoilureas en Langostino*

N° Prueba	TIEMPO DE EXTRACCIÓN (min)	TEMPERATURA (°C)
1	$X_{1.1}(t_2)$	$X_{1.2}(T_2)$
2	$X_{1.1}(t_2)$	$X_{1.2}(T_1)$
3	$X_{1.1}(t_1)$	$X_{1.2}(T_2)$
4	$X_{1.1}(t_1)$	$X_{1.2}(T_1)$

*Elaboración propia en Microsoft Excel.*

#### 4.5.4 Técnicas para el desarrollo de los Parámetros de desempeño de la Validación.

- 1) **Selectividad-Especificidad.** – Para cada matriz (Pescado Trucha arcoíris y Langostino), el proceso de selectividad-Especificidad, se realizó con el fin de garantizar la ausencia de interferentes y verificar el tiempo de retención respectivamente, la cual se realizará mediante:
  - Una comparación entre los espectros de estándares y muestras, éstos deberán reflejar la similitud en cuanto a sus áreas.
  - Una comparación el tiempo de retención (RT) del estándar del Diflubenzuron y Teflubenzuron, una muestra blanco Matriz (Bk-Matriz) y una muestra más adición de los estándares (Spiked).
- 2) **Límite de detección LOD.** – Se preparó 10 blancos muestra fortificados que posea la menor concentración, para la Trucha se adicionó 100µL del estándar Mix de 200ppb de DFB y TFB, esta concentración fue de 4µg/mL para obtener una concentración en muestra de 10µg/Kg; y para langostino se adicionó 25µL de 10ppm de DFB y 20µL de 2000ppb de TFB para obtener una concentración de 62.5µg/Kg y 10µg/Kg respectivamente. Se analizó un mínimo 7 blancos fortificados en 3 días diferentes. El LOD se determina mediante la ecuación 4.

$$LOD = t_{(n-1, \alpha-1)} \times S \dots (4)$$

Donde:

- $t_{(n-1, \alpha-1)}$ : Valor de la “t” de Student a un intervalo de confianza del 99% y una desviación estándar estimada para n-1 grados de libertad,  $t=3.143$  para 7 réplicas.
- S: Desviación estándar de las repeticiones del análisis (analito)

Criterios de aceptación para el límite de detección según Analytical Detection Limit Guidance & Laboratory Guide for Determining Method Detection Limits es la siguiente:

$$LOD \text{ calculado} < BK - \text{fortificado} < 10 \times LOD \text{ calculado}$$

- 3) **Límite de cuantificación LOQ.** – Para cada matriz (Pescado Trucha arcoíris y Langostino), el límite de cuantificación se calculará con la ecuación 5:

$$LOQ = 10 \times S \dots (5)$$

Donde:

- S: Es la desviación estándar de las réplicas del análisis (analito).
- 4) **Linealidad.** – Para la linealidad se preparó 6 niveles de estándares de 100, 200, 300, 400, 600 y 800 ng/mL para el DFB y de 10, 20, 50, 100, 200 y 400 ng/mL para el TFB a partir de los estándares analíticos mencionados en la Tabla 12 (Ver p. N° 45). El criterio aceptación para la linealidad es cuando el coeficiente de correlación (R) sea > 0.99, presentando una tendencia lineal. Para analizar la variación entre las tres curvas se realizó estadística de la regresión, el análisis de varianza de la regresión, los intervalos de confianza y el análisis de residuales.
  - 5) **Rango de Trabajo.** – El Rango de trabajo será expresado como un intervalo definido por el límite de cuantificación calculado y el nivel más alto de la curva de calibración.
  - 6) **Veracidad.** – Para la Matriz Trucha arcoíris y langostino se calculó en términos de % Recuperación (%R) mediante la fortificación en tres niveles. Para la Trucha fueron de 250, 1000 y 1500 µg/Kg para el DFB y de 50, 500 y 750 µg/Kg para el TFB; para el Langostino fueron de 250, 1000 y 1750 µg/Kg para el DFB y de 50, 550 y 1000 µg/Kg para el TFB. Se trabajó con 5 blanco muestras fortificados por cada nivel, en tres días diferentes y para cada analista.

La veracidad se calculará en función de la recuperación (%R) según el Reglamento de Ejecución (UE) 2021/808 de la comisión será la ecuación 6:

$$\%R = \frac{(\text{concentración media detectada tras introducción del factor corrector de recuperación})}{\text{Nivel de enriquecimiento o fortificado}} \times 100\% \dots (6)$$

El criterio de aceptación está alineado al Documento N° SANTE/12682/2019 tal y como se describe en la Tabla 6 (Ver p. N° 30), donde las recuperaciones se encuentran entre 70% – 120%.

Además, se determinó:

- **Tipo de distribución.** – Se usó el criterio de normalidad con la prueba de Anderson-Darling sobre los 30 resultados obtenidos en los 3 días por ambos analistas y para cada nivel de fortificación. La

Hipótesis nula ( $H_0$ ), la hipótesis alterna ( $H_a$ ) y el criterio de decisión serán las siguientes:

- ✓  $H_0$ : Los resultados provienen de una distribución normal
- ✓  $H_a$ : Los datos provienen de una distribución no normal.
- ✓ Nivel de significancia ( $\alpha$ ) del 5%
- ✓ Nivel de confianza del  $(1 - \alpha)$  del 95%
- ✓ Si el  $P_{valor} \geq 0.05$ , entonces se acepta la hipótesis nula y se rechaza la hipótesis alterna.
- **Atipicidad de datos.** – Se calculó el valor estadístico **Z-score** con el fin de detectar datos atípicos:

$$Z - score = \frac{(x_i - \bar{x})}{S}$$

Donde:

- ✓  $X_i$ : Resultado individual obtenido del ensayo.
- ✓  $\bar{X}$ : Media del conjunto de resultados obtenidos.
- ✓  $S$ : Desviación estándar de los resultados obtenidos.

Para la atipicidad tendremos una Hipótesis nula ( $H_0$ ) y una Hipótesis alterna ( $H_a$ ), las cuales serán las siguientes:

- ✓  $H_0$ : No existen datos atípicos en el conjunto de resultados.
- ✓  $H_a$ : Existe por lo menos un dato atípico en el conjunto de resultados.

El criterio de calificación para el Z-score para una distribución normal, será el siguiente:

$$|Z| \leq 2 \rightarrow \textit{Satisfactorio}$$

$$2 < |Z| < 3 \rightarrow \textit{Cuestionable}$$

$$|Z| \geq 3 \rightarrow \textit{No satisfactorio}$$

- 7) Precisión.** – Para cada matriz (Pescado Trucha arcoíris y Langostino), se evaluó en términos de Repetibilidad intermedia (dos analistas, condiciones ambientales iguales, homogenizado de muestra iguales, mismos equipos y tres días diferentes) para los niveles evaluados en la veracidad. Para cada analista, se trabajó con 15 blanco muestras

fortificados recogidos en los tres días y para cada nivel de fortificación, los cálculos se realizaron en base a la desviación estándar Relativa de repetibilidad experimental (%RSD<sub>r (experimental)</sub>). Según el documento N° SANTE/12682/2019 el RSD<sub>r (experimental)</sub> no debe exceder el 20%. Así mismo, la desviación estándar en condiciones de repetibilidad (RSD<sub>r</sub>) según la ISO 5725-1, se calcula de la siguiente manera:

$$RSD_r = \frac{S_r}{\bar{X}} * 100\%, \bar{X} \text{ es el promedio de los datos}$$

Donde:

$$S_r^2 = \frac{T_5}{T_3 - P}, P \text{ es el número de grupos}$$

$$T_5 = \sum (n_i - 1) \times S_i^2, S_i \text{ desviación estándar por grupo}$$

$$T_3 = \sum n_i, n_i \text{ es el número de datos por grupo}$$

- 8) **Robustez.** - Para las combinaciones del análisis de Robustez se aplicará el diseño factorial de Youden-Steiner tal y como se determinan en la Tabla 19 se elaboró una matriz de variación de 5 factores, donde se realizó 6 ensayos.

**Tabla 19**

*Combinaciones para el análisis de Robustez.*

		ENSAYOS					
Ensayos		1	2	3	4	5	6
FACTORES	A/a	A	a	a	A	a	A
	B/b	B	b	b	B	B	b
	C/c	C	C	c	c	c	C
	D/d	D	D	d	d	D	d
	E/e	E	E	E	e	e	e
<b>RESULTADO</b>		s	t	u	v	w	x

*Elaboración propia en Microsoft Excel.*

Donde las letras mayúsculas (A, B, C, D y E) son las variables propias del método, las letras minúsculas (a, b, c, d y e) corresponden a las variables que han sido alteradas y las letras s, t, u, v, w, x son los resultados obtenidos productos de esas variaciones.

Para cada factor se evaluó el efecto que influye su respectiva variación, para estos cálculos se utilizará una diferencia respuesta expresadas en la Tabla 20.

**Tabla 20**

*Combinaciones para el análisis de Robustez.*

<b>CÁLCULO DE LA DIFERENCIA DE RESPUESTA PARA CADA PARÁMETRO</b>	
<b>Parámetro</b>	<b>Diferencia</b>
A - a	$V_A = 1/3(s+v+x) - 1/3(t+u+w)$
B - b	$V_B = 1/3(s+v+w) - 1/3(t+u+x)$
C - c	$V_C = 1/3(s+t+x) - 1/3(u+v+w)$
D - d	$V_D = 1/3(s+t+w) - 1/3(u+v+x)$
E - e	$V_E = 1/3(s+t+u) - 1/3(v+w+x)$

*Elaboración propia en Microsoft Excel.*

El criterio de decisión para determinar si el factor a variar influye según la validación de métodos analíticos AEFI, 2001; es la siguiente:

$$|V_A| > S x \sqrt{2}$$

Donde:

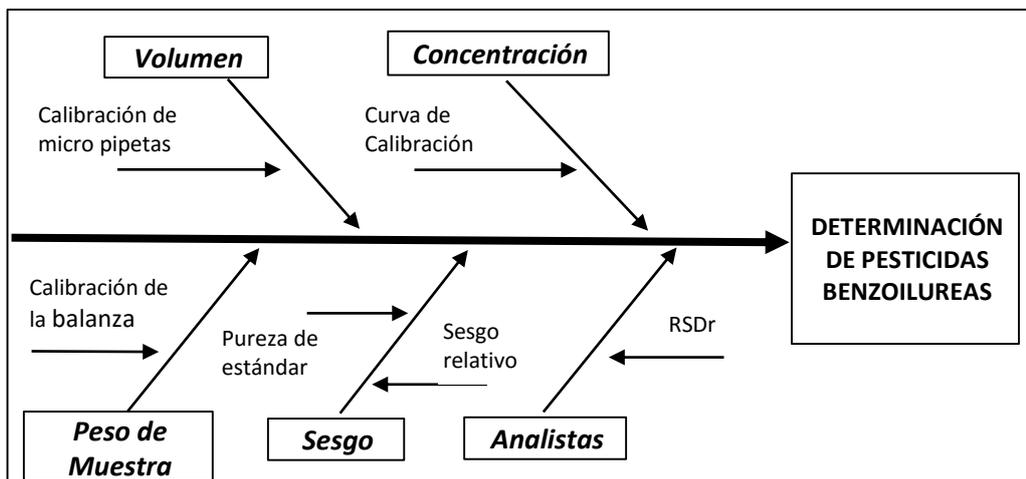
- $S_r$  es la desviación estándar de los resultados de cada ensayo.

**9) Incertidumbre.** – Se realizó en tres etapas; Primera etapa, se determinó que el mensurando es la concentración de Pesticidas Benzoilureas presentes en la Matriz Trucha arcoíris y Langostino. Segunda etapa, elaboración del diagrama de Ishikawa para identificar las principales

fuentes de incertidumbre que influyen en la determinación del mensurando, las cuales son descritos en la Figura 11.

**Figura 8**

*Fuentes principales de incertidumbre para la determinación de pesticidas benzoilureas.*



*Elaboración propia.*

Tercera etapa, el cálculo de cada una de las fuentes importantes de incertidumbre.

- Incertidumbre de la Metodología (concentración, volumen y peso de la muestra).
- Incertidumbre del sesgo.
- Incertidumbre del analista.

#### **4.6 Análisis y procesamiento de datos**

- a) Para el procesamiento de los datos se elaboraron tablas utilizando hojas de cálculo del programa Microsoft Excel del software Microsoft Office.
- b) Para la determinación de la normalidad y determinación de los datos atípicos (z-score), se usó el programa Minitab versión 2019.
- c) Para el proceso y reproceso de los resultados del equipo LC-MS/MS se usará el software/firmware MassLynx.

## V RESULTADOS

### 5.1 Resultados descriptivos

De acuerdo a la investigación planteada, se presenta los resultados para el desarrollo del proceso de extracción de pesticidas Benzoilureas **Diflubenzuron (DFB)** y **Teflubenzuron (TFB)** y de los parámetros de desempeño para la validación del método son:

#### 5.1.1 Resultados experimentales para el desarrollo del método de extracción de pesticidas Benzoilureas

De acuerdo al diseño factorial 2x2 propuesto, los resultados se presentan en la Tabla 21 para Trucha y en la Tabla 22 (Ver. p N° 60) para langostino, para una fortificación al blanco matriz de 1500µg/Kg para Diflubenzuron y de 750µg/Kg para el Teflubenzuron.

**Tabla 21**

*Resultados para el diseño experimental del método de extracción de pesticidas Benzoilureas en Trucha arcoíris.*

<b>N° PRUEBA</b>	<b>DFB (µg/Kg)</b>	<b>% RECUPERACIÓN</b>	<b>TFB (µg/Kg)</b>	<b>% RECUPERACIÓN</b>
1	1210.58	80.7%	614.62	81.9%
2	995.39	66.4%	435.89	58.1%
3	1017.83	67.9%	445.27	59.4%
4	1532.55	102.2%	647.74	86.4%

*Elaboración mediante el Masslynx del UPLC-MS/MS (2021).*

**Tabla 22**

*Resultados para el diseño experimental del método de extracción de pesticidas Benzoilureas en Langostino.*

N° PRUEBA	DFB (µg/Kg)	% RECUPERACIÓN	TFB (µg/Kg)	% RECUPERACIÓN
1	1050.54	70.0%	581.05	77.5%
2	1047.09	69.8%	502.89	67.1%
3	987.73	65.8%	481.12	64.1%
4	1552.3	103.5%	751.36	100.2%

*Elaboración mediante el Masslynx del UPLC-MS/MS (2021).*

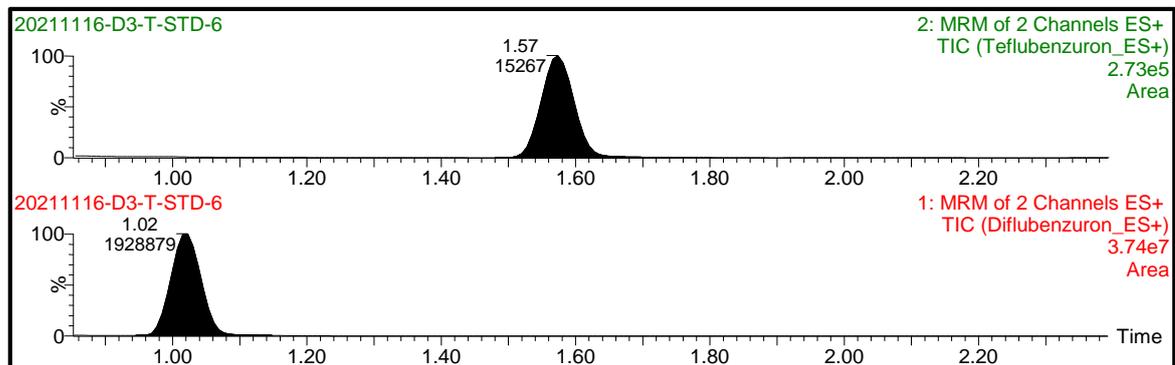
### Resultados experimentales de los parámetros de desempeño para la validación

#### 1) Selectividad-Especificidad

- Para Trucha arcoíris, se obtuvieron 3 cromatogramas, en la Figura 9 se muestra el estándar Mix de DFB y TFB, Figura 10 (Ver p. N° 62) se muestra el blanco matriz Trucha arcoíris y en Figura 11 (Ver p. N° 62) la matriz trucha arcoíris más la fortificación de los estándares de DFB y TFB.

**Figura 9**

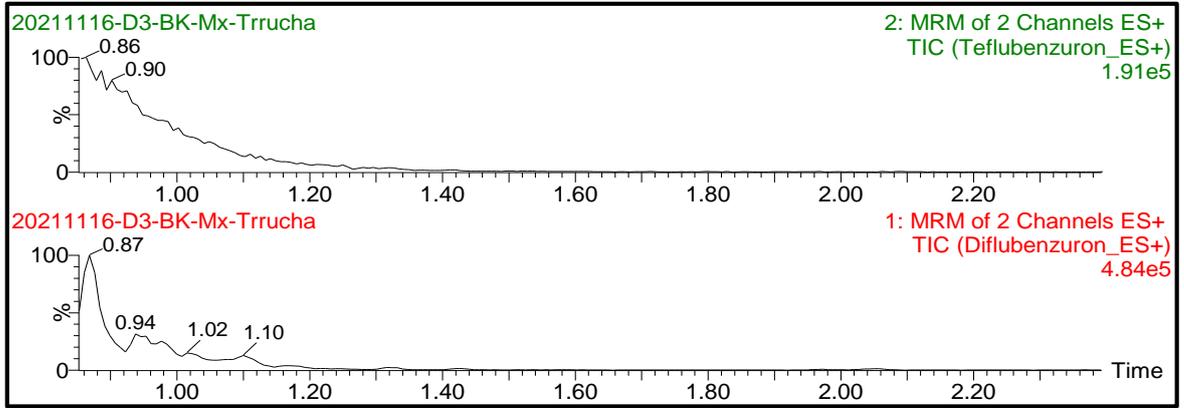
*Cromatograma del estándar mix de Diflubenzuron y Teflubenzuron.*



*Elaboración mediante el Masslynx del UPLC-MS/MS (2021).*

**Figura 10**

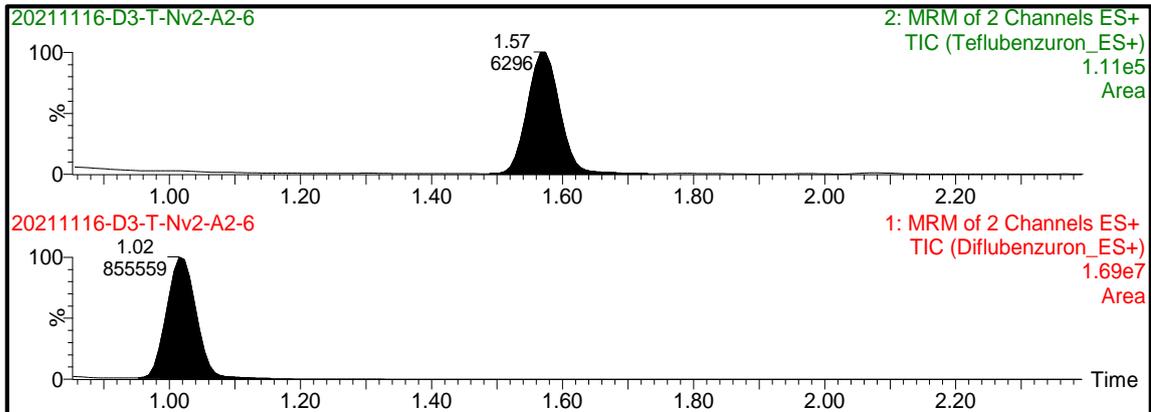
*Cromatograma de la muestra blanco matriz-Trucha Arcoíris.*



*Elaboración mediante el Masslynx del UPLC-MS/MS (2021).*

**Figura 11**

*Cromatograma de la muestra blanco matriz de Trucha Arcoíris más la fortificación (spiked) del estándar mix de Diflubenzuron y Teflubenzuron.*

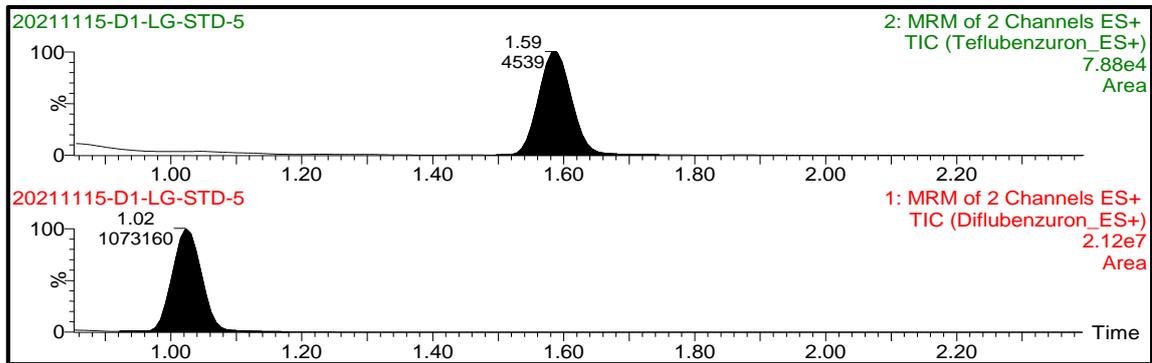


*Elaboración mediante el Masslynx del UPLC-MS/MS (2021).*

- **Para Langostino**, se obtuvieron 3 cromatogramas, en la Figura 12 (Ver p. N° 63) se observa el estándar mix de DFB y TFB, Figura 13 (Ver p. N° 63) se muestra la matriz blanco de langostino y Figura 14 (Ver p. N° 64) la matriz de langostino más la fortificación del estándar mix de DFB y TFB.

**Figura 12**

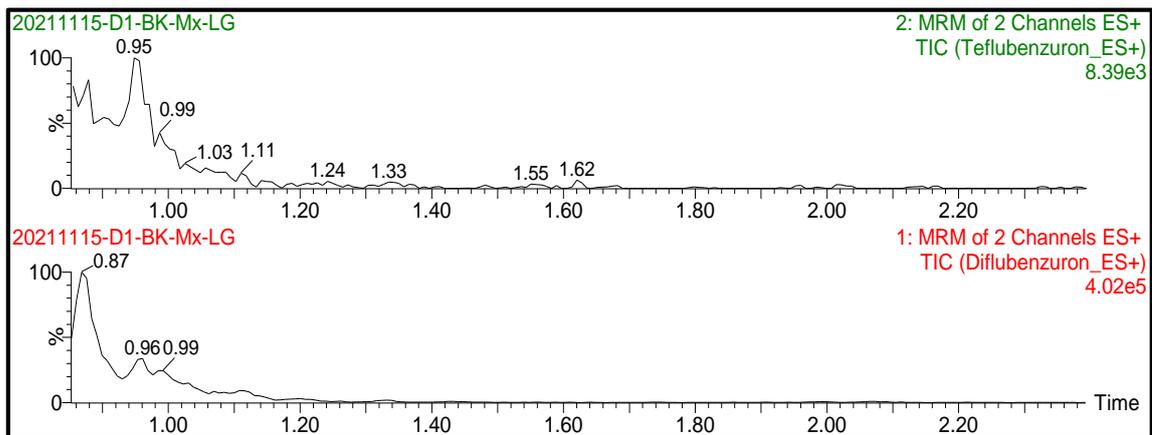
*Cromatograma del estándar mix de Diflubenzuron y Teflubenzuron.*



*Elaboración mediante el Masslynx del UPLC-MS/MS (2021).*

**Figura 13**

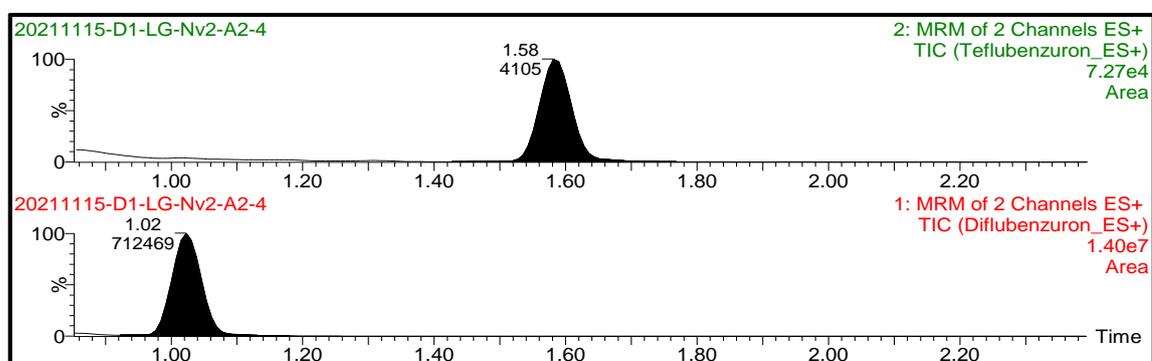
*Cromatograma de la muestra blanco matriz-Langostino.*



*Elaboración mediante el Masslynx del UPLC-MS/MS (2021).*

**Figura 14**

*Cromatograma de la muestra blanco de matriz de Langostino más la fortificación (spiked) del estándar mix de Diflubenzuron y Teflubenzuron.*



*Elaboración mediante el Masslynx del UPLC-MS/MS (2021).*

## 2) Límite de detección (LD) y Límite de cuantificación (LC)

- **Para Trucha arcoíris**, Los resultados de las lecturas de los blancos matriz fortificados a una concentración de 10µg/Kg de DFB y TFB se observan en la Tabla 23.

**Tabla 23**

*Lectura de los blancos fortificados para el cálculo del LD y LC para el Diflubenzuron y Teflubenzuron en Trucha Arcoíris.*

Fecha:	2021-11-09		2021-11-10		2021-11-13	
Blanco fortificado	Diflubenzuron (µg/Kg)	Teflubenzuron (µg/Kg)	Diflubenzuron (µg/Kg)	Teflubenzuron (µg/Kg)	Diflubenzuron (µg/Kg)	Teflubenzuron (µg/Kg)
BK <sub>f</sub> -01	10.14	11.05	9.38	9.23	10.06	11.56
BK <sub>f</sub> -02	9.01	10.00	10.31	10.92	10.44	10.21
BK <sub>f</sub> -03	8.68	8.78	9.85	11.32	9.63	10.58
BK <sub>f</sub> -04	11.35	9.78	10.75	10.01	8.54	10.10
BK <sub>f</sub> -05	9.95	10.60	8.79	9.21	10.28	9.68
BK <sub>f</sub> -06	10.08	10.72	8.85	9.44	8.64	11.22
BK <sub>f</sub> -07	10.56	11.02	10.67	8.45	9.89	10.36

*Elaboración propia en Microsoft Excel.*

En la tabla 24 se observa el cálculo de los límites de detección y cuantificación del método para el Diflubenzuron y Teflubenzuron en Trucha arcoíris, para un T-student de 6 grados de libertad (7 réplicas) al 99% de confianza.

**Tabla 24**

*Estimación del LD y LC del Método al 99% de confianza – Trucha Arcoíris.*

	Diflubenzuron (µg/Kg)	Teflubenzuron (µg/Kg)	Diflubenzuron (µg/Kg)	Teflubenzuron (µg/Kg)	Diflubenzuron (µg/Kg)	Teflubenzuron (µg/Kg)
<b>S</b>	0.901807708	0.818014437	0.818637079	1.019308823	0.763609848	0.655515065
<b>g.l<sub>(n-1)</sub></b>	6	6	6	6	6	6
<b>α</b>	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
<b>t<sub>(n-1)</sub></b>	3.143	3.143	3.143	3.143	3.143	3.143
<b>w (gr)</b>	2	2	2	2	2	2
<b>Factor volumen</b>	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
<b>LDM</b>	2.834082591	2.570748124	2.572704881	3.203349631	2.399772542	2.060066482
<b>LCM</b>	9.018077084	8.180144369	8.186370787	10.19308823	7.63609848	6.555150647

*Elaboración propia en Microsoft Excel.*

El promedio de los resultados de la Tabla 24 del Límite de detección, Límite de cuantificación del DFB y TFB en trucha arcoíris y el criterio de aceptación se observan en la tabla 25:

**Tabla 25**

*Límite de detección y del Límite de cuantificación calculado para el Diflubenzuron y Teflubenzuron en la matriz Trucha Arcoíris.*

	<b>LDM</b>	<b>LCM</b>
<b>Diflubenzuron (µg/Kg)</b>	2.6	8.3
<b>Teflubenzuron (µg/Kg)</b>	2.6	8.3

*Elaboración propia en Microsoft Excel.*

- **Para Langostino**, Los resultados de los blancos matriz fortificados a 62.5µg/Kg para el DFB y 10µg/Kg para el TFB se observan en la Tabla 26 (Ver p. N° 66).

**Tabla 26**

Lectura de los blancos fortificados para el cálculo del LD y LC del Diflubenzuron y Teflubenzuron en Langostino.

Fecha:	2021-11-09		2021-11-10		2021-11-11	
	Diflubenzuron (µg/Kg)	Teflubenzuron (µg/Kg)	Diflubenzuron (µg/Kg)	Teflubenzuron (µg/Kg)	Diflubenzuron (µg/Kg)	Teflubenzuron (µg/Kg)
BK <sub>r</sub> -01	60.92	11.19	56.70	10.58	60.93	11.01
BK <sub>r</sub> -02	66.07	10.42	55.54	9.98	56.14	12.90
BK <sub>r</sub> -03	58.80	11.88	59.15	8.54	57.26	13.27
BK <sub>r</sub> -04	61.38	10.29	56.03	10.52	57.28	10.39
BK <sub>r</sub> -05	60.19	11.30	64.02	10.59	60.14	11.86
BK <sub>r</sub> -06	57.49	12.35	54.02	10.06	52.75	10.32
BK <sub>r</sub> -07	55.31	13.52	57.87	9.15	58.65	9.03

Elaboración propia en Microsoft Excel.

En la tabla 27 se observa el cálculo de los límites de detección y cuantificación del método para el Diflubenzuron y Teflubenzuron en Langostino, para un T-student de 6 grados de libertad (7 réplicas) al 99% de confianza.

**Tabla 27**

Estimación del LD y LC del Método al 99% de confianza – Langostino.

	Diflubenzuron (µg/Kg)	Teflubenzuron (µg/Kg)	Diflubenzuron (µg/Kg)	Teflubenzuron (µg/Kg)	Diflubenzuron (µg/Kg)	Teflubenzuron (µg/Kg)
<b>S</b>	3.400106441	1.131736971	3.266605928	0.792142964	2.72380686	1.51467111
<b>g.l<sub>(n-1)</sub></b>	6	6	6	6	6	6
<b>α</b>	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
<b>t<sub>(n-1)</sub></b>	3.143	3.143	3.143	3.143	3.143	3.143
<b>w (gr)</b>	2	2	2	2	2	2
<b>Factor volumen</b>	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
<b>LDM</b>	10.68540708	3.556674019	10.26585923	2.489442665	8.560021755	4.760109039
<b>LCM</b>	34.00106441	11.31736971	32.66605928	7.921429645	27.2380686	15.1467111

Elaboración propia en Microsoft Excel.

El promedio de los resultados de la Tabla 28 del Límite de detección, Límite de cuantificación del DFB y TFB en langostino y el criterio de aceptación se observan en la tabla 28 (Ver p. N° 67).

**Tabla 28**

*Límite de detección y del Límite de cuantificación calculado del Diflubenzuron y Teflubenzuron en la matriz Langostino.*

	<b>LDM</b>	<b>LCM</b>
<b>Diflubenzuron (µg/Kg)</b>	9.8	31.1
<b>Teflubenzuron (µg/Kg)</b>	3.6	11.5

*Elaboración propia en Microsoft Excel.*

### **3) Linealidad**

Las áreas de las curvas de calibración para los 6 niveles de concentración de Diflubenzuron y Teflubenzuron y durante 3 días se presentan en la Tabla 29 (Ver p. N° 68).

Así mismo, El resumen del análisis de regresión y el análisis de varianza para el Diflubenzuron y el Teflubenzuron se observan en la Tabla 30 (Ver p. N° 69) y la Tabla 31 (Ver p. N° 70) respectivamente.

**Tabla 29**

*Curvas de calibración en 3 días diferentes para el Diflubenzuron.*

<b>Áreas</b>					
<b>Fecha:</b>	<b>09/11/2021</b>	<b>10/11/2021</b>	<b>11/11/2021</b>	<b>X</b>	<b>Y</b>
<b>C (ng/ml)</b>	<b>DIFLUBENZURON</b>	<b>DIFLUBENZURON</b>	<b>DIFLUBENZURON</b>	<b>C (ng/ml)</b>	<b>Promedio Áreas</b>
<b>100</b>	174527.188	174214.828	185426.781	<b>100</b>	<b>178056.266</b>
<b>200</b>	352943.750	347096.188	381069.688	<b>200</b>	<b>360369.875</b>
<b>300</b>	514468.250	556423.563	540830.000	<b>300</b>	<b>537240.604</b>
<b>400</b>	665211.938	677693.250	739303.938	<b>400</b>	<b>694069.709</b>
<b>600</b>	979974.188	1028844.500	1017785.063	<b>600</b>	<b>1008867.917</b>
<b>800</b>	1343123.750	1417792.125	1402407.500	<b>800</b>	<b>1387774.458</b>
<b>C (ng/ml)</b>	<b>TEFLUBENZURON</b>	<b>TEFLUBENZURON</b>	<b>TEFLUBENZURON</b>	<b>C (ng/ml)</b>	<b>Promedio Áreas</b>
<b>10</b>	98.893	111.395	98.630	<b>10</b>	<b>102.973</b>
<b>20</b>	218.179	182.158	211.010	<b>20</b>	<b>203.782</b>
<b>50</b>	568.602	466.451	543.660	<b>50</b>	<b>526.238</b>
<b>100</b>	1084.029	964.647	936.930	<b>100</b>	<b>995.202</b>
<b>200</b>	2082.768	1997.629	2295.453	<b>200</b>	<b>2125.283</b>
<b>400</b>	4479.346	4180.841	3856.195	<b>400</b>	<b>4172.127</b>

*Elaboración propia en Microsoft Excel.*

**Tabla 30***Análisis regresión y análisis de varianza para el Diflubenzuron.*

<b>Estadísticas de la regresión</b>	
Coeficiente de correlación múltiple	0.999454679
Coeficiente de determinación R <sup>2</sup>	0.998909655
R <sup>2</sup> ajustado	0.998637068
Error típico	16365.45604
Observaciones	6

<b>ANÁLISIS DE VARIANZA</b>					
	<b>Grados de libertad</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Promedio de los cuadrados</b>	<b>F</b>	<b>Valor crítico de F</b>
Regresión	1	9.81473E+11	9.81473E+11	3664.56272	4.46E-07
Residuos	4	1071312605	267828151.3		
Total	5	9.82544E+11			

	<b>Coeficientes</b>	<b>Error típico</b>	<b>Estadístico t</b>	<b>Probabilidad</b>	<b>Inferior 95%</b>	<b>Superior 95%</b>	<b>Inferior 95.0%</b>	<b>Superior 95.0%</b>
Intercepción	14786.52858	13064.25667	1.13183084	0.32095948	-21485.6629	51058.72005	-21485.6629	51058.72005
Variable X 1	1699.024857	28.06652555	60.5356318	4.4598E-07	1621.09969	1776.950025	1621.09969	1776.950025

*Elaboración propia en Microsoft Excel.*

**Tabla 31**

*Análisis de regresión y análisis de varianza para el Teflubenzuron.*

<b>Estadísticas de la regresión</b>	
Coeficiente de correlación múltiple	0.999849829
Coeficiente de determinación R <sup>2</sup>	0.99969968
R <sup>2</sup> ajustado	0.9996246
Error típico	30.31306266
Observaciones	6

<b>ANÁLISIS DE VARIANZA</b>					
	<b>Grados de libertad</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Promedio de los cuadrados</b>	<b>F</b>	<b>Valor crítico de F</b>
Regresión	1	12235040.25	12235040.25	13315.14094	3.38E-08
Residuos	4	3675.527071	918.8817677		
Total	5	12238715.77			

	<b>Coeficientes</b>	<b>Error típico</b>	<b>Estadístico t</b>	<b>Probabilidad</b>	<b>Inferior 95%</b>	<b>Superior 95%</b>	<b>Inferior 95.0%</b>	<b>Superior 95.0%</b>
Intercepción	-6.907419654	17.09668446	-0.404021006	0.706865822	-54.37542555	40.56058624	-54.37542555	40.56058624
Variable X 1	10.47057673	0.09073978	115.3912516	3.38254E-08	10.21864272	10.72251075	10.21864272	10.72251075

*Elaboración propia en Microsoft Excel.*

#### 4) Rango de Trabajo

En la Tabla 32 se muestra el intervalo de trabajo en términos de concentración en muestra ( $\mu\text{g}$  de Analito / Kg de matriz).

**Tabla 32**

*Rango de trabajo del método para el Diflubenzuron y Teflubenzuron.*

<b>MATRIZ</b>	<b>DFB (<math>\mu\text{g}/\text{kg}</math>)</b>	<b>TFB (<math>\mu\text{g}/\text{kg}</math>)</b>
Trucha Arcoíris	8.3 - 2000	8.3 - 1000
Langostino	31.3 - 2000	11.5 - 1000

*Elaboración propia*

#### 5) Veracidad

- **Para Trucha arcoíris**

Resultados del Diflubenzuron para el Nivel I de  $250\mu\text{g}/\text{Kg}$ , Nivel II de  $1000\mu\text{g}/\text{Kg}$  y Nivel III de  $1500\mu\text{g}/\text{Kg}$  respecto a sus porcentajes de recuperación y para cada analista en trucha arcoíris se presentan en la Tabla 33.

**Tabla 33**

*Resultados del % Recuperación del DFB respecto a los tres niveles de fortificación en Trucha.*

<b>Analista</b>	<b>DFB</b>		<b>DFB</b>		<b>DFB</b>	
	<b>Nivel I (<math>\mu\text{g}/\text{Kg}</math>)</b>	<b>%Recuperación</b>	<b>Nivel II (<math>\mu\text{g}/\text{Kg}</math>)</b>	<b>%Recuperación</b>	<b>Nivel III (<math>\mu\text{g}/\text{Kg}</math>)</b>	<b>%Recuperación</b>
Analista 1	263.5	105.40%	1026.56	102.66%	1669.26	111.28%
Analista 1	270.79	108.32%	995.2	99.52%	1487.76	99.18%
Analista 1	261.18	104.47%	985.06	98.51%	1539.61	102.64%
Analista 1	259.7	103.88%	972.2	97.22%	1546.86	103.12%
Analista 1	267.75	107.10%	1005.33	100.53%	1576.58	105.11%
Analista 1	285.39	114.16%	976.42	97.64%	1670.3	111.35%
Analista 1	278.18	111.27%	985.27	98.53%	1575.97	105.06%
Analista 1	262.8	105.12%	1022.91	102.29%	1484.92	98.99%
Analista 1	278.32	111.33%	949.65	94.97%	1724.18	114.95%
Analista 1	280.72	112.29%	1032.79	103.28%	1501.44	100.10%
Analista 1	260.96	104.38%	1044.84	104.48%	1495.94	99.73%
Analista 1	279.44	111.78%	1048.14	104.81%	1463.99	97.60%
Analista 1	263.16	105.26%	1007.31	100.73%	1735.06	115.67%
Analista 1	273.65	109.46%	1012.85	101.29%	1536.46	102.43%
Analista 1	266.43	106.57%	1022.55	102.26%	1546.07	103.07%
Analista 2	269.23	107.69%	1001.45	100.15%	1556.07	103.74%

Analista	DFB		DFB		DFB	
	Nivel I ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ )	%Recuperación	Nivel II ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ )	%Recuperación	Nivel III ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ )	%Recuperación
Analista 2	273.62	109.45%	1015.6	101.56%	1524.27	101.62%
Analista 2	278.03	111.21%	985.08	98.51%	1608.4	107.23%
Analista 2	264.83	105.93%	972.91	97.29%	1592.22	106.15%
Analista 2	267.98	107.19%	982.18	98.22%	1409.79	93.99%
Analista 2	269.52	107.81%	966.24	96.62%	1740.8	116.05%
Analista 2	268.4	107.36%	988.57	98.86%	1543.66	102.91%
Analista 2	280.27	112.11%	1017.42	101.74%	1451.65	96.78%
Analista 2	276.03	110.41%	1017.69	101.77%	1509.94	100.66%
Analista 2	275.76	110.30%	970.98	97.10%	1640.71	109.38%
Analista 2	276.89	110.76%	986.54	98.65%	1600.00	106.67%
Analista 2	267.75	107.10%	1053.28	105.33%	1463.62	97.57%
Analista 2	282.27	112.91%	943.13	94.31%	1505.08	100.34%
Analista 2	273.34	109.34%	1059.47	105.95%	1736.28	115.75%
Analista 2	268.81	107.52%	1062.92	106.29%	1518.41	101.23%

*Elaboración propia en Microsoft Excel.*

En la Tabla 34, se presentan los resultados del Teflubenzuron para el Nivel I de  $50\mu\text{g}/\text{Kg}$ , Nivel II de  $500\mu\text{g}/\text{Kg}$  y Nivel III de  $750\mu\text{g}/\text{Kg}$  respecto a sus porcentajes de recuperación y para cada analista en trucha arcoíris.

**Tabla 34**

*Resultados del % Recuperación del TFB respecto a los tres niveles de fortificación en Trucha.*

Analista	TFB		TFB		TFB	
	Nivel I ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ )	%Recuperación	Nivel II ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ )	%Recuperación	Nivel III ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ )	%Recuperación
Analista 1	52.75	105.50%	529.79	105.96%	762.7	101.69%
Analista 1	57.09	114.18%	497.86	99.57%	751.02	100.14%
Analista 1	51.51	103.02%	486.89	97.38%	749.56	99.94%
Analista 1	54.79	109.58%	476.66	95.33%	772.92	103.06%
Analista 1	56.86	113.72%	493.04	98.61%	730.02	97.34%
Analista 1	56.53	113.06%	512.09	102.42%	745.54	99.41%
Analista 1	56.68	113.36%	488.85	97.77%	768.45	102.46%
Analista 1	58.69	117.38%	501.04	100.21%	800.42	106.72%
Analista 1	56.44	112.88%	499.77	99.95%	704.99	94.00%
Analista 1	57.27	114.54%	508.85	101.77%	730.34	97.38%
Analista 1	50.18	100.36%	482.24	96.45%	659.52	87.94%
Analista 1	50.56	101.12%	480.63	96.13%	713.87	95.18%
Analista 1	51.67	103.34%	483.18	96.64%	784.44	104.59%

Analista	TFB		TFB		TFB	
	Nivel I ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ )	%Recuperación	Nivel II ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ )	%Recuperación	Nivel III ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ )	%Recuperación
Analista 1	53.17	106.34%	452.68	90.54%	787.05	104.94%
Analista 1	56.11	112.22%	457.43	91.49%	833.02	111.07%
Analista 2	52.88	105.76%	508.05	101.61%	756.29	100.84%
Analista 2	57.34	114.68%	466.49	93.30%	745.4	99.39%
Analista 2	56.04	112.08%	498.38	99.68%	730.74	97.43%
Analista 2	53.15	106.30%	468.59	93.72%	727.74	97.03%
Analista 2	58.1	116.20%	496.6	99.32%	734.89	97.99%
Analista 2	50.06	100.12%	494.44	98.89%	772.11	102.95%
Analista 2	59.64	119.28%	518.31	103.66%	702.66	93.69%
Analista 2	57.18	114.36%	489.3	97.86%	822.71	109.69%
Analista 2	54.8	109.60%	525.85	105.17%	717.9	95.72%
Analista 2	50.24	100.48%	462.84	92.57%	839.8	111.97%
Analista 2	48.04	96.08%	446.36	89.27%	790.39	105.39%
Analista 2	48.42	96.84%	465.28	93.06%	653.99	87.20%
Analista 2	48.82	97.64%	481.43	96.29%	732.38	97.65%
Analista 2	51.04	102.08%	443.49	88.70%	741.87	98.92%
Analista 2	55.62	111.24%	500.75	100.15%	653.95	87.19%

*Elaboración propia en Microsoft Excel.*

- **Para Langostino**

Los resultados del Diflubenzuron para el Nivel I de  $250\mu\text{g}/\text{Kg}$ , Nivel II de  $1000\mu\text{g}/\text{Kg}$  y Nivel III de  $1750\mu\text{g}/\text{Kg}$  respecto a sus porcentajes de recuperación y para cada analista en langostino se presentan en la Tabla 37.

**Tabla 35**

*Resultados del % Recuperación del DFB respecto a los tres niveles de fortificación en Langostino.*

Analista	DFB		DFB		DFB	
	Nivel I ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ )	%Recuperación	Nivel II ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ )	%Recuperación	Nivel III ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ )	%Recuperación
Analista 1	250.17	100.07%	1126.05	112.61%	1713.66	97.92%
Analista 1	245.47	98.19%	1026.16	102.62%	1767.95	101.03%
Analista 1	244.17	97.67%	1044.98	104.50%	1726.27	98.64%
Analista 1	246.81	98.72%	1097.56	109.76%	1875.71	107.18%
Analista 1	253.36	101.34%	1075.59	107.56%	1890.49	108.03%
Analista 1	253.03	101.21%	1080.24	108.02%	1858.19	106.18%
Analista 1	252.76	101.10%	1135.45	113.55%	1766.19	100.93%

Analista	DFB		DFB		DFB	
	Nivel I ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ )	%Recuperación	Nivel II ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ )	%Recuperación	Nivel III ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ )	%Recuperación
Analista 1	258.54	103.42%	1101.23	110.12%	1819.76	103.99%
Analista 1	242.93	97.17%	1129.25	112.93%	1811.34	103.51%
Analista 1	257.85	103.14%	1112.97	111.30%	1800.36	102.88%
Analista 1	235.37	94.15%	1089.91	108.99%	1708.61	97.63%
Analista 1	250.07	100.03%	1019.02	101.90%	1831.14	104.64%
Analista 1	235.17	94.07%	1041.81	104.18%	1796.37	102.65%
Analista 1	234.26	93.70%	1068.74	106.87%	1783.81	101.93%
Analista 1	236.82	94.73%	1048.31	104.83%	1794.9	102.57%
Analista 2	255.5	102.20%	1061.12	106.11%	1881.1	107.49%
Analista 2	258.28	103.31%	1036.4	103.64%	1797.37	102.71%
Analista 2	247.76	99.10%	1085.83	108.58%	1825.01	104.29%
Analista 2	248.38	99.35%	1017.12	101.71%	1747.52	99.86%
Analista 2	253.12	101.25%	1108.21	110.82%	1715.19	98.01%
Analista 2	262.07	104.83%	1146.03	114.60%	1808.56	103.35%
Analista 2	263.42	105.37%	1067.26	106.73%	1880.01	107.43%
Analista 2	260.88	104.35%	1042.29	104.23%	1767.16	100.98%
Analista 2	239.88	95.95%	1060.49	106.05%	1737.52	99.29%
Analista 2	259.77	103.91%	1062.23	106.22%	1832.69	104.73%
Analista 2	250.72	100.29%	1091.14	109.11%	1822.62	104.15%
Analista 2	237.05	94.82%	1108.44	110.84%	1734.95	99.14%
Analista 2	256.22	102.49%	1025.01	102.50%	1790.55	102.32%
Analista 2	259.73	103.89%	1026.55	102.66%	1789.76	102.27%
Analista 2	233.09	93.24%	1116.93	111.69%	1851.23	105.78%

*Elaboración propia en Microsoft Excel.*

En la Tabla 36 se presentan los resultados del Teflubenzuron para el Nivel I de  $50\mu\text{g}/\text{Kg}$ , Nivel II de  $550\mu\text{g}/\text{Kg}$  y Nivel III de  $1000\mu\text{g}/\text{Kg}$  respecto a sus porcentajes de recuperación y para cada analista en langostino se describen en la Tabla 39.

**Tabla 36**

*Resultados del % Recuperación del TFB respecto a los tres niveles de fortificación en Langostino.*

Analista	TFB		TFB		TFB	
	Nivel I ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ )	%Recuperación	Nivel II ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ )	%Recuperación	Nivel III ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ )	%Recuperación
Analista 1	48.69	97.38%	592.86	107.79%	1005.14	100.51%
Analista 1	53.18	106.36%	537.98	97.81%	992.68	99.27%
Analista 1	51.94	103.88%	563.39	102.43%	1090.78	109.08%

Analista	TFB		TFB		TFB	
	Nivel I (µg/Kg)	%Recuperación	Nivel II (µg/Kg)	%Recuperación	Nivel III (µg/Kg)	%Recuperación
Analista 1	42.79	85.58%	566.75	103.05%	989.35	98.94%
Analista 1	45.72	91.44%	560.94	101.99%	1023.93	102.39%
Analista 1	55.98	111.96%	557.56	101.37%	979.96	98.00%
Analista 1	54.46	108.92%	552.86	100.52%	1001.07	100.11%
Analista 1	59.66	119.32%	561.51	102.09%	1008.08	100.81%
Analista 1	45.39	90.78%	579.94	105.44%	929.52	92.95%
Analista 1	42.09	84.18%	578.82	105.24%	961.1	96.11%
Analista 1	45.51	91.02%	632.3	114.96%	1016.62	101.66%
Analista 1	57.21	114.42%	578.34	105.15%	952.77	95.28%
Analista 1	49.03	98.06%	573.42	104.26%	831.33	83.13%
Analista 1	51.31	102.62%	595.93	108.35%	1018.23	101.82%
Analista 1	46.73	93.46%	607.32	110.42%	982.36	98.24%
Analista 2	56.85	113.70%	529.16	96.21%	860.58	86.06%
Analista 2	42.66	85.32%	563.33	102.42%	969.32	96.93%
Analista 2	47.91	95.82%	558.9	101.62%	1079.06	107.91%
Analista 2	46.23	92.46%	561.43	102.08%	1057.27	105.73%
Analista 2	45.02	90.04%	572.64	104.12%	1025.92	102.59%
Analista 2	56.53	113.06%	611.84	111.24%	1057.98	105.80%
Analista 2	52.72	105.44%	581.17	105.67%	1023.87	102.39%
Analista 2	59.61	119.22%	625.63	113.75%	1028.66	102.87%
Analista 2	52.39	104.78%	564.62	102.66%	990.17	99.02%
Analista 2	40.61	81.22%	568.43	103.35%	954.29	95.43%
Analista 2	54.85	109.70%	608.02	110.55%	930.03	93.00%
Analista 2	54.68	109.36%	601.4	109.35%	1022.25	102.23%
Analista 2	47.01	94.02%	620.29	112.78%	1005.36	100.54%
Analista 2	47.26	94.52%	597.41	108.62%	1064.99	106.50%
Analista 2	56.09	112.18%	614.16	111.67%	1001.61	100.16%

*Elaboración propia en Microsoft Excel.*

## 6) Precisión

En la Tabla 37 (Ver p. N° 76) y la Tabla 38 (Ver p. N° 76), se expresan los RSDr experimentales calculados para cada nivel de fortificación en la Matriz Trucha y Langostino respectivamente.

**Tabla 37***RSD<sub>r</sub> experimental del DFB y TFB para la precisión en Trucha Arcoíris.*

PESTICIDA	NIVEL	% RSD <sub>Exp.</sub>	% RSD <sub>r</sub> – SANTE 12682/2019
Diflubenzuron	I	2.6%	20%
	II	3.2%	20%
	III	5.9%	20%
Teflubenzuron	I	6.2%	20%
	II	4.6%	20%
	III	6.3%	20%

*Elaboración propia en Microsoft Excel.***Tabla 38***RSD<sub>r</sub> experimental del DFB y TFB para la precisión en Langostino.*

PESTICIDA	NIVEL	% RSD <sub>Exp.</sub>	% RSD <sub>r</sub> – SANTE 12682/2019
Diflubenzuron	I	3.6%	20%
	II	3.5%	20%
	III	3.0%	20%
Teflubenzuron	I	11.1%	20%
	II	4.5%	20%
	III	5.7%	20%

*Elaboración propia en Microsoft Excel.***7) Robustez**

Para la robustez se realizó con 5 factores de: Peso de Muestra, Columna cromatográfica, Revoluciones de centrifugado en RPM, Tiempo de extracción y Temperatura de evaporación. Cada factor se trabajó con 2 variables, en la Figura 15 (Ver p. N° 77) se expresan estas variaciones.

**Figura 15***Factores de la Robustez en Trucha Arcoíris y Langostino.*

<b>FACTOR A :</b>	<b>Peso de muestra</b>
Estándar ( A )	2.0 g
Variable ( a )	1.0 g
<b>FACTOR B :</b>	<b>Columna</b>
Estándar ( B )	BEH C18 1.7µm, 2.1 x 100mm
Variable ( b )	HSS T3 1.8 µm, 2.1 x 100mm
<b>FACTOR C:</b>	<b>Temperatura de centrifugado y rpm</b>
Estándar ( C )	4°C y 8000rpm
Variable ( c )	4°C y 4000rpm
<b>FACTOR D:</b>	<b>Tiempo de extracción (fase orgánica)</b>
Estándar ( D )	5 mín.
Variable ( d )	10 mín.
<b>FACTOR E:</b>	<b>Temperatura de evaporación (secado)</b>
Estándar ( E )	45°C +/- 5°C
Variable ( e )	50°C +/- 5°C

*Elaboración propia*

Los resultados de los ensayos en trucha arcoíris y langostino se presentan en la Tabla 39 y Tabla 41 (Ver p. N° 78) y el cálculo de la diferencia de respuesta para cada parámetro se determina en la Tabla 40 (ver p. N° 78) para trucha y en la Tabla 42 (ver p. N° 79) para langostino.

**Tabla 39***Resultados de los ensayos para la Robustez del DFB y TFB en Trucha Arcoíris.*

ENSAYO	1	2	3	4	5	6
DFB	106.40	99.40	104.29	105.44	105.19	102.81
	100.99	102.22	107.34	101.35	101.69	98.22
	97.03	100.64	110.28	100.50	102.81	101.64
Promedio	101.5	100.8	107.3	102.4	103.2	100.9
TFB	127.80	127.21	127.84	123.04	122.74	121.94
	112.40	119.53	121.33	113.06	120.32	126.19
	114.15	113.47	127.07	114.59	118.46	120.14
Promedio	118.1	120.1	125.4	116.9	120.5	122.8
S <sub>r</sub>	DFB	2.454				
	TFB	3.098				

*Elaboración propia en Microsoft Excel.*

**Tabla 40**

*Cálculo de la diferencia de respuesta para cada parámetro de la robustez en Trucha Arcoíris.*

<b>DFB</b>	<b>Variabilidad</b>	<b>Criterio – AEFI,2001</b>
Factor A	2.1644	3.471
Factor B	0.6044	3.471
Factor C	3.2822	3.471
Factor D	1.7222	3.471
Factor E	0.9933	3.471
<b>TFB</b>	<b>Variabilidad</b>	<b>Criterio – AEFI,2001</b>
Factor A	2.7400	4.381
Factor B	4.2400	4.381
Factor C	0.6244	4.381
Factor D	2.1244	4.381
Factor E	1.1467	4.381

*Elaboración propia en Microsoft Excel.*

**Tabla 41**

*Resultados de los ensayos para la Robustez del DFB y TFB en Langostino.*

<b>ENSAYO</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
DFB	1088.32	1001.51	954.63	1089.34	997.63	1071.21
	1082.09	1038.29	1149.96	1078.48	1017.34	1052.69
	1055.32	1090.68	1124.61	1088.93	1099.77	1015.53
Promedio	1075.2	1043.5	1076.4	1085.6	1038.2	1046.5
TFB	523.06	545.66	426.24	511.64	472.20	555.42
	501.86	458.46	562.26	512.30	479.53	566.29
	536.40	532.53	612.58	489.82	526.77	428.64
Promedio	520.4	512.2	533.7	504.6	492.8	516.8
<b>S<sub>r</sub></b>	<b>DFB</b>	20.394				
	<b>TFB</b>	13.963				

*Elaboración propia en Microsoft Excel.*

**Tabla 42**

*Cálculo de la diferencia de respuesta para cada parámetro de la robustez en Langostino.*

<b>DFB</b>	<b>Variabilidad</b>	<b>Criterio – AEFI,2001</b>
Factor A	16.3891	28.842
Factor B	10.9011	28.842
Factor C	11.6724	28.842
Factor D	17.1604	28.842
Factor E	8.2767	28.842
<b>TFB</b>	<b>Variabilidad</b>	<b>Criterio – AEFI,2001</b>
Factor A	1.0234	19.747
Factor B	14.9450	19.747
Factor C	6.1110	19.747
Factor D	9.8574	19.747
Factor E	17.3817	19.747

*Elaboración propia en Microsoft Excel.*

## 8) Incertidumbre

### a) Incertidumbre de la metodología:

Para la incertidumbre de la concentración de la metodología se calculará mediante la derivada parcial de las incertidumbres asociadas de ella según la ecuación 7.

$$\text{Concentración } (\mu\text{g}/\text{Kg}) = \left[ \frac{y - b}{a} \right] x \frac{\frac{V_f(\text{mL})}{V_i(\text{mL})} x V_e(\text{mL})}{W_{(g)}} x D \dots (7)$$

Donde:

- ✓  $V_e$ : Volumen total del extracto (10mL)
- ✓  $D$ : Factor de dilución
- ✓  $W$ : Peso de muestra (g)
- ✓  $V_f$ : Volumen de reconstitución luego de la evaporación (mL)
- ✓  $V_i$ : Volumen inicial tomado antes de la evaporación (mL)
- ✓  $(y-b/a)$ : Concentración de la muestra (C) (ng/mL).

La Concentración del método está expresada en la ecuación 8:

$$C_{MET} = C_o \times \frac{f_c \times V_e}{W} \times f_d \dots (8)$$

La incertidumbre combinada de la concentración del método ( $u^2_{CoMet}$ ) se determinó con la ecuación 9:

$$u^2_{CMet} = u^2_{Co} + u^2_{Ve} + u^2_{Fc} + u^2_{fd} + u^2_W \dots (9)$$

Para la determinación de la incertidumbre típica combinada se tiene la siguiente ecuación:

$$u^2_c(y) = \sum_{i=1}^N \left[ \frac{\partial f}{\partial x_i} \right]^2 u^2(x_i) \dots (10)$$

Aplicando la ecuación (10) y derivadas parciales para cada factor, se tiene:

$$u^2_{CMet} = \left( \frac{\partial C_{Met}}{\partial C_{Met}} \right)^2 (u_{CMet})^2 = (u_{CMet})^2 \dots (11)$$

$$u^2_c = \left( \frac{\partial C_{Met}}{\partial C_o} \right)^2 (u_{Co})^2 = \left( \frac{u_{Co} \times V_e \times F_c \times f_d}{W} \right)^2 \dots (12)$$

$$u^2_{Ve} = \left( \frac{\partial C_{Met}}{\partial V_e} \right)^2 (u_{Ve})^2 = \left( \frac{u_{Ve} \times C_o \times F_c \times f_d}{W} \right)^2 \dots (13)$$

$$u^2_{Fc} = \left( \frac{\partial C_{Met}}{\partial F_c} \right)^2 (u_{Fc})^2 = \left( \frac{u_{Fc} \times C_o \times V_e \times f_d}{W} \right)^2 \dots (14)$$

$$u^2_{fd} = \left( \frac{\partial C_{Met}}{\partial f_d} \right)^2 (u_{fd})^2 = \left( \frac{u_{fd} \times C_o \times V_e \times F_c}{W} \right)^2 \dots (15)$$

$$u^2_W = \left( \frac{\partial C_{Met}}{\partial W} \right)^2 (u_W)^2 = \left( -\frac{u_W \times C_o \times V_e \times F_c \times f_d}{W^2} \right)^2 \dots (16)$$

Reemplazando las ecuaciones (11), (12), (13), (14), (15) y (16) en (9) y despejando la potencia, se tiene:

$$u_{MET} = \sqrt{\left[ \frac{u_{Co} \times V_e \times F_c \times f_d}{W} \right]^2 + \left[ \frac{u_{Ve} \times C_o \times F_c \times f_d}{W} \right]^2 + \left[ \frac{u_{Fc} \times C_o \times V_e \times f_d}{W} \right]^2 + \left[ \frac{u_{fd} \times C_o \times V_e \times F_c}{W} \right]^2 + \left[ -\frac{u_W \times C_o \times V_e \times F_c \times f_d}{W^2} \right]^2}$$

**b) Incertidumbre del sesgo:**

Para la incertidumbre combinada del sesgo está en función de la incertidumbre del estándar de veracidad y el sesgo propiamente dicho, y se determina de la siguiente manera:

$$u^2_{Comb. sesgo} = u^2_{std.verac.} + Sesgo^2$$

Para la incertidumbre del estándar de veracidad, está en función a la incertidumbre del estándar analítico y la incertidumbre del estándar del proceso de veracidad:

$$u^2_{std. verac.} = u^2_{certificado} + u^2_{std proce.verac.}$$

Donde:

$$U_{std proces.verac.} = \frac{S_r}{\sqrt{n}}, S_r: Desviación estándar; n: Número de datos$$

La incertidumbre del sesgo viene dada por:

$$Sesgo Relativo = \frac{\mu - x}{\mu} \times 100\%, \text{ donde } \mu: \text{Es un resultado medio}; X: \text{Resultado esperado}$$

**c) Incertidumbre del analista:**

Se determinó en función a su desviación estándar de repetibilidad intermedia (RSD<sub>r</sub>), la cual está determinada por:

$$U_{Analista} = \frac{X_o \times RSD_r}{100}$$

Teniendo en consideración todas las incertidumbres asociadas al método, la incertidumbre global está determinada por:

$$u_{Global} = \sqrt{u^2_{Metogología} + u^2_{Sesgo} + u^2_{Analista}}$$

Entonces, la incertidumbre expandida al 95% de confianza y un factor de cobertura de K=2, se tiene:

$$U_{Expandida}(\mu g / Kg) = 2 \times u_{Global}$$

## **5.2 Resultados inferenciales**

Debido a que la muestra es aleatoria representativa, no aplica resultados inferenciales.

## **5.3 Otro tipo de resultados estadísticos, de acuerdo a la naturaleza del problema y la Hipótesis.**

No se obtuvieron otros tipos de resultados estadísticos, porque no amerita en la presente investigación.

## VI DISCUSIÓN DE RESULTADOS

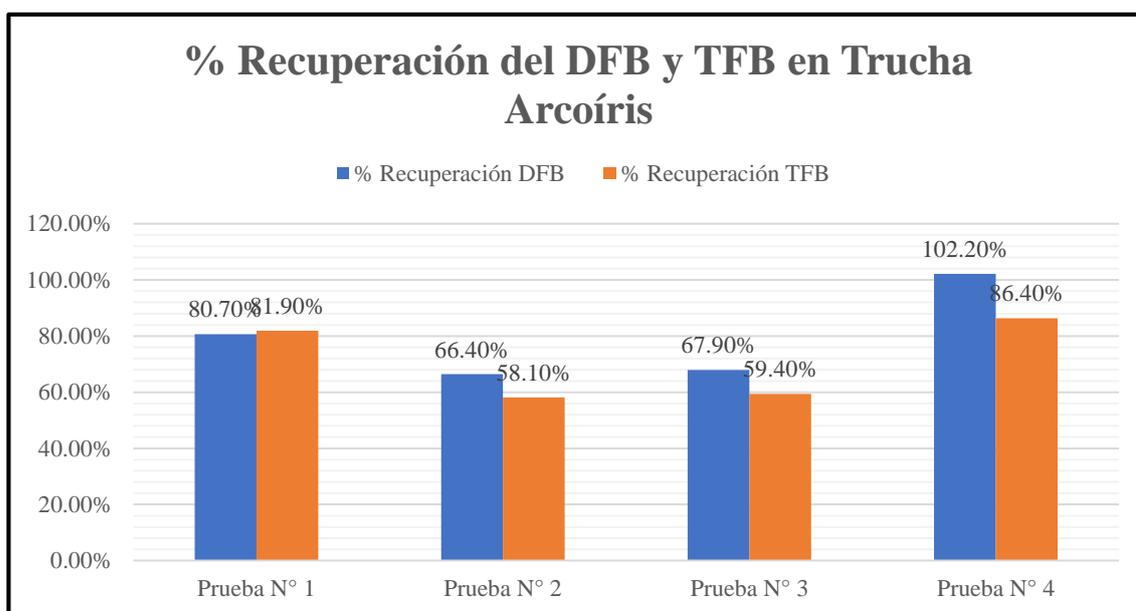
### 6.1 Contrastación y demostración de la hipótesis con los resultados

#### 6.1.1 Desarrollo del método de extracción de pesticidas benzoilúreas

En la Gráfico 1 y Gráfico 2 (Ver p. N° 84) para trucha arcoíris y langostino respectivamente, se determinó que para la prueba N°4 de  $X_{1.1}$ ,  $t_1=5\text{min}$  y para  $X_{1.2}$ ,  $T_1=45^\circ\text{C}$  se tiene una extracción de pesticidas Benzoilúreas más efectiva en términos de % recuperación, por lo tanto, el desarrollo de todas las pruebas posteriores se realizará con estas condiciones.

#### Gráfico 1

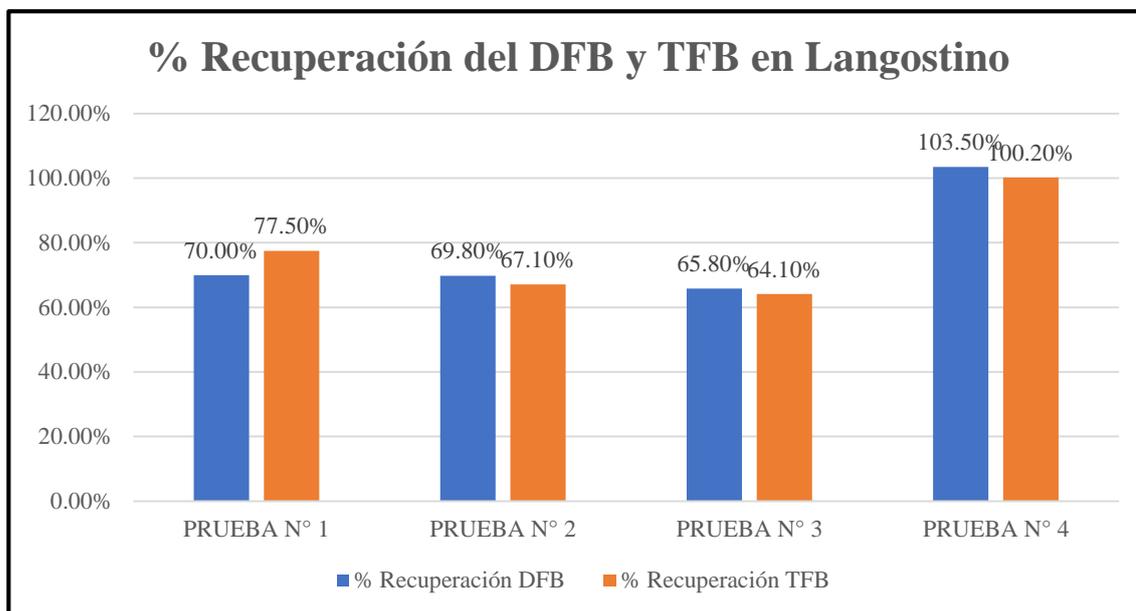
*Resultados del % de recuperación del DFB y TFB en Trucha arcoíris para las pruebas de extracción.*



*Elaboración propia en Microsoft Excel.*

## Gráfico 2

Resultados del % de recuperación del DFB y TFB en Langostino para las pruebas de extracción.



Elaboración propia en Microsoft Excel.

### 6.1.2 Parámetros de desempeño de la validación.

#### a) Selectividad / Especificidad:

En la Figura 10 (Ver p. N° 62) y la Figura 13 (Ver p. N° 63) se observa que no existen interferencias por parte de la matriz en los tiempos de retención del Diflubenzuron y Teflubenzuron, por lo tanto, el método es selectivo para la determinación de pesticidas benzoilureas en pescado y langostino.

Así mismo, la técnica de trabajo fue de un UPLC acoplado a un espectrómetro de masas que implica la detección de 2 transiciones (uno de cuantificación y otro de confirmación del analito), debido a ello, se considera que el método es específico para la determinación de pesticidas benzoilureas en pescado y langostino.

#### b) Límite de detección y cuantificación:

En la Tabla 43 (Ver p. N° 85) y la Tabla 44 (Ver p. N° 85) para Trucha arcoíris y Langostino, se verifica que las fortificaciones realizadas para

determinar el límite de detección cumplen con el criterio de aceptación, por encontrarse entre 1 a 10 veces el LDM calculado.

**Tabla 43**

*Criterio de aceptación del LDM para el DFB y TFB en Trucha arcoíris.*

<b>Criterio de aceptación</b>	
<b>LDM<sub>calculado</sub> &lt; Fortificación &lt; 10xLDM<sub>calculdo</sub></b>	
<b>Diflubenzuron (µg/Kg)</b>	2.6µg/Kg < 10µg/Kg (spiked) < 26 µg/Kg
<b>Teflubenzuron (µg/Kg)</b>	2.6µg/Kg < 10µg/Kg (spiked) < 26 µg/Kg

*Elaboración propia en Microsoft Excel.*

**Tabla 44**

*Criterio de aceptación del LDM para el DFB y TFB en Trucha arcoíris.*

<b>Criterio de aceptación</b>	
<b>LDM<sub>calculado</sub> &lt; Fortificación &lt; 10xLDM<sub>calculdo</sub></b>	
<b>Diflubenzuron (µg/Kg)</b>	9.8µg/Kg < 62.5µg/Kg (spiked) < 98µg/Kg
<b>Teflubenzuron (µg/Kg)</b>	3.6µg/Kg < 10µg/Kg (spiked) < 36µg/Kg

*Elaboración propia en Microsoft Excel.*

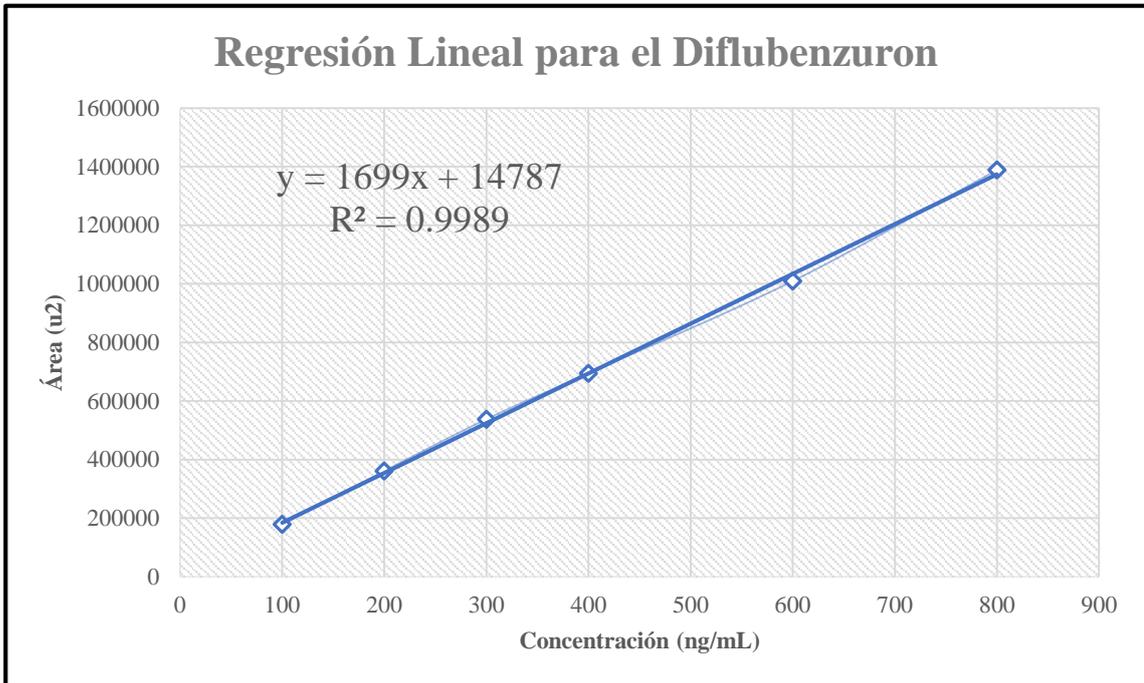
**c) Linealidad:**

Para el diflubenzuron, en la Gráfico 3 (Ver p. N° 86) se presenta la regresión con un ajuste lineal, se comprueba la correlación entre las variables de concentración y área, con un coeficiente de correlación (R) de 0.99945 y un coeficiente de determinación (R<sup>2</sup>) de 0.9989. La ecuación de la curva de calibración para el Diflubenzuron está determinada por:

$$\text{Área} = 1699.024857 \times \text{Concentración} + 14786.52858$$

**Gráfico 3**

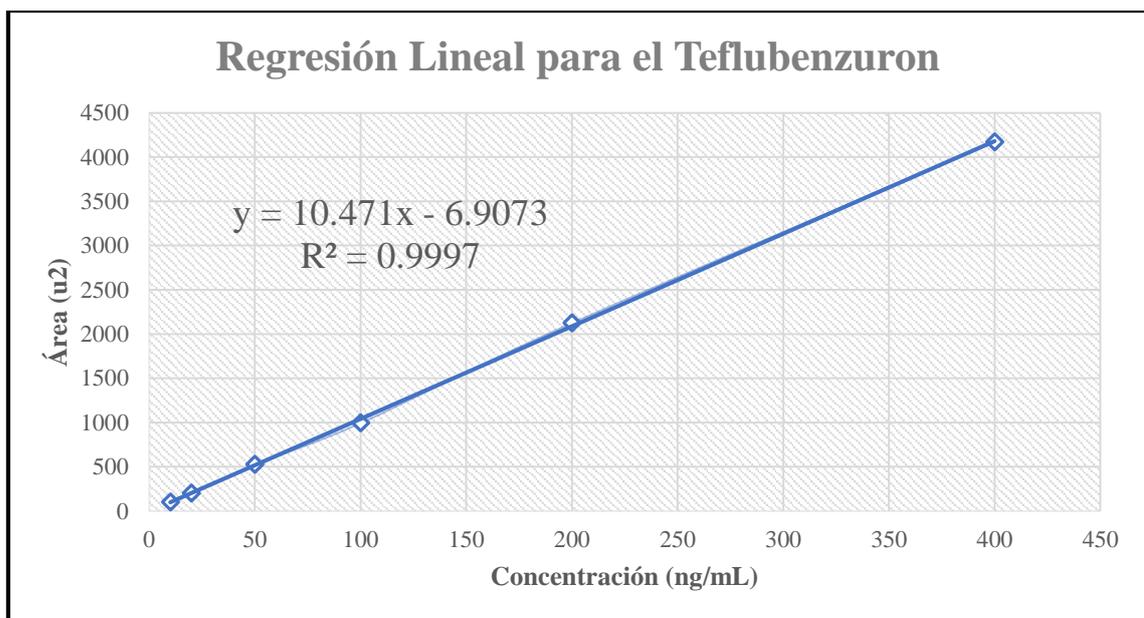
*Regresión lineal para el Diflubenzuron*



*Elaboración propia en Microsoft Excel.*

**Gráfico 4**

*Regresión lineal para el Teflubenzuron*



*Elaboración propia en Microsoft Excel.*

**Para el teflubenzuron**, de igual manera como se observa en el Gráfico 4 (Ver p. N°86) se presenta la regresión con un ajuste lineal, se comprueba la correlación entre las variables de concentración y área, con un coeficiente de correlación (R) de 0.999849 y un coeficiente de determinación (R<sup>2</sup>) de 0.9997. La ecuación de la curva de calibración para el Diflubenzuron está determinada por:

$$\text{Área} = 10.47057 \times \text{Concentración} - 6.907419$$

**d) Rango de trabajo:**

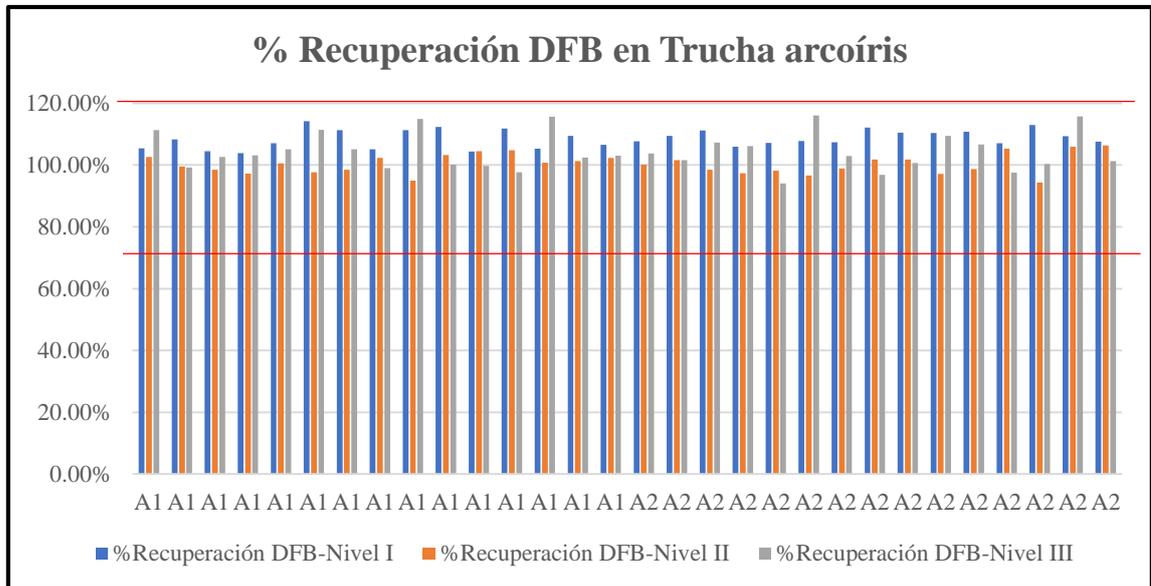
En la Tabla 32 (Ver p. N° 71) se definen los rangos de trabajo del Diflubenzuron y Teflubenzuron para la determinación de pesticidas Benzoilureas en pescado y langostino.

**e) Veracidad:**

En el Gráfico 5 (Ver p. N° 88) para los % Recuperación del Diflubenzuron, Gráfico 6 (Ver p. N° 88) para los % Recuperación del Teflubenzuron en Trucha arcoíris y el Gráfico 7 (Ver p. N° 89) para los % Recuperación del Diflubenzuron y Gráfico 8 (Ver p. N° 89) para los % Recuperación del Teflubenzuron en Langostino se observa y comprueba que el método analítico para la determinación de pesticidas benzoilureas en trucha y langostino es veraz, porque los % recuperaciones obtenidas se encuentran dentro del criterio de aceptación del 70% al 120% de recuperación según el documento N° SANTE/12682/2019.

**Gráfico 5**

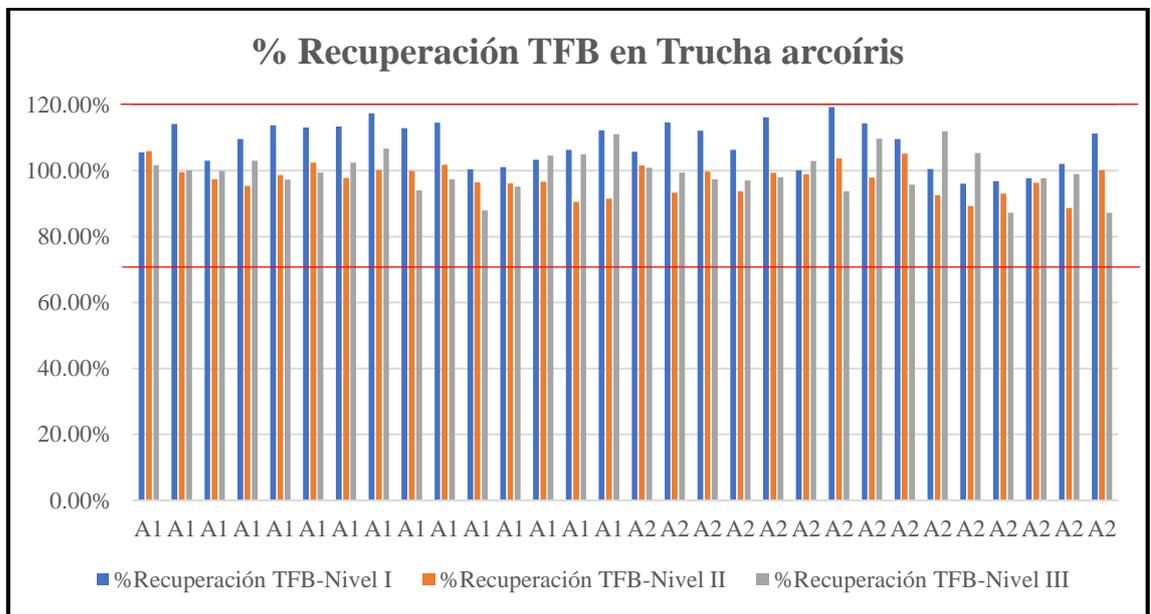
*Porcentaje de Recuperación del DFB en los tres niveles de fortificación para Trucha arcoíris.*



*Elaboración propia en Microsoft Excel.*

**Gráfico 6**

*Porcentaje de Recuperación del TFB en los tres niveles de fortificación para Trucha arcoíris.*



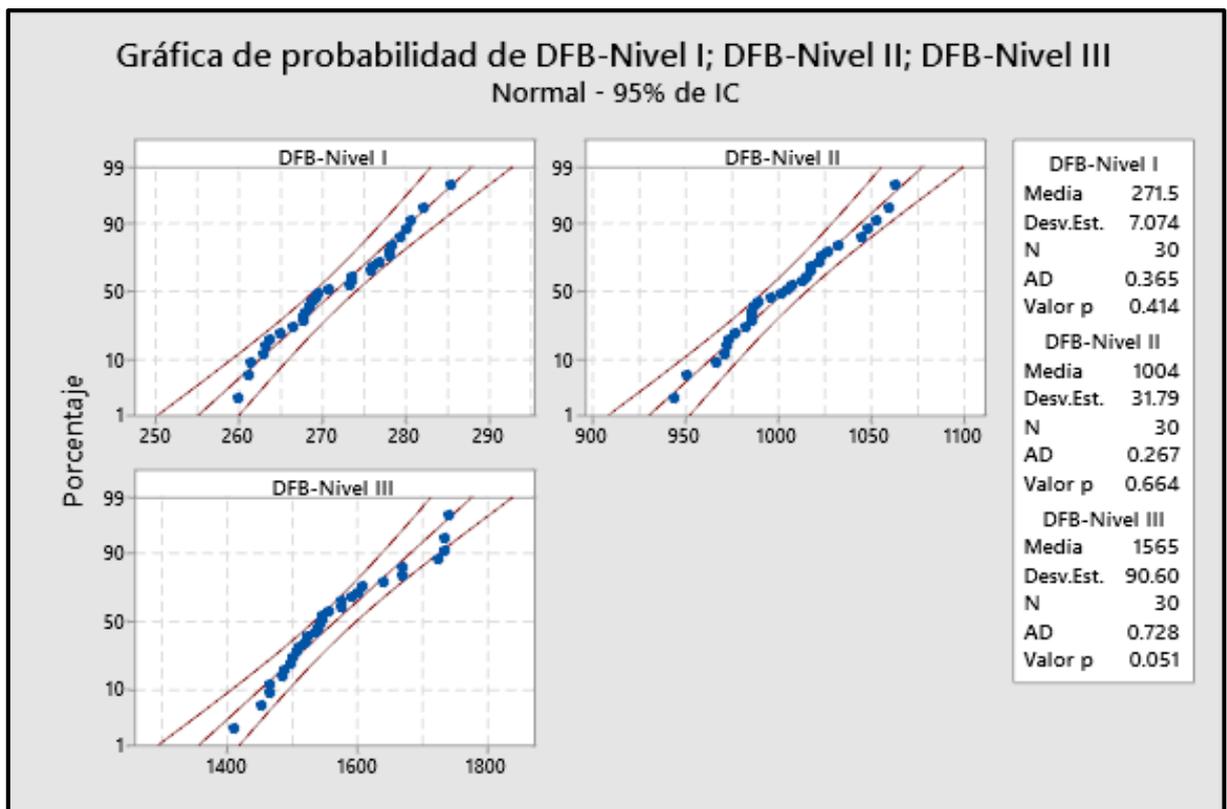
*Elaboración propia en Microsoft Excel.*



Además, de los resultados de trucha y langostino para el diflubenzuron, teflubenzuron en los tres niveles de fortificación se realizó la prueba de normalidad de Anderson-Darling, y se obtuvo que provienen de una distribución normal, debido a que el  $P_{\text{valor}} > 0.05$ , tal y como se muestran en el Gráfico 9, Gráfico 10 (Ver p. N° 91), Gráfico 11 (Ver p. N° 91) y Gráfico 12 (Ver p. N° 92).

### Gráfico 9

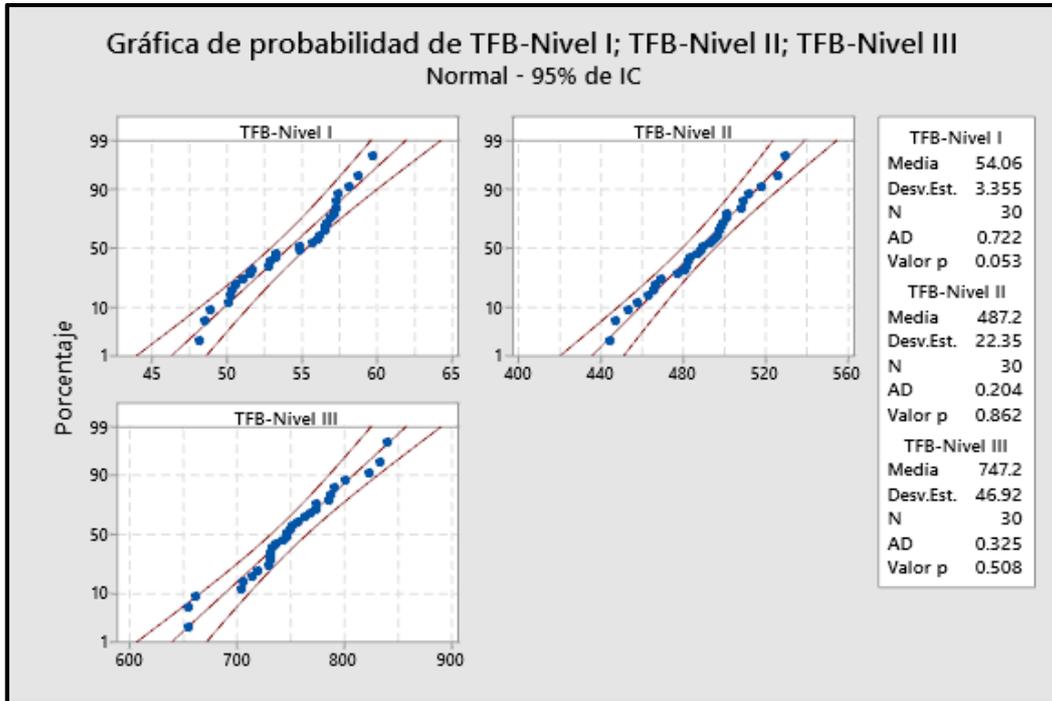
*Prueba de normalidad Anderson-Darling para el Diflubenzuron en Trucha arcoíris.*



*Elaboración con Minitab 19.*

### Gráfico 10

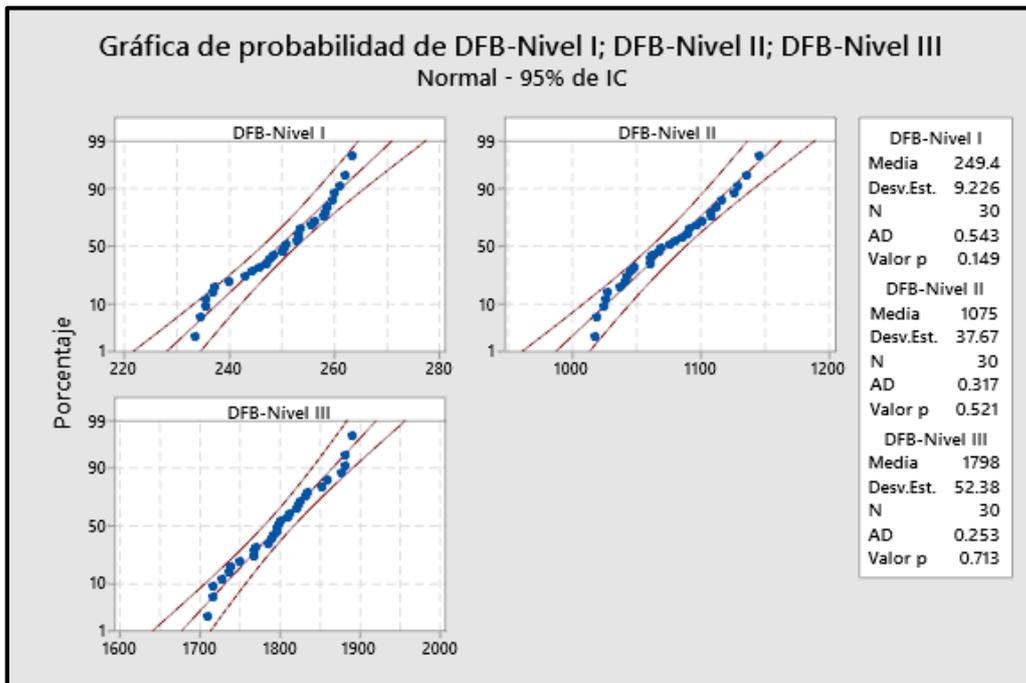
Prueba de normalidad Anderson-Darling para el Teflubenzuron en Trucha arcoíris.



Elaboración en Minitab 19.

### Gráfico 11

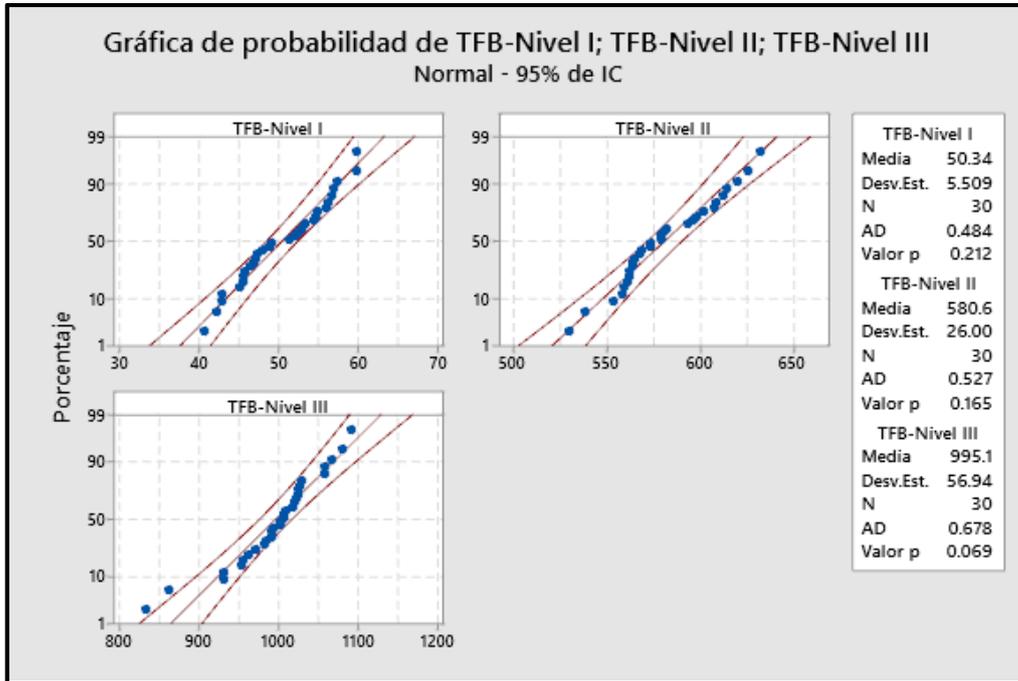
Prueba de normalidad Anderson-Darling para el Diflubenzuron en Langostino.



Elaboración con Minitab 19.

**Gráfico 12**

*Prueba de normalidad Anderson-Darling para el Teflubenzuron en Langostino.*



*Elaboración con Minitab19.*

Así mismo, para el cálculo de la existencia de datos atípicos, se calculó el z-score; la Tabla 45 de los resultados del Diflubenzuron en trucha, la Tabla 46 (Ver p. N° 93) de los resultados del Teflubenzuron en trucha y la Tabla 47 (Ver p. N° 94) de los resultados del Diflubenzuron en Langostino no presentan datos atípicos. Por otro lado, en la Tabla N°48 (Ver p. N° 95) de los resultados del Teflubenzuron en Langostino se obtienen 2 datos cuestionables, sin embargo, se consideran aceptables por encontrarse dentro del criterio de aceptación del 70% - 120% según el documento N° SANTE 12682/2019.

**Tabla 45**

*Cálculo del Z-score para el Diflubenzuron en trucha y en los tres niveles de fortificación.*

ANALISTA	z-score Nivel I	CALIFICACIÓN	z-score Nivel II	CALIFICACIÓN	z-score Nivel III	CALIFICACIÓN
<b>Analista 1</b>	-1.12953	SATISFACTORIO	0.71958	SATISFACTORIO	1.14884	SATISFACTORIO
<b>Analista 1</b>	-0.09896	SATISFACTORIO	-0.26690	SATISFACTORIO	-0.85450	SATISFACTORIO
<b>Analista 1</b>	-1.45750	SATISFACTORIO	-0.58587	SATISFACTORIO	-0.28220	SATISFACTORIO
<b>Analista 1</b>	-1.66673	SATISFACTORIO	-0.99040	SATISFACTORIO	-0.20217	SATISFACTORIO

<b>ANALISTA</b>	<b>z-score Nivel I</b>	<b>CALIFICACIÓN</b>	<b>z-score Nivel II</b>	<b>CALIFICACIÓN</b>	<b>z-score Nivel III</b>	<b>CALIFICACIÓN</b>
<b>Analista 1</b>	-0.52872	SATISFACTORIO	0.05176	SATISFACTORIO	0.12587	SATISFACTORIO
<b>Analista 1</b>	1.96501	SATISFACTORIO	-0.85766	SATISFACTORIO	1.16032	SATISFACTORIO
<b>Analista 1</b>	0.94575	SATISFACTORIO	-0.57926	SATISFACTORIO	0.11913	SATISFACTORIO
<b>Analista 1</b>	-1.22849	SATISFACTORIO	0.60476	SATISFACTORIO	-0.88585	SATISFACTORIO
<b>Analista 1</b>	0.96554	SATISFACTORIO	-1.69975	SATISFACTORIO	1.75503	SATISFACTORIO
<b>Analista 1</b>	1.30483	SATISFACTORIO	0.91556	SATISFACTORIO	-0.70351	SATISFACTORIO
<b>Analista 1</b>	-1.48860	SATISFACTORIO	1.29461	SATISFACTORIO	-0.76421	SATISFACTORIO
<b>Analista 1</b>	1.12387	SATISFACTORIO	1.39842	SATISFACTORIO	-1.11687	SATISFACTORIO
<b>Analista 1</b>	-1.17759	SATISFACTORIO	0.11404	SATISFACTORIO	1.87512	SATISFACTORIO
<b>Analista 1</b>	0.30535	SATISFACTORIO	0.28831	SATISFACTORIO	-0.31697	SATISFACTORIO
<b>Analista 1</b>	-0.71532	SATISFACTORIO	0.59344	SATISFACTORIO	-0.21089	SATISFACTORIO
<b>Analista 2</b>	-0.31949	SATISFACTORIO	-0.07030	SATISFACTORIO	-0.10052	SATISFACTORIO
<b>Analista 2</b>	0.30111	SATISFACTORIO	0.37482	SATISFACTORIO	-0.45152	SATISFACTORIO
<b>Analista 2</b>	0.92455	SATISFACTORIO	-0.58524	SATISFACTORIO	0.47709	SATISFACTORIO
<b>Analista 2</b>	-0.94151	SATISFACTORIO	-0.96807	SATISFACTORIO	0.29850	SATISFACTORIO
<b>Analista 2</b>	-0.49620	SATISFACTORIO	-0.67647	SATISFACTORIO	-1.71511	SATISFACTORIO
<b>Analista 2</b>	-0.27849	SATISFACTORIO	-1.17788	SATISFACTORIO	1.93848	SATISFACTORIO
<b>Analista 2</b>	-0.43683	SATISFACTORIO	-0.47546	SATISFACTORIO	-0.23749	SATISFACTORIO
<b>Analista 2</b>	1.24121	SATISFACTORIO	0.43207	SATISFACTORIO	-1.25307	SATISFACTORIO
<b>Analista 2</b>	0.64181	SATISFACTORIO	0.44056	SATISFACTORIO	-0.60969	SATISFACTORIO
<b>Analista 2</b>	0.60364	SATISFACTORIO	-1.02878	SATISFACTORIO	0.83371	SATISFACTORIO
<b>Analista 2</b>	0.76339	SATISFACTORIO	-0.53931	SATISFACTORIO	0.38437	SATISFACTORIO
<b>Analista 2</b>	-0.52872	SATISFACTORIO	1.56010	SATISFACTORIO	-1.12095	SATISFACTORIO
<b>Analista 2</b>	1.52395	SATISFACTORIO	-1.90485	SATISFACTORIO	-0.66333	SATISFACTORIO
<b>Analista 2</b>	0.26153	SATISFACTORIO	1.75482	SATISFACTORIO	1.88859	SATISFACTORIO
<b>Analista 2</b>	-0.37887	SATISFACTORIO	1.86335	SATISFACTORIO	-0.51620	SATISFACTORIO

*Elaboración con Minitab 19 y Microsoft Excel.*

**Tabla 46**

*Cálculo del Z-score para el Teflubenzuron en trucha y en los tres niveles de fortificación.*

<b>ANALISTA</b>	<b>z-score Nivel I</b>	<b>CALIFICACIÓN</b>	<b>z-score Nivel II</b>	<b>CALIFICACIÓN</b>	<b>z-score Nivel III</b>	<b>CALIFICACIÓN</b>
<b>Analista 1</b>	-0.38916	SATISFACTORIO	1.90386	SATISFACTORIO	0.32990	SATISFACTORIO
<b>Analista 1</b>	0.90439	SATISFACTORIO	0.47523	SATISFACTORIO	0.08094	SATISFACTORIO
<b>Analista 1</b>	-0.75874	SATISFACTORIO	-0.01560	SATISFACTORIO	0.04982	SATISFACTORIO
<b>Analista 1</b>	0.21887	SATISFACTORIO	-0.47332	SATISFACTORIO	0.54773	SATISFACTORIO
<b>Analista 1</b>	0.83584	SATISFACTORIO	0.25957	SATISFACTORIO	-0.36667	SATISFACTORIO
<b>Analista 1</b>	0.73748	SATISFACTORIO	1.11192	SATISFACTORIO	-0.03587	SATISFACTORIO
<b>Analista 1</b>	0.78219	SATISFACTORIO	0.07210	SATISFACTORIO	0.45246	SATISFACTORIO

<b>ANALISTA</b>	<b>z-score Nivel I</b>	<b>CALIFICACIÓN</b>	<b>z-score Nivel II</b>	<b>CALIFICACIÓN</b>	<b>z-score Nivel III</b>	<b>CALIFICACIÓN</b>
<b>Analista 1</b>	1.38127	SATISFACTORIO	0.61751	SATISFACTORIO	1.13389	SATISFACTORIO
<b>Analista 1</b>	0.71066	SATISFACTORIO	0.56069	SATISFACTORIO	-0.90018	SATISFACTORIO
<b>Analista 1</b>	0.95804	SATISFACTORIO	0.96695	SATISFACTORIO	-0.35985	SATISFACTORIO
<b>Analista 1</b>	-1.15515	SATISFACTORIO	-0.22365	SATISFACTORIO	-1.86936	SATISFACTORIO
<b>Analista 1</b>	-1.04189	SATISFACTORIO	-0.29569	SATISFACTORIO	-0.71090	SATISFACTORIO
<b>Analista 1</b>	-0.71105	SATISFACTORIO	-0.18160	SATISFACTORIO	0.79328	SATISFACTORIO
<b>Analista 1</b>	-0.26398	SATISFACTORIO	-1.54625	SATISFACTORIO	0.84891	SATISFACTORIO
<b>Analista 1</b>	0.61230	SATISFACTORIO	-1.33372	SATISFACTORIO	1.82875	SATISFACTORIO
<b>Analista 2</b>	-0.35041	SATISFACTORIO	0.93116	SATISFACTORIO	0.19327	SATISFACTORIO
<b>Analista 2</b>	0.97890	SATISFACTORIO	-0.92835	SATISFACTORIO	-0.03885	SATISFACTORIO
<b>Analista 2</b>	0.59144	SATISFACTORIO	0.49849	SATISFACTORIO	-0.35132	SATISFACTORIO
<b>Analista 2</b>	-0.26994	SATISFACTORIO	-0.83439	SATISFACTORIO	-0.41527	SATISFACTORIO
<b>Analista 2</b>	1.20542	SATISFACTORIO	0.41885	SATISFACTORIO	-0.26287	SATISFACTORIO
<b>Analista 2</b>	-1.19092	SATISFACTORIO	0.32221	SATISFACTORIO	0.53047	SATISFACTORIO
<b>Analista 2</b>	1.66442	SATISFACTORIO	1.39022	SATISFACTORIO	-0.94984	SATISFACTORIO
<b>Analista 2</b>	0.93122	SATISFACTORIO	0.09223	SATISFACTORIO	1.60900	SATISFACTORIO
<b>Analista 2</b>	0.22185	SATISFACTORIO	1.72758	SATISFACTORIO	-0.62501	SATISFACTORIO
<b>Analista 2</b>	-1.13727	SATISFACTORIO	-1.09166	SATISFACTORIO	1.97326	SATISFACTORIO
<b>Analista 2</b>	-1.79298	SATISFACTORIO	-1.82902	SATISFACTORIO	0.92010	SATISFACTORIO
<b>Analista 2</b>	-1.67972	SATISFACTORIO	-0.98249	SATISFACTORIO	-1.98723	SATISFACTORIO
<b>Analista 2</b>	-1.56050	SATISFACTORIO	-0.25990	SATISFACTORIO	-0.31637	SATISFACTORIO
<b>Analista 2</b>	-0.89883	SATISFACTORIO	-1.95743	SATISFACTORIO	-0.11409	SATISFACTORIO
<b>Analista 2</b>	0.46625	SATISFACTORIO	0.60453	SATISFACTORIO	-1.98809	SATISFACTORIO

*Elaboración con Minitab y Microsoft Excel.*

**Tabla 47**

*Cálculo del Z-score para el Diflubenzuron en Langostino y en los tres niveles de fortificación.*

<b>ANALISTA</b>	<b>z-score Nivel I</b>	<b>CALIFICACIÓN</b>	<b>z-score Nivel II</b>	<b>CALIFICACIÓN</b>	<b>z-score Nivel III</b>	<b>CALIFICACIÓN</b>
<b>Analista 1</b>	0.08111	SATISFACTORIO	1.35316	SATISFACTORIO	-1.60119	SATISFACTORIO
<b>Analista 1</b>	-0.42832	SATISFACTORIO	-1.29860	SATISFACTORIO	-0.56476	SATISFACTORIO
<b>Analista 1</b>	-0.56922	SATISFACTORIO	-0.79899	SATISFACTORIO	-1.36046	SATISFACTORIO
<b>Analista 1</b>	-0.28308	SATISFACTORIO	0.59684	SATISFACTORIO	1.49245	SATISFACTORIO
<b>Analista 1</b>	0.42687	SATISFACTORIO	0.01361	SATISFACTORIO	1.77461	SATISFACTORIO
<b>Analista 1</b>	0.39110	SATISFACTORIO	0.13705	SATISFACTORIO	1.15798	SATISFACTORIO
<b>Analista 1</b>	0.36184	SATISFACTORIO	1.60270	SATISFACTORIO	-0.59836	SATISFACTORIO
<b>Analista 1</b>	0.98833	SATISFACTORIO	0.69427	SATISFACTORIO	0.42433	SATISFACTORIO
<b>Analista 1</b>	-0.70362	SATISFACTORIO	1.43811	SATISFACTORIO	0.26358	SATISFACTORIO

<b>ANALISTA</b>	<b>z-score Nivel I</b>	<b>CALIFICACIÓN</b>	<b>z-score Nivel II</b>	<b>CALIFICACIÓN</b>	<b>z-score Nivel III</b>	<b>CALIFICACIÓN</b>
<b>Analista 1</b>	0.91354	SATISFACTORIO	1.00593	SATISFACTORIO	0.05397	SATISFACTORIO
<b>Analista 1</b>	-1.52304	SATISFACTORIO	0.39376	SATISFACTORIO	-1.69760	SATISFACTORIO
<b>Analista 1</b>	0.07027	SATISFACTORIO	-1.48814	SATISFACTORIO	0.64158	SATISFACTORIO
<b>Analista 1</b>	-1.54472	SATISFACTORIO	-0.88314	SATISFACTORIO	-0.02220	SATISFACTORIO
<b>Analista 1</b>	-1.64336	SATISFACTORIO	-0.16824	SATISFACTORIO	-0.26198	SATISFACTORIO
<b>Analista 1</b>	-1.36588	SATISFACTORIO	-0.71059	SATISFACTORIO	-0.05027	SATISFACTORIO
<b>Analista 2</b>	0.65882	SATISFACTORIO	-0.37052	SATISFACTORIO	1.59535	SATISFACTORIO
<b>Analista 2</b>	0.96014	SATISFACTORIO	-1.02676	SATISFACTORIO	-0.00311	SATISFACTORIO
<b>Analista 2</b>	-0.18011	SATISFACTORIO	0.28545	SATISFACTORIO	0.52455	SATISFACTORIO
<b>Analista 2</b>	-0.11291	SATISFACTORIO	-1.53858	SATISFACTORIO	-0.95478	SATISFACTORIO
<b>Analista 2</b>	0.40086	SATISFACTORIO	0.87957	SATISFACTORIO	-1.57198	SATISFACTORIO
<b>Analista 2</b>	1.37094	SATISFACTORIO	1.88357	SATISFACTORIO	0.21051	SATISFACTORIO
<b>Analista 2</b>	1.51726	SATISFACTORIO	-0.20753	SATISFACTORIO	1.57454	SATISFACTORIO
<b>Analista 2</b>	1.24196	SATISFACTORIO	-0.87040	SATISFACTORIO	-0.57984	SATISFACTORIO
<b>Analista 2</b>	-1.03421	SATISFACTORIO	-0.38725	SATISFACTORIO	-1.14569	SATISFACTORIO
<b>Analista 2</b>	1.12164	SATISFACTORIO	-0.34106	SATISFACTORIO	0.67117	SATISFACTORIO
<b>Analista 2</b>	0.14072	SATISFACTORIO	0.42641	SATISFACTORIO	0.47893	SATISFACTORIO
<b>Analista 2</b>	-1.34095	SATISFACTORIO	0.88567	SATISFACTORIO	-1.19475	SATISFACTORIO
<b>Analista 2</b>	0.73686	SATISFACTORIO	-1.32913	SATISFACTORIO	-0.13331	SATISFACTORIO
<b>Analista 2</b>	1.11731	SATISFACTORIO	-1.28825	SATISFACTORIO	-0.14839	SATISFACTORIO
<b>Analista 2</b>	-1.77017	SATISFACTORIO	1.11106	SATISFACTORIO	1.02511	SATISFACTORIO

*Elaboración con Minitab 19 y Microsoft Excel.*

**Tabla 48**

*Cálculo del Z-score para el Teflubenzuron en Langostino y en los tres niveles de fortificación.*

<b>ANALISTA</b>	<b>z-score Nivel I</b>	<b>CALIFICACIÓN</b>	<b>z-score Nivel II</b>	<b>CALIFICACIÓN</b>	<b>z-score Nivel III</b>	<b>CALIFICACIÓN</b>
<b>Analista 1</b>	-0.298955	SATISFACTORIO	0.4710137	SATISFACTORIO	0.17558474	SATISFACTORIO
<b>Analista 1</b>	0.5160465	SATISFACTORIO	-1.6394148	SATISFACTORIO	-0.0432522	SATISFACTORIO
<b>Analista 1</b>	0.2909682	SATISFACTORIO	-0.6622649	SATISFACTORIO	1.67969353	SATISFACTORIO
<b>Analista 1</b>	-1.369892	SATISFACTORIO	-0.533055	SATISFACTORIO	-0.1017375	SATISFACTORIO
<b>Analista 1</b>	-0.838054	SATISFACTORIO	-0.7564804	SATISFACTORIO	0.50559646	SATISFACTORIO
<b>Analista 1</b>	1.0242878	SATISFACTORIO	-0.8864594	SATISFACTORIO	-0.2666556	SATISFACTORIO
<b>Analista 1</b>	0.7483854	SATISFACTORIO	-1.0671995	SATISFACTORIO	0.10410269	SATISFACTORIO
<b>Analista 1</b>	1.6922622	SATISFACTORIO	-0.7345609	SATISFACTORIO	0.22722042	SATISFACTORIO
<b>Analista 1</b>	-0.897954	SATISFACTORIO	-0.0258292	SATISFACTORIO	-1.1525412	SATISFACTORIO
<b>Analista 1</b>	-1.496952	SATISFACTORIO	-0.0688991	SATISFACTORIO	-0.5978967	SATISFACTORIO
<b>Analista 1</b>	-0.876172	SATISFACTORIO	1.98769191	SATISFACTORIO	0.37720978	SATISFACTORIO

ANALISTA	z-score Nivel I	CALIFICACIÓN	z-score Nivel II	CALIFICACIÓN	z-score Nivel III	CALIFICACIÓN
Analista 1	1.247551	SATISFACTORIO	-0.0873577	SATISFACTORIO	-0.7441978	SATISFACTORIO
Analista 1	-0.23724	SATISFACTORIO	-0.2765579	SATISFACTORIO	-2.8770676	CUESTIONABLE
Analista 1	0.1766139	SATISFACTORIO	0.58907156	SATISFACTORIO	0.40548647	SATISFACTORIO
Analista 1	-0.654724	SATISFACTORIO	1.02707777	SATISFACTORIO	-0.224504	SATISFACTORIO
Analista 2	1.1822057	SATISFACTORIO	-1.9785908	SATISFACTORIO	-2.3633453	CUESTIONABLE
Analista 2	-1.393489	SATISFACTORIO	-0.6645722	SATISFACTORIO	-0.4535276	SATISFACTORIO
Analista 2	-0.440536	SATISFACTORIO	-0.8349293	SATISFACTORIO	1.47385332	SATISFACTORIO
Analista 2	-0.745481	SATISFACTORIO	-0.7376373	SATISFACTORIO	1.09115213	SATISFACTORIO
Analista 2	-0.965114	SATISFACTORIO	-0.3065531	SATISFACTORIO	0.54054715	SATISFACTORIO
Analista 2	1.1241209	SATISFACTORIO	1.20089586	SATISFACTORIO	1.10362197	SATISFACTORIO
Analista 2	0.4325497	SATISFACTORIO	0.02147089	SATISFACTORIO	0.50454267	SATISFACTORIO
Analista 2	1.6831864	SATISFACTORIO	1.73119486	SATISFACTORIO	0.5886702	SATISFACTORIO
Analista 2	0.3726498	SATISFACTORIO	-0.6149648	SATISFACTORIO	-0.0873357	SATISFACTORIO
Analista 2	-1.765594	SATISFACTORIO	-0.46845	SATISFACTORIO	-0.7175018	SATISFACTORIO
Analista 2	0.8191761	SATISFACTORIO	1.0539965	SATISFACTORIO	-1.143584	SATISFACTORIO
Analista 2	0.7883186	SATISFACTORIO	0.79942222	SATISFACTORIO	0.47609036	SATISFACTORIO
Analista 2	-0.6039	SATISFACTORIO	1.5258434	SATISFACTORIO	0.17944863	SATISFACTORIO
Analista 2	-0.558521	SATISFACTORIO	0.64598545	SATISFACTORIO	1.2267397	SATISFACTORIO
Analista 2	1.0442545	SATISFACTORIO	1.29011223	SATISFACTORIO	0.11358679	SATISFACTORIO

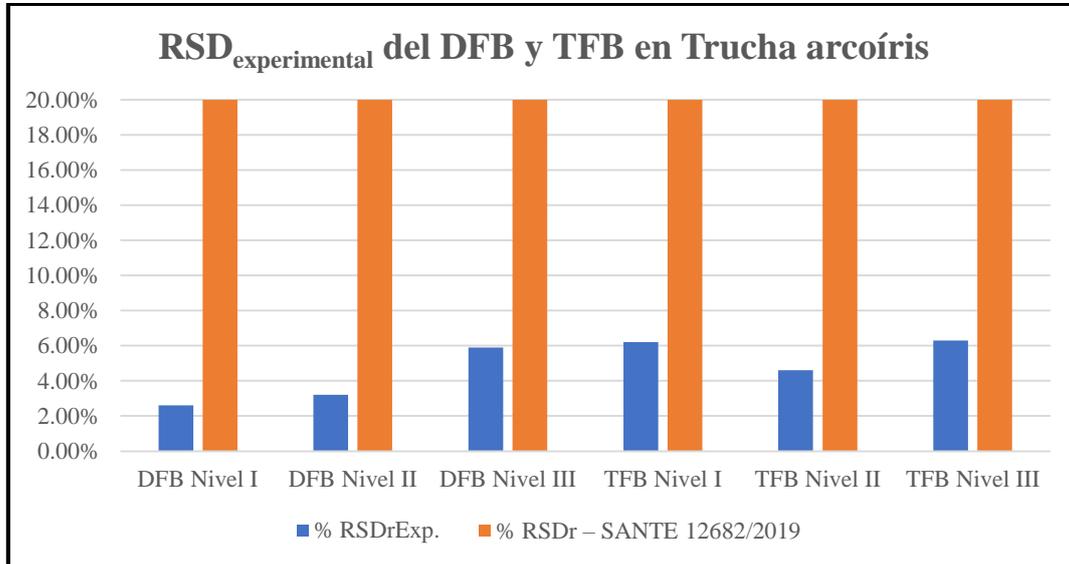
*Elaboración con Minitab 19 y Microsoft Excel.*

#### f) Precisión:

De la Gráfica 13 (Ver p. N° 97) y Gráfica 14 (Ver p. N° 97) se observa y comprueba que el método analítico para la determinación de pesticidas benzoilureas en trucha y langostino es preciso, debido a que cumple el criterio de aceptación donde el  $RSD_{\text{experimental}}$  no excede al 20% según el documento N° SANTE/12682/2019.

**Gráfico 13**

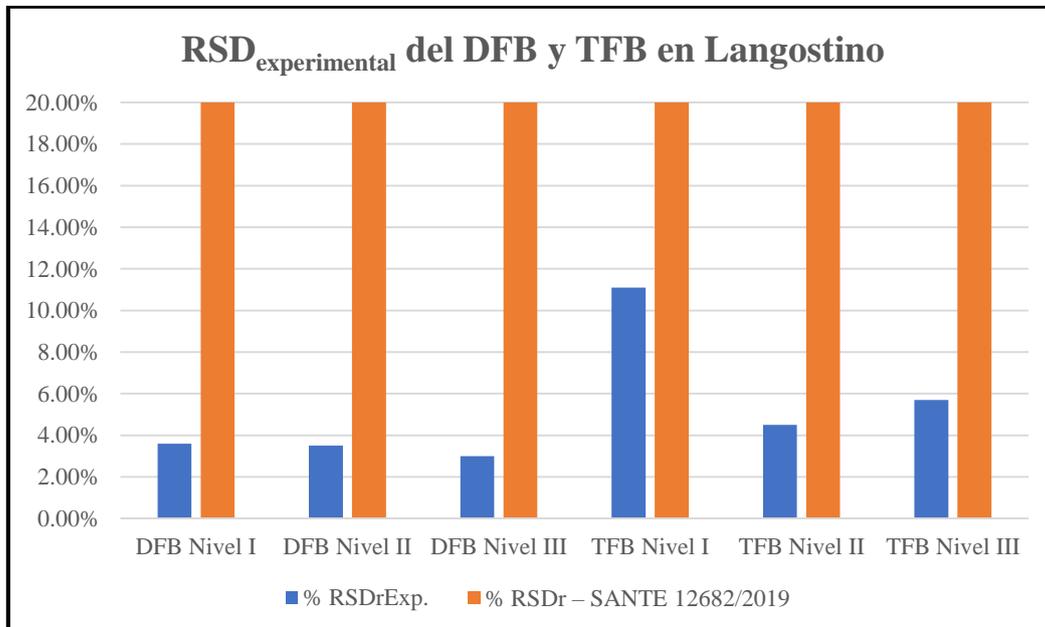
*Comparación del  $RSD_{experimental}$  en los 3 niveles de fortificación para el DFB y TFB en Trucha arcoíris.*



*Elaboración en Microsoft Excel.*

**Gráfico 14**

*Comparación del  $RSD_{experimental}$  en los 3 niveles de fortificación para el DFB y TFB en Langostino.*



*Elaboración en Microsoft Excel.*

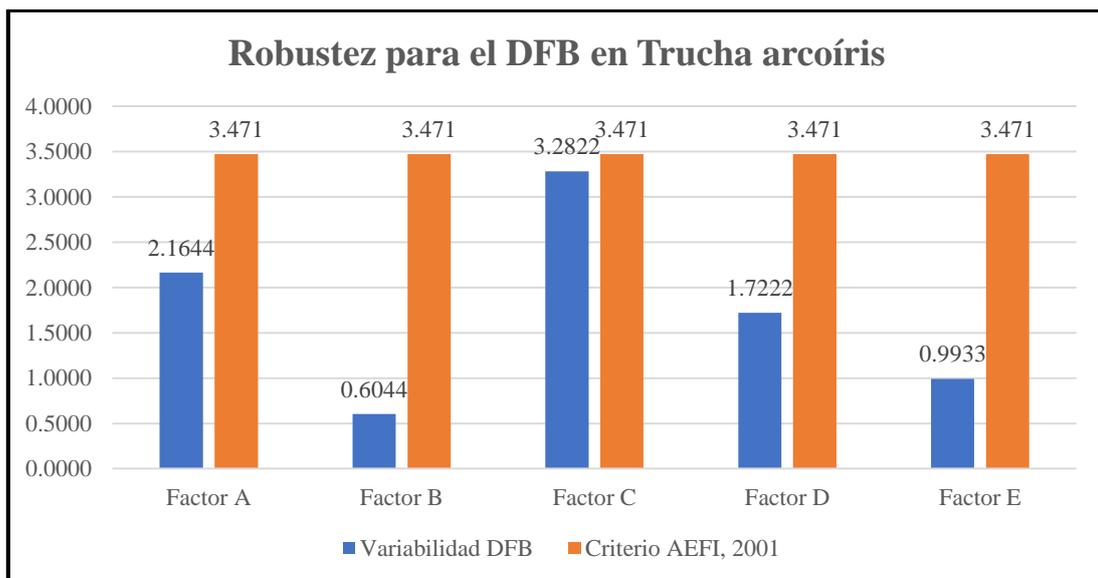
### g) Robustez:

La variación realizada a cada factor no influye significativamente en el método ya que cumplen el criterio de la AEFI, 2001, donde “la raíz cuadrada de dos multiplicado por la desviación estándar de los resultados de los 5 ensayos” es mayor a la “variabilidad calculada por cada factor”, tal y como se observa en el Gráfico 15 y Gráfico 16 (Ver p. N° 99) del DFB y TFB respectivamente en trucha arcoíris y en el Gráfico 17 (Ver p. N° 99) y Gráfico 18 (Ver p. N° 100) del DFB y TFB respectivamente en langostino. Debido a esto, se comprueba que:

- El método es Robusto cuando se modificó el peso de muestra de 2g a 1g.
- El método es Robusto al cambiar la columna BEH C18 1.7 $\mu$ m, 2.1 x 100mm a HSS T3 1.8 $\mu$ m, 2.1 x 100mm.
- El método es Robusto al cambiar las revoluciones de centrifugado de 8000RPM a 4000RPM.
- El método es Robusto cuando se modificó el tiempo de extracción de 5min a 10min.
- El método es Robusto al modificar la temperatura de concentración de 45°C  $\pm$  5°C a 50°C  $\pm$  5°C.

### Gráfico 15

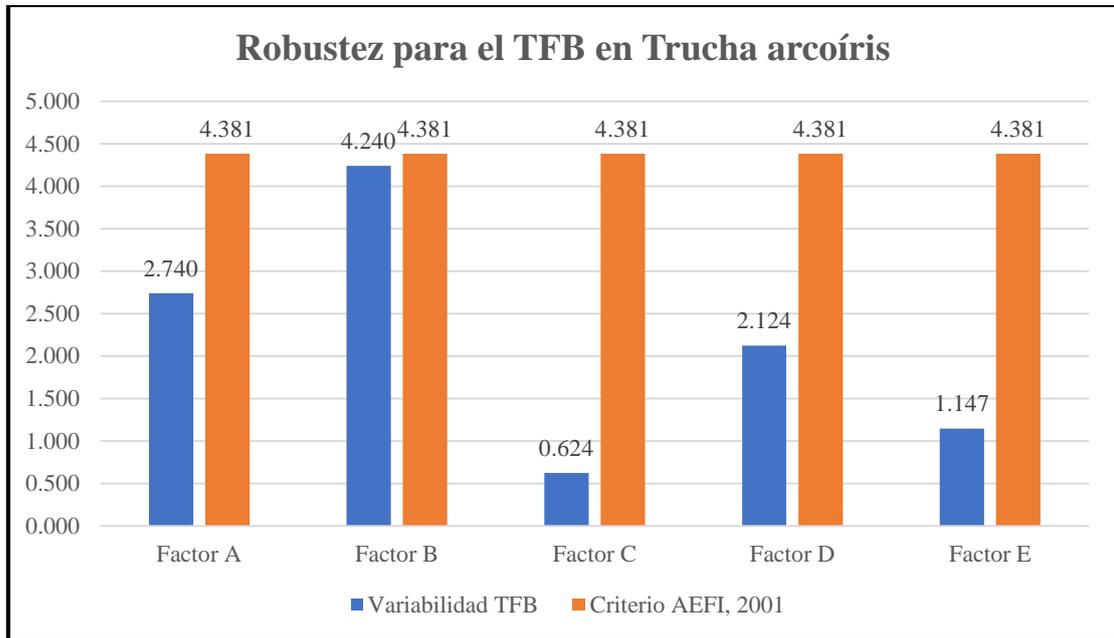
*Robustez del Diflubenzuron en Trucha arcoíris.*



*Elaboración en Microsoft Excel.*

**Gráfico 16**

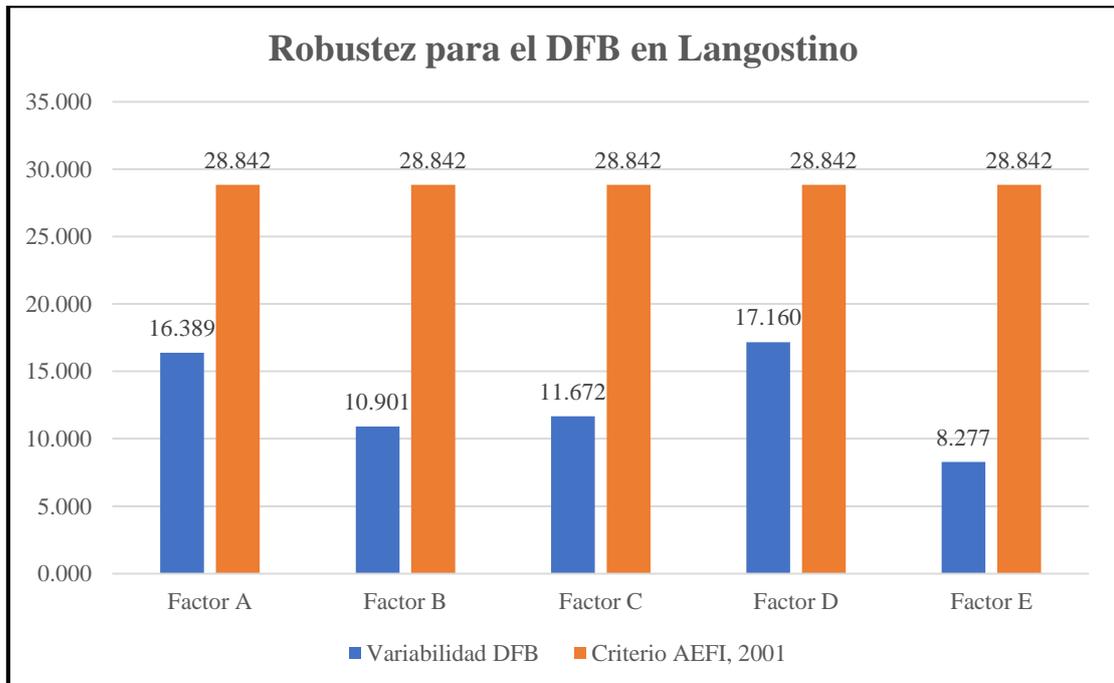
*Robustez del Teflubenzuron en Trucha arcoíris.*



*Elaboración en Microsoft Excel.*

**Gráfico 17**

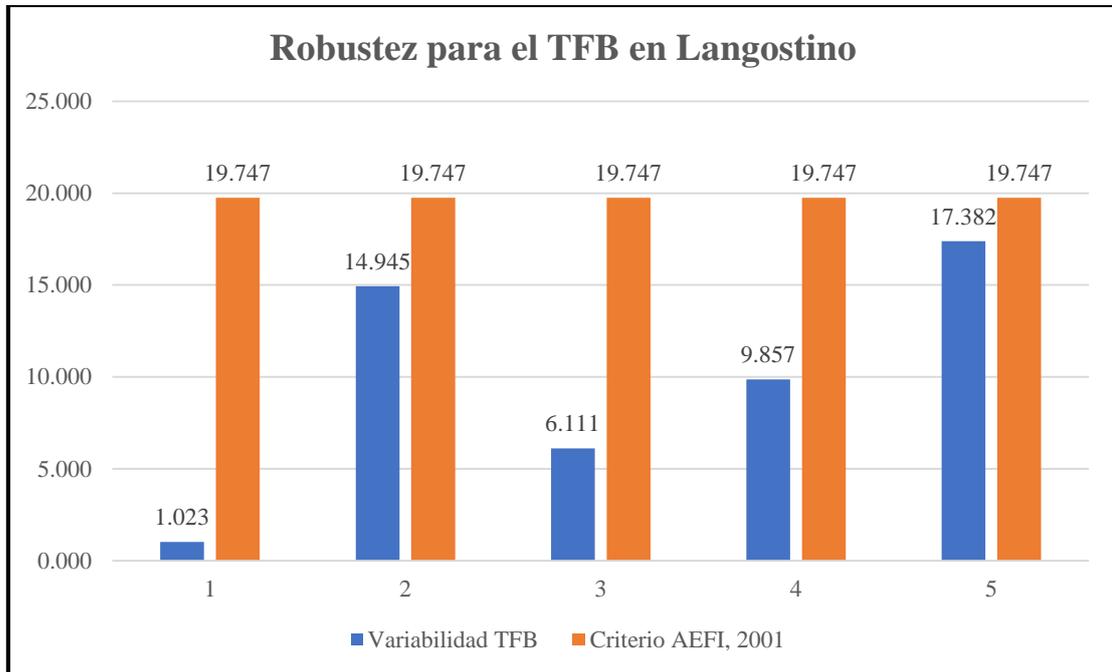
*Robustez del Diflubenzuron en Langostino.*



*Elaboración en Microsoft Excel.*

### Gráfico 18

*Robustez del Diflubenzuron en Langostino.*



*Elaboración en Microsoft Excel.*

#### **h) Incertidumbre:**

Mediante la determinación de las ecuaciones de cada fuente de incertidumbre, estas se plasmaron en una hoja de cálculo (**Ver Anexo 1**) para su desarrollo de manera rutinaria en el laboratorio de control de calidad y seguridad alimentaria del CITEacuícola UPCH.

#### **6.2 Contrastación de los resultados con otros estudios similares**

Para Smith, S., Gieseke, C., Reimschuessel, R., Decker, C. S., y Carson M., (2009), en su trabajo de investigación “Detección y confirmación simultánea de múltiples clases de residuos de medicamentos en peces mediante cromatografía líquida y espectrometría de masas con trampas de iones”, realizan una extracción de residuos de medicamentos (incluidos el Diflubenzuron y Teflubenzuron) mediante una extracción simple con ACN y hexano para descartar grasa presente en la matriz. En sus condiciones cromatográficas lo realizan mediante elución en gradiente que pasó de 3%B en 0min a 40%B a

11min, 65%B a 13min, 85%B a 14min, 100%B a 15 min y se mantuvo en 100%B hasta los 17min para luego retornar al 3%B a 18min y se equilibró a 3%B a 23min, logrando así un tiempo de lectura de 23min. Además, se obtuvieron recuperaciones mayores al 50% en las cuatro matrices (trucha, siluros, salmón y tilapia).

En contraste con mis resultados del desarrollo y validación de un método analítico para la determinación de pesticidas benzoilureas por cromatografía líquida acoplado a espectrometría de masas con un detector triple cuadrupolo, el método se realizó mediante la técnica de QuEChERS modificado (quickly, easy, Cheap, effective, rugged & safe) la cual consistió en una extracción de pesticidas benzoilureas en fase sólida dispersiva con Acetonitrilo, C18 y la amina primaria secundaria (PSA) para una mejor limpieza de matriz y así reducir los posibles interferentes presentes en ella. Para las condiciones cromatográficas del método se trabajó con una elución isocrática con un tiempo de lectura optimizado de 3.5min a un flujo constante de 30% de fase móvil A y 70% de fase móvil B. Además, en la validación del método se demostró estadísticamente que el método es verás, con recuperaciones del 94% al 116.1% de Diflubenzuron en trucha, 87.2% al 119.3% de Teflubenzuron en Trucha, 93.2% al 114.6% de Diflubenzuron en langostino y de 81.2% al 119.3% de Teflubenzuron en langostino. El método es preciso por presentar desviaciones estándar experimentales en condiciones de repetibilidad intermedia RSDr (experimental) menores al 20%.

### **6.3 Responsabilidad ética de acuerdo con los reglamentos vigentes**

De acuerdo a la Resolución de Consejo Universitario N° 260-2019-CU, del CÓDIGO DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DEL CALLAO, Yo Vega Cornelio Roy Angello, autor de la presente tesis me responsabilizo por la información emitida en el presente trabajo de tesis.

## VII CONCLUSIONES

- Se desarrolló y validó el método analítico para la determinación de pesticidas benzoilureas en pescado y langostino por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas triple cuadrupolo en el laboratorio de control de calidad y seguridad alimentaria del CITEacuícola UPCH, demostrando estadísticamente que el método cumple con los parámetros de desempeño de Selectividad, especificidad, linealidad, rango de trabajo, límite de detección, límite de cuantificación, veracidad, precisión, robustez e incertidumbre bajo la Directriz para la Validación de métodos de ensayo DA-acr-20D ver.00 de la NTP ISO/IEC 17025:2017.
- Se desarrolló un método eficiente en términos de porcentaje de recuperación (%R) para la extracción de pesticidas benzoilureas en pescado y langostino, con una extracción del 102.2% de Diflubenzuron y 86.4% de Teflubenzuron en trucha arcoíris; y 103.5% en Diflubenzuron y 100.2% de Teflubenzuron en Langostino.
- Se determinó las condiciones cromatográficas del equipo UPLC-MS/MS para la determinación de pesticidas benzoilureas, optimizando los tiempos de análisis a 3.5 minutos, con un flujo de 0.4 $\mu$ L/min de una mezcla de 30% fase móvil A (5mM formiato de amonio) y 70% fase móvil B (Acetonitrilo), con una columna cromatográfica ACQUITY UPLC BECH C18, 100mm x 2.1mm 1.7 $\mu$ m, a una temperatura de columna de 40°C y una inyección de flujo de 2 $\mu$ L. Además, se definió las condiciones del espectrómetro de masas con una polaridad ESI+, un voltaje de capilar de 3KV, una temperatura de la fuente a 150°C, la temperatura de desolvatación de 500°C, un flujo de gas de desolvatación a 1000L/H y un flujo de gas de cono a 150 L/H.

## VIII RECOMENDACIONES

- Trabajar con guantes de nitrilo, con resistencia química para evitar el contacto directo con los estándares de pesticidas de alta pureza y toxicidad. Así mismo, trabajar en una campana extractora de gases al momento de utilizar la acetona como disolvente para preparar los estándar stocks.
- Para criterios de aceptación de residuos de pesticidas, trabajar en conjunto con el documento N° SANTE 12682/2019, control de calidad analítico y procedimientos de validación del método para el análisis de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos.
- Acondicionar el equipo UPLC-MS/MS con un mínimo de 45min con las condiciones cromatográficas determinadas para así obtener picos cromatográficos bien definidos. Además, al final de cada batch de análisis, lavar la columna cromatográfica aproximadamente 60 minutos con agua y finalizar con 30 minutos de acetonitrilo para evitar su saturación y deformación de picos cromatográficos.

## IX REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Carro, A., García, D., Gonzales, P., y Lorenzo, R. (2012) Determination of chemotherapeutic agents in fish and shellfish by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Science Journal*, 35 (21) 2866 – 2874.
- Eurolab España. P.P. Morillas y colaboradores. Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos – Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados (1ª ed. 2016).
- Garlito, B., Ibáñez, M., Portolés, T., Serrano, R., Amlund, H., Lundebye, A., Sanden, M., Berntssen, M., y Hernández, F. (2019) LCMS/MS method for the determination of organophosphorus pesticides and their metabolites in salmon and zebrafish fed with plant-based feed ingredients. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 411 (27), 7281–7291.
- Lazartigues, A., Wiest, L., Baudot, R., Thomas, M., Feidt, C., y Cren-Olivé, C. (2011) Multiresidue method to quantify pesticides in fish muscle by QueChERS-based extraction and LC-MS/MS. *Analytical bioanalytical Chemistry*, 400 (7) 2185 – 2193.
- Shin, D., Kim, J., y Kang, H. (2021) Simultaneous determination of multi-pesticide residues in fish and shrimp using dispersive-solid phase extraction with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Elsevier*, 120 (2021) 107552.
- Smith, S., Giesecker, C., Reimschuessel, R., Decker, C. S., y Carson M. (2009) Simultaneous screening and confirmation of multiple classes of drug residues in fish by liquid chromatography-Ion trap mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1216 (46) 8224–8232.
- Choi, S., Kim, S., Shin, J., Kim, M., y Kim, J. (2014) Development and verification for analysis of pesticides in eggs and egg products using QuEChERS and LC-MS/MS., *Food Chemistry*, 173 (2015) 1236-1242.
- Guimaraes, L., Ramkumar, A., Moloney, M., Scherer, M., Ferreira, F., Prester, O., y Danaher, M., (2019) Vibrational extraction QuEChERS for analysis of antiparasitic agents in fish by liquid chromatography couple with tandem

- mass spectrometry, *Analytical and Bioanalytical chemistry*, 411 (2019) 6913-6929.
- Vittoria, M., Postigo, C., Guillem, N., Monllor, L., Izabelle, J., Stella, E., Barceló, D., y López, M. (2019) Analysis of 52 pesticides in fresh fish muscle by QuEChERS extraction followed by LC–MS/MS, *Elsevier*, 653(2019), 958–967.
- Furlani, R., Gomes, F., Tfouni, S., y Camargo, M., (February 6, 2014). Development of an Analytical Method for Determination of Antiparasitics Residues in Milk Using QuEChERS and Analysis by LC-MS/MS. *Agilent Technologies, Inc.* <https://www.agilent.com/cs/library/applications/5991-3948EN.pdf>
- Instituto Nacional de la Calidad. (2017). *Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración* (NTP – ISO/IEC 17025:2017).
- Reglamento (UE) N°37/2010 de la comisión. 22 de diciembre del 2009. Relativo a las sustancias farmacológicamente activas y su clasificación por lo que se refiere a los límites máximos de residuos en los productos alimenticios de origen animal.
- Document N° SANTE/12682/2019. 01 de enero Del 2020, Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed. EU Reference Laboratories for Residues of Pesticides. Recuperado de:  
[www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlALL/AqcGuidance\\_SANTE\\_2019\\_12682.pdf](http://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlALL/AqcGuidance_SANTE_2019_12682.pdf).
- Ley N° 30063 del 2013. Ley de Creación del Organismo Nacional de Sanidad Pesquera (SANIPES). 10 de julio de 2013. D.O El Peruano N° 498981 Decreto Supremo N° 012–2013–PRODUCE [con fuerza de ley] Por medio del cual aprueban Reglamento de la Ley N° 30363, Ley de Creación del Organismo Nacional de Sanidad Pesquera (SANIPES). 27 de diciembre de 2013 D.O El Peruano N° 411269.

- Organismo Nacional de Sanidad Pesquera – SANIPES. (2020). Informe de la Subdirección de Sanidad Acuícola 2017 – 2019 <https://www.sanipes.gob.pe/difusion-informe-sanidad-acuicola/archivos/INFORME-DE-SANIDAD-APROBADO-JUNIO-2020.pdf>.
- Organización Mundial de la Salud. (2017) Manual sobre la elaboración y uso de las especificaciones de plaguicidas de la FAO y la OMS. Roma, Italia. Recuperado de: <http://www.fao.org/3/l5713s/l5713s.pdf>
- Organización Mundial de la Salud. (2010) Directrices para el registro de plaguicidas. Roma, Italia. Recuperado de: [http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/70602/WHO\\_HTM\\_NTD\\_WHOPEPES\\_2010.7\\_spa.pdf?sequence=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/70602/WHO_HTM_NTD_WHOPEPES_2010.7_spa.pdf?sequence=1)
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación de la Agricultura. (2020). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020 La sostenibilidad en acción. Roma. Recuperado de: <https://doi.org/10.4060/ca9229es>
- Centro Español de Metrología. VIM: Vocabulario Internacional de Metrología Conceptos fundamentales y general, y términos asociados. (3<sup>ra</sup> ed. 2012).
- Centro Español de Metrología. Evaluación de datos de medición – Guía para la expresión de la incertidumbre media. (3<sup>ra</sup> ed. En Esp. 2009).
- Codex Alimentarius. (1993) Directrices sobre buenas prácticas de laboratorio en el análisis de residuos de plaguicidas. Roma. Recuperado de: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/themes/pesticides/es/>
- Codex Alimentarius. (2017) Directrices sobre criterios de rendimiento para métodos de análisis para la determinación de residuos de plaguicidas en los alimentos y piensos. Roma. Recuperado de: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/themes/pesticides/es/>
- Comisión Europea. (2002) 2002/657/CE: Decisión de la Comisión, de 12 de agosto de 2002, por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados.

- Reglamento de Ejecución (UE). 2021 2021/808: de la comisión de 22 de marzo de 2021, relativo al funcionamiento de los métodos analíticos para los residuos de sustancias farmacológicamente activas utilizadas en animales productores de alimentos y a la interpretación de resultados, así como a los métodos que deben utilizarse para el muestreo.
- Laboratory Certification Program. (1996). Analytical Detection Limit Guidance & Laboratory Guide for Determining Method Detection Limits. Wisconsin Department of Natural Resources.
- Environmental Protection Agency (EPA). (2016). Definition and Procedure for the Determination of the Method Detection Limit, Revision 2. United states.
- Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria AEFI. (2001). Validación de métodos analíticos. Barcelona, España. Recuperado de: [https://www.academia.edu/10365264/Validacion\\_de\\_Metodos\\_Analiticos\\_Asociacion\\_Espanola\\_de\\_Farmaceuticos\\_de\\_la\\_Industria](https://www.academia.edu/10365264/Validacion_de_Metodos_Analiticos_Asociacion_Espanola_de_Farmaceuticos_de_la_Industria)
- 81st Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) meeting. (2015). Teflubenzuron Residue Monograph. Campinas, SP; Rockville, MD; Barton, Australia: Residue Evaluation of Certain Veterinary Drugs.
- 81st Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) meeting. (2015) Diflubenzuron Residue Monograph. Campinas, SP; Rockville, MD; Barton, Australia: Residue Evaluation of Certain Veterinary Drugs.
- Organismo Nacional de Sanidad Pesquera. (2021). Normativa sanitaria que establece los criterios sanitarios para los recursos y productos hidrobiológicos y piensos de uso en acuicultura. Lima, Perú: SANIPES.

## X ANEXOS

### MATRIZ DE CONSISTENCIA

*Desarrollo y validación de un método analítico para la determinación de pesticidas Benzoilúreas en pescado y langostino por cromatografía líquida acoplado a espectrometría de masa triple cuadrupolo en el CITEacuícola UPCH*

PROBLEMA GENERAL	OBJETIVO GENERAL	HIPÓTESIS GENERAL	Y = F (X1, X2) VARIABLES DEPENDIENTES	DIMENSIONES	INDICADORES	MÉTODO
¿Cómo se validará el desarrollo de un método de ensayo para la determinación de pesticidas Benzoilúreas en pescado y langostino por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa LC-MS/MS, según la NTP ISO/IEC 17025:2017 para el laboratorio de control de calidad y de seguridad alimentaria del CITEacuícola UPCH?	Validar el desarrollo de un método analítico según NTP ISO/IEC 17025:2017 para el laboratorio de control de calidad y seguridad alimentaria del CITEacuícola UPCH, para la determinación de pesticidas Benzoilúreas en pescado y langostino por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas triple cuadrupolo.	La validación del desarrollo de un método analítico para la determinación de pesticidas benzoilúreas realiza una eficiente extracción del Diflubenzuron y Teflubenzuron y cumple con los parámetros de validación según la NTP ISO/IEC 17025:2017.	F(x) = Desarrollo y validación de un método analítico	Y1 = Especificidad Y2 = Límite de detección (LOD) Y3 = Límite de cuantificación (LOQ) Y4 = Rango y linealidad Y5 = Exactitud Y6 = Precisión Y7 = Robustez Y8 = Efecto matriz Y9 = Incertidumbre	Libre de interferencias LOD<BK-spiked<10xLOD LOQ = 10 x DS Regresión Lineal % Recuperación RSDr (experimental) < RSDr (Hortwitz) Efecto A ≥ 224 x SR % Efecto Matriz Combinada y expandida	Método experimental y estadístico
PROBLEMAS ESPECÍFICOS	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	HIPÓTESIS ESPECÍFICAS	VARIABLES INDEPENDIENTES	DIMENSIONES	INDICADORES	MÉTODO
¿Cuáles serán las condiciones fisicoquímicas apropiadas de la metodología para una extracción de pesticidas Benzoilúreas eficiente?	Desarrollar un método de ensayo eficiente para la extracción de pesticidas Benzoilúreas en Pescado y Langostino.	El desarrollo del método analítico realiza una extracción de pesticidas Benzoilúreas en términos de %Recuperación del 70% al 120%.	X1 = Extracción de pesticidas Benzoilúreas	X1.1 = Tiempo de extracción X1.2 = Temperatura de sequedad	Minutos (min) Grados Celsius (°C)	Método experimental
¿Cuáles son las condiciones de análisis instrumentales del método de ensayo que se desarrollará en el laboratorio de control de calidad y seguridad alimentaria?	Establecer las condiciones de análisis óptimas del LC MS/MS para la determinación de los pesticidas Benzoilúreas en pescado y langostino	Las condiciones de análisis instrumentales del LC-MS/MS para la determinación de pesticidas Benzoilúreas son satisfactorias para realizar lecturas confiables, precisas y veraces.	X2 = Condiciones de análisis instrumentales para la determinación de pesticidas Benzoilúreas	X2.1 = Polaridad, voltaje capilar, temperatura de fuente, temperatura de desolvatación, gas de desolvatación, gas de colisión. X2.2 = Columna cromatográfica, Flujo de fases, Volumen de inyección, Temperatura de la columna, tipo de elución, Fases móviles.	ES- y/o ES+, Kilovoltios (KV), Temperatura (°C), Temperatura (°C), L/h, L/h. Tiempo de retención, mL/min, µL, Temperatura (°C), Isocrática, Fase móvil A y B.	Método instrumental – LC MS/MS

## ANEXO N° 1 Hoja de Cálculo para la de la incertidumbre

EVALUACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE DE FACTORES - DETERMINACIÓN DE DIFLUBENZURON - TEFLUBENZURON Y EMAMECTIN BENZOATO POR LC-MS/MS

### ANÁLISIS DE REGRESIÓN

	DFB		TFB		EMA	
Concentración (ng/ml)	Área	Concentración (ng/ml)	Área	Concentración (ng/ml)	Área	
100.00	178056.2657	10.00	102.9726667	1.00	4400.933333	
200.00	360369.8753	20.00	203.7823333	5.00	24762.57933	
300.00	537240.6043	50.00	526.2376667	10.00	51340.60567	
400.00	694069.7087	100.00	995.202	20.00	96576.039	
600.00	1008867.917	200.00	2125.283333	50.00	252703.1043	
800.00	1387774.458	400.00	4172.127333	100.00	478647.5417	
Intercepto	14786.528575	Intercepto	-6.9074197	Intercepto	2333.157367	
Pendiente	1699.024857	Pendiente	10.470577	Pendiente	4808.773436	
$(y_i - \hat{y})^2$	43993354.7	$(y_i - \hat{y})^2$	26.77357708	$(y_i - \hat{y})^2$	7513067.131	
	33389620.74		1.633842123		2606433.352	
	162476283.8		92.47225832		845873.7269	
	108773.9856		2020.3455		3734892.864	
	641787541.9		1449.736581		98630228.24	
	189559030		84.56531182		20820597.74	
$\sum (y_i - \hat{y})^2$	1071312605	$\sum (y_i - \hat{y})^2$	3675.527071	$\sum (y_i - \hat{y})^2$	134151091.06	
CME	267828151.3	CME	918.8817677	CME	33537772.77	

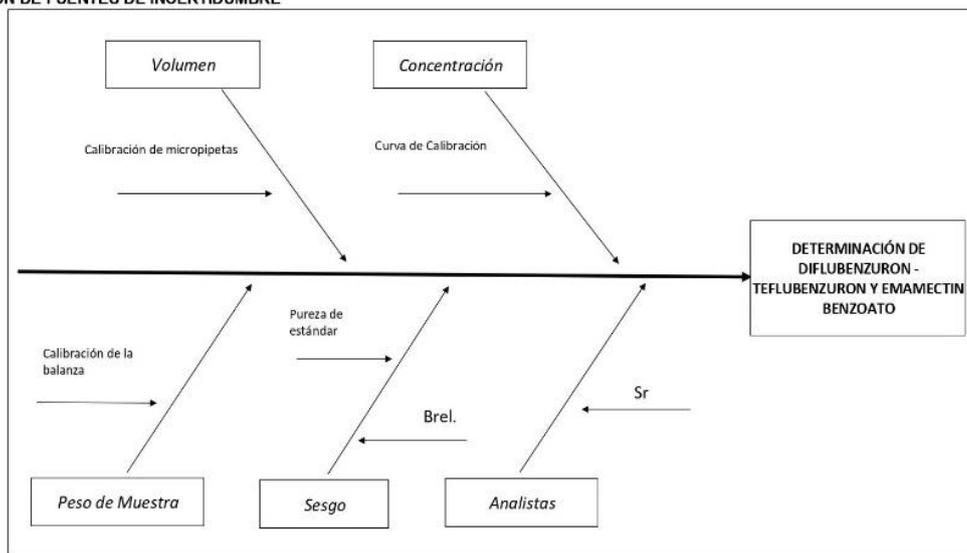
n	6
m	3
$S_c^2$	68000

Donde :

- CME : Es el cuadrado medio del error
- n : Es el número de puntos de la calibración
- m : Es el número de réplicas de cada punto de calibración
- $S_c^2$  : Es la varianza de las concentraciones de la curva de calibración
- b : Es la pendiente de la curva de calibración

$$U(c_{obs}) = \sqrt{\frac{CME}{b^2} \times \left( \frac{1}{n} + \frac{1}{m} + \frac{(c_{obs} - \bar{c})^2}{ns_c^2} \right)}$$

### IDENTIFICACIÓN DE FUENTES DE INCERTIDUMBRE



$$\text{Concentración (ug/Kg)} = \left[ \frac{y - b}{a} \right] \cdot \frac{V_f(\text{mL}) \cdot V_e(\text{mL})}{V_i(\text{mL}) \cdot W_{(g)}} \times D$$

**DETERMINACIÓN DE LOS FACTORES QUE APORTAN A LA INCERTIDUMBRE**

**A.- Metodología**

**1.- Concentración ( C ) en ng/mL**

De la ecuación de regresión se tiene: Area Ratio = a x Concentración + b

Analito	DFB	TFB	EMA
Area de la Muestra	101482.672	200	292294.844
Intercepto (a)	14786.5286	-6.9074	2333.1574
Pendiente (b)	1639.0249	10.4706	4808.7734
Concentración en la muestra (ng/mL)	51.03	19.76	60.30
(C <sub>obs</sub> - C) <sup>2</sup>	121782.15	144581.82	115397.13
Concentración (ug /Kg)	127.16	49.24	150.27
U C <sub>obs</sub>	8.6072	2.68	1.07

**2.- Volumen del extrato en mL. ( V )**

U v	0.002500
V(mL)	10

Factores de Variabilidad del V

**Micropipeta de 5 mL**

Incertidumbre de la micropipeta 0.5 mL - 5 mL\*

Fecha de calibr.: 20/01/2121  
 Fecha de exp. Del certificado: 20/01/2122

U micropipeta	0.0025
	0.005

\*Utilizar el mayor valor de la incertidumbre asociado al rango de medición de las micropipetas, expresados en los certificados de calibración.

**Ingresar Código de distribución**

Distribución Código

**Distribución de la micropipeta**

Normal	Rectangular	Triangular
1	2	3

Factor de Cobertura al 95% de Confianza

1
---

2.00000
---------

Página 1

**ETAPA DE CONCENTRACIÓN**

**2.1- Volumen utilizado para la concentración**

**Yolumen del extracto usado para la concentración en mL**

a	<b>Micropipeta 1000 uL</b>
1	Incertidumbre de la micropipeta 100 uL - 1000 uL* <b>Fecha de calibr.:</b> 21/01/2121 <b>Fecha de exp. Del certificado:</b> 21/01/2122

<b>U Vol. conc.</b>	<b>0.00040</b>
<b>Vi (mL)</b>	<b>2.0</b>
<b>Vf (mL)</b>	<b>1.0</b>
<b>F<sub>conc.</sub></b>	<b>0.50</b>

<b>U<sub>micropipeta</sub></b>	<b>0.0004</b>
--------------------------------	---------------

<b>0.0008</b>
---------------

\*Utilizar el mayor valor de la incertidumbre asociado al rango de medición de las micropipetas, expresados en los certificados de calibración.

Distribución  
Código

**Distribución de la micropipeta**

Normal	Rectangular	Triangular
1	2	3

**Factor de Cobertura al 95% de Confianza**

**Ingresar Código de distribución**

<b>1</b>
----------

<b>2.0000</b>
---------------

**3. Peso en gramos ( P )**

Factores de Variabilidad de P

a **Balanza**

**Incertidumbres**

1	<b>Incertidumbre expndida de la balanza Ohaus ( U balaz. ) Cod.N° LaCCSA-09</b> <b>Fecha de calibración:</b> 28/01/2021 <b>Fecha de espiración de la calibración:</b> 28/01/2022
---	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

<b>U<sub>p</sub></b>	<b>0.000109744</b>
<b>P (g)</b>	<b>2.00640</b>

<b>U balanz.</b>	<b>0.000109744</b>
------------------	--------------------

<b>0.000219488</b>
--------------------

**Distribución de las Balanzas**

Distribución  
Código

Normal	Rectangular	Triangular
1	2	3

**Ingresar código de distribución**

**Factor de Cobertura al 95% de Confianza**

2	<b>Incertidumbre de la balanza Ohaus ( U balaz. ) Cod.N° LaCCSA-09</b>
---	------------------------------------------------------------------------

<b>1</b>
----------

<b>2</b>
----------

<b>0.000109744</b>
--------------------

4.- Factor de Dilución (D)

Factores de Variabilidad de V

U <sub>n</sub>	0.000000
D	1

a Matraz Volumétrica

U <sub>v</sub>	16.329932
V(uL)	5000

- 1 Tolerancia de matraz vol. de 5000 uL
- 2 Tolerancia del matraz vol. de 10000 uL

U <sub>fiola</sub>	16.3299
--------------------	---------

UTILIZADA ( SI / NO )	
si	40
no	40

# Página 2

Distribución de la Pipeta

Distribución	Normal	Rectangular	Triangular
Código	1	2	3

Ingresar código de distribución

3
---

Factor de Cobertura al 95% de Confianza

2.4495
--------

b Micropipeta automática de 100 - 1000 uL

Fecha de calibr.: 21/01/2121  
 Fecha de exp. Del certificado: 21/01/2122

U <sub>v</sub>	0.00040
V	500
	1

U <sub>micropipeta</sub>	0.0004
--------------------------	--------

Incertidumbre de la Micropipeta de 100 - 1000 uL \*

0.0008
--------

\*Utilizar el mayor valor de la incertidumbre asociado al rango de medición de las micropipetas, expresados en los certificados de calibración.

1 Distribución de la micropipeta

Distribución	Normal	Rectangular	Triangular
Código	1	2	3

Ingresar código de distribución

1
---

Factor de Cobertura al 95% de Confianza

2.0000
--------

INCERTIDUMBRE DE LA COMBINADA DEL MÉTODO

$$U_{MET} = \sqrt{\left[\frac{U_{Co} \times V_e \times F_c \times F_d}{W}\right]^2 + \left[\frac{U_{Ve} \times C_{ox} \times F_c \times F_d}{W}\right]^2 + \left[\frac{U_{Fc} \times C_{ox} \times V_e \times F_d}{W}\right]^2 + \left[\frac{U_{Fd} \times C_{ox} \times V_e \times F_c}{W}\right]^2 + \left[\frac{U_{Wx} \times C_{ox} \times V_e \times F_c \times F_d}{W^2}\right]^2}$$

Analitos	DFB	TFB	EMA
U Comb. Met.	3.655	2.484	1.219

B.- INCERTIDUMBRE DEL SESGO

$$U^2_{\text{omb. sesgo}} = U^2_{\text{std. verac.}} + \text{Sesgo}^2$$

1° Determinación de la  $U^2_{\text{std. Verac.}}$

Analito	DFB	TFB	EMA
Pureza %	0.396	0.385	0.383
Inc. Expandida	0.004	0.015	0.017
Distribución	1.132050808	1.132050808	1.132050808
U estándar	0.0023034	0.0066603	0.0099159
U std. Proc. Verac.	0.00610	0.00662	0.01028
U std. Veracidad	0.82959	0.53675	2.13613

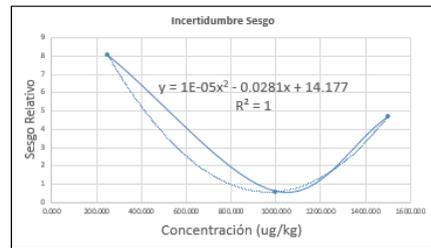
2° Determinación del Sesgo

$$\text{Sesgo Relativo} = \frac{|\mu - \mu_0|}{\mu} \cdot 100$$

Nivel	DFB					Nivel	TFB				
	Concentración Reportada	127.16					Concentración Reportada	49.24			
	Concentración	Analista 1	Analista 2	Br 1	Br 2		Concentración	Analista 1	Analista 2	Br	Br
1	250.000	270.13	272.85	8.052	9.14	1	50.000	54.69	53.42	9.38	6.84
2	1000.000	1005.91	1001.56	0.581	0.156	2	500.000	490.07	484.41	1.986	3.118
3	1500.000	1570.29	1560.06	4.686	4.004	3	750.000	752.92	741.52	0.389333333	1.13067

Nivel	EMA				
	Concentración Reportada	150.27			
	Concentración	Analista 1	Analista 2	Br	Br
1	10.0000	10.85	10.87	8.5	8.7
2	100.0000	101.76	98.31	1.76	1.69
3	150.0000	146.13	140.76	2.58	6.16



Analito	DFB	TFB	EMA
U Sesgo	13.68945491	4.622883041	3.856825013

$$\mu_{\text{sesgo}} = \frac{x_0 (\text{Sesgo Relativo})}{100}$$

Determinación de la Incertidumbre Combinada del Sesgo

Analito	DFB	TFB	EMA
U omb sesgo	2.48542	1.15	0.95

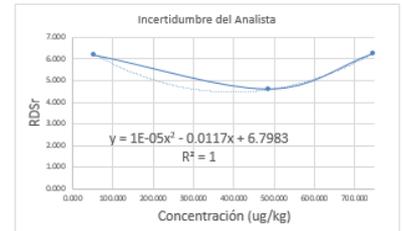
Página 3

C.- INCERTIDUMBRE DE LOS ANALISTAS

Utilizar los datos de los analistas que participaron en la implementación o validación del método.

$$U_{\text{Analista}} = \frac{x_0 * RSD_r}{100}$$

ANALITO	DFB		TFB		EMA	
	Concentración Reportada	127.16	Concentración	49.24	Concentración	150.27
Nivel	Concentración	RSDr	Concentración	RSDr	Concentración	RSDr
1	271.500	2.606	54.060	6.207	10.760	6.768
2	1003.680	3.167	487.240	4.587	100.040	8.092
3	1565.180	5.788	747.220	6.279	143.450	9.756
U Analistas	1.18164831		1.668413155		2.4518346	



INCERTIDUMBRE GLOBAL

$$U_{\text{global}} = \sqrt{U^2_{\text{metodología}} + U^2_{\text{analista}} + U^2_{\text{sesgo}}}$$

Analito	DFB	TFB	EMA
Uglobal (µg / kg) =	4.58	3.2	2.9

INCERTIDUMBRE EXPANDIDA AL 95% DE CONF. Y K=2

Analito	DFB	TFB	EMA
Uglobal (µg / kg) =	9.15	6.41	5.80



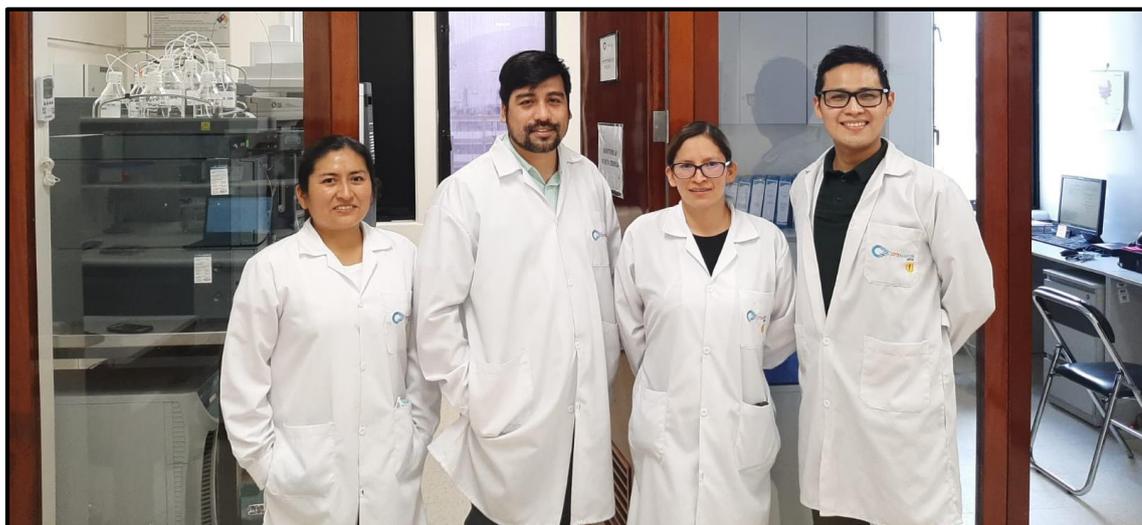
### ANEXO Nº 3

**Foto del equipo Cromatografo Líquido acoplado a Espectrometría de Masas Triple Cuadrupolo del CITEacuícola de la UPCH**



### ANEXO Nº 4

**Foto del grupo de trabajo del laboratorio de control de calidad y seguridad alimentaria del CITEacuícola UPCH**



## ANEXO Nº 5

**Certificado del desarrollo y validación del método analítico para la determinación de pesticidas benzoilureas en pescado y langostino por cromatografía líquida acoplado a espectrometría de masas triple cuadrupolo LC-MS/MS**



**CENTRO DE INNOVACIÓN PRODUCTIVA Y TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA  
PRIVADO ACUÍCOLA DE LA UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA**

***CONSTANCIA DE PASANTÍA***

***ROY ANGELLO VEGA CORNELIO***

Identificada con DNI 75014172, realizo una pasantía en el Laboratorio de Control de Calidad y Seguridad Alimentaria del CITEacuícola UPCH, donde a su vez desarrollo el tema de tesis titulado *"Desarrollo y validación de un método analítico para la determinación de pesticidas benzoilúreas en pescado y langostino por cromatografía líquida acoplado a espectrometría de masas triple cuadrupolo en el CITEacuícola UPCH"*, del 05 de abril de 2021 al 18 de enero de 2022, con una duración de 09 meses.



Lima, 14 de enero de 2022

**Dra. María Rivera Chira  
Directora ejecutiva  
CITEacuícola UPCH**

**ANEXO N° 6**  
**Certificados de análisis de los estándares de Diflubenzuron y**  
**Teflubenzuron**

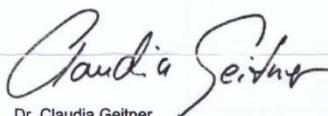
**SIGMA-ALDRICH®**

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103 USA  
Email USA: techserv@sial.com Outside USA: eurtechserv@sial.com

**Certificate of Analysis**

**Product Name:** DIFLUBENZURON  
PESTANAL™, analytical standard  
**Product Number:** 45446  
**Batch Number:** BCBW8049  
**Brand:** Sigma-Aldrich  
**CAS Number:** 35367-38-5  
**Formula:** C<sub>14</sub>H<sub>9</sub>ClF<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
**Formula Weight:** 310.68  
**Expiration Date:** MAR 2023  
**Quality Release Date:** 26 APR 2018

TEST	SPECIFICATION	RESULT
APPEARANCE (COLOR)	WHITE TO OFF WHITE	WHITE
APPEARANCE (FORM)	POWDER OR CRYSTALS	CRYSTALS
PURITY (HPLC AREA %)	≥ 98.0 %	99.6 %
MELTING POINT	214 - 221 C	218 C
WATER	≤ 1.0 %	0.05 %
PROTON NMR SPECTRUM	CONFORMS TO STRUCTURE	CONFORMS



Dr. Claudia Geitner  
Manager Quality Control  
Buchs, Switzerland

Sigma-Aldrich warrants that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

45446 Diflubenzuron

Lot Number: <b>BCBW8049</b>	Sample Name: <b>T39848_001_LC</b>
<b>Dionex Ultimate 3000 RSLC</b>	
<b>Pump</b> : LPG-3400RS	<b>Injection Time</b> : 27.03.18 15:43
<b>Autosampler</b> : WPS-3000	<b>Processed By</b> : Markus Urthaler
<b>Detector</b> : VWD-3400	<b>Vial Number</b> : BA3
<b>Column</b> : Supelco Ascentis Express C18, 2.7 um	<b>Column S/N</b> : -
<b>Column Dim.</b> : 50 x 2.1 mm	<b>Sample Type</b> : unknown
<b>Mobile Phase</b> :	<b>Injection Volume</b> : 1.0 µl
%A : Acetonitrile	<b>Flow</b> : 1.00 ml/min
%B : Methanol	<b>Column Temp. (°C)</b> : 35.0
%C : Water	<b>Run Time</b> : 6.00 min
%D : Phosphoric acid 0.01M	
<b>Gradient</b> : see Figure 1	
<b>Sample Prep.</b> : 0.5 mg sample in 1 ml methanol	

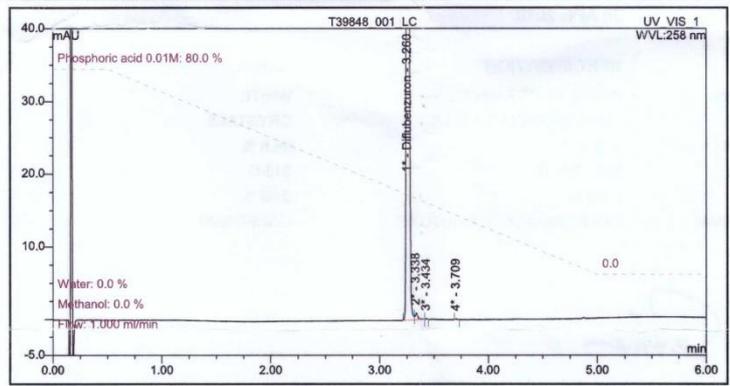


Figure 1: Zoomed Chromatogram

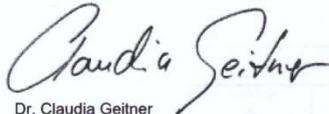
No.	Ret.Time min	Peak Name	Area mAU*min	Height mAU	Amount	Rel.Area %
1	3.260	Diflubenzuron	7.54305	369.28638	n.a.	99.57
2	3.338	n.a.	0.02788	0.94279	n.a.	0.37
3	3.434	n.a.	0.00208	0.11151	n.a.	0.03
4	3.709	n.a.	0.00276	0.13127	n.a.	0.04
Total:			7.57578	370.47195		100.00

Table 1: Integration

## Certificate of Analysis

**Product Name:** TEFLUBENZURON  
PESTANAL™, analytical standard  
**Product Number:** 45756  
**Batch Number:** BCBT3800  
**Brand:** Sigma  
**CAS Number:** 83121-18-0  
**Formula:** C<sub>14</sub>H<sub>6</sub>Cl<sub>2</sub>F<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
**Formula Weight:** 381.11  
**Expiration Date:** NOV 2021  
**Quality Release Date:** 02 DEC 2016

TEST	SPECIFICATION	RESULT
APPEARANCE (COLOR)	WHITE TO LIGHT YELLOW AND FAINT BEIGE TO LIGHT BEIGE	OFF WHITE
APPEARANCE (FORM)	POWDER OR CRYSTALS	POWDER
PURITY (HPLC AREA %)	≥ 98.0 %	98.5 %
MELTING POINT	218 - 223 C	220 C
WATER	≤ 1.0 %	< 0.05%
PROTON NMR SPECTRUM	CONFORMS TO STRUCTURE	CONFORMS



Dr. Claudia Geitner  
Manager Quality Control  
Buchs, Switzerland

### 45756 Teflubenzuron

Lot Number: <b>BCBT3800</b>	Sample Name: <b>0000000572936_001_LC</b>
<b>Dionex Ultimate 3000 RSLC</b>	
<b>Pump</b> : LPG-3400RS	<b>Injection Time</b> : 19.10.16 14:03
<b>Autosampler</b> : WPS-3000	<b>Processed By</b> : Markus Urthaler
<b>Detector</b> : DAD-3000RS	<b>Vial Number</b> : RE4
<b>Column</b> : Supelco Ascentis Express C18, 2.7 µm	<b>Column S/N</b> : -
<b>Column Dim.</b> : 150 x 2.1 mm	<b>Sample Type</b> : unknown
<b>Mobile Phase</b> :	<b>Injection Volume</b> : 2.0 µl
%A : Acetonitrile	Flow : 0.50 ml/min
%B : Methanol	Column Temp. (°C) : 35.0
%C : Water	Run Time : 15.00 min
%D : Phosphoric acid 10 mM	
<b>Gradient</b> : see Figure 1	
<b>Sample Prep.</b> : 1mg sample in 1ml methanol	

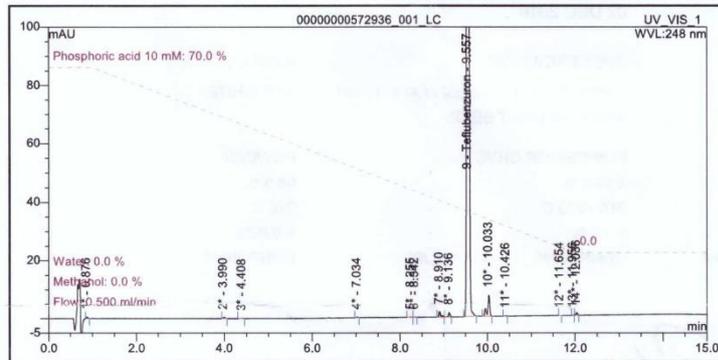


Figure 1: Zoomed Chromatogram

No.	Ret. Time min	Peak Name	Area mAU*min	Height mAU	Amount	Rel. Area %
1	0.876	n.a.	0.01746	0.51987	n.a.	0.04
2	3.990	n.a.	0.02455	0.44904	n.a.	0.05
3	4.408	n.a.	0.00689	0.11238	n.a.	0.01
4	7.034	n.a.	0.00855	0.19975	n.a.	0.02
5	8.255	n.a.	0.00400	0.07634	n.a.	0.01
6	8.342	n.a.	0.00302	0.07692	n.a.	0.01
7	8.910	n.a.	0.09026	1.84334	n.a.	0.20
8	9.136	n.a.	0.06446	1.52615	n.a.	0.14
9	9.557	Teflubenzuron	45.45506	1122.65934	n.a.	98.53
10	10.033	n.a.	0.41603	7.28507	n.a.	0.90
11	10.426	n.a.	0.00639	0.12169	n.a.	0.01
12	11.654	n.a.	0.00238	0.07145	n.a.	0.01
13	11.956	n.a.	0.00315	0.09322	n.a.	0.01
14	12.036	n.a.	0.03236	0.83623	n.a.	0.07
<b>Total:</b>			<b>46.13456</b>	<b>1135.87079</b>		<b>100.00</b>

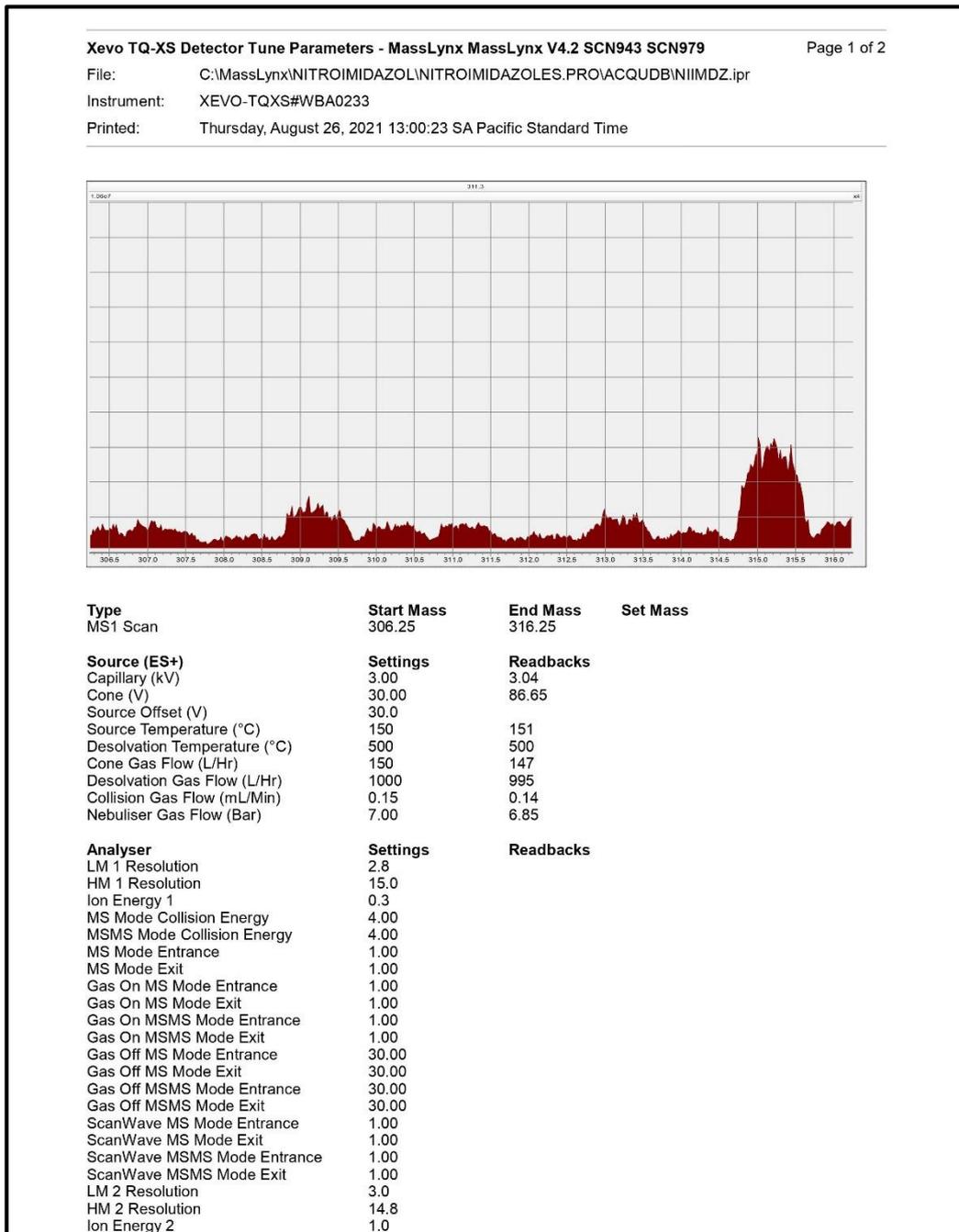
Table 1: Integration

## ANEXO N° 7

### Parámetros de la fuente para un sistema I-CLASS-Xevo-TQXS UPLC-MS/MS (Waters) para la determinación de diflubenzuron y teflubenzuron

a) Tune Manual para el Diflubenzuron:

- Monitoreo de Ion Padre



**Xevo TQ-XS Detector Tune Parameters - MassLynx MassLynx V4.2 SCN943 SCN979**

Page 2 of 2

File: C:\MassLynx\NITROIMIDAZOL\NITROIMIDAZOLES.PRO\ACQUDB\NIIMDZ.ipr  
Instrument: XEVO-TQXS#WBA0233  
Printed: Thursday, August 26, 2021 13:00:23 SA Pacific Standard Time

Gain 1.00  
Multiplier 521.86  
Active Reservoir C  
Soft Ionization Mode Disabled

**Pressure Gauges**

Collision Cell Pressure (mbar) 4.152551e-003

**Instrument Configuration**

Automatic Mode  
MS Inter-scan delay (secs) 0.003  
Polarity/Mode switch Inter-scan delay (secs) 0.020  
Enhanced Inter-scan delay (secs) 0.020  
Inter-channel delay - See Tables  
MS 1 Delay Table:  
R delay  
<= 1.250 0.001  
<= 4.000 0.002  
<= 10.000 0.003  
<= 20.000 0.004  
> 20.000 0.005

- **Monitoreo del 1er ion daughter**

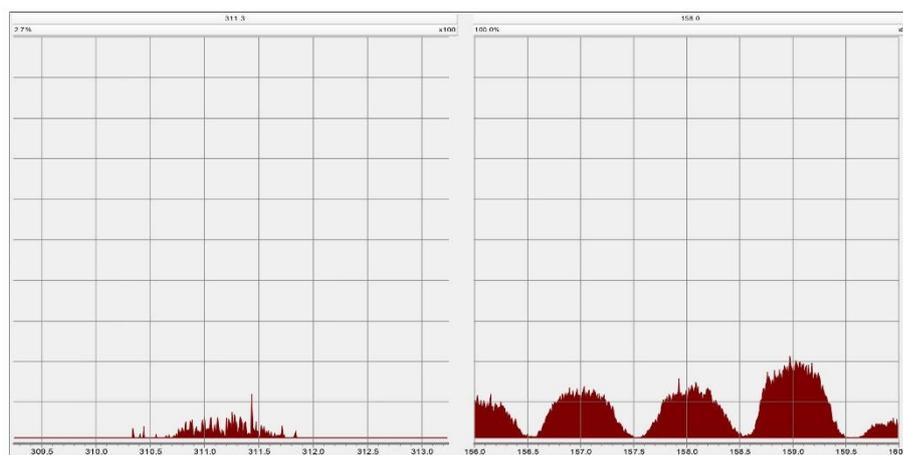
**Xevo TQ-XS Detector Tune Parameters - MassLynx MassLynx V4.2 SCN943 SCN979**

Page 1 of 2

File: C:\MassLynx\NITROIMIDAZOL\NITROIMIDAZOLES.PRO\ACQUDB\NIIMDZ.ipr

Instrument: XEVO-TQXS#WBA0233

Printed: Thursday, August 26, 2021 14:26:04 SA Pacific Standard Time



Type	Start Mass	End Mass	Set Mass
Parent Scan	309.25	313.25	311.00
MS2 Scan	156.00	160.00	

Source (ES+)	Settings	Readbacks
Capillary (kV)	3.00	3.07
Cone (V)	30.00	97.72
Source Offset (V)	30.0	
Source Temperature (°C)	150	150
Desolvation Temperature (°C)	500	500
Cone Gas Flow (L/Hr)	150	148
Desolvation Gas Flow (L/Hr)	1000	994
Collision Gas Flow (mL/Min)	0.15	0.14
Nebuliser Gas Flow (Bar)	7.00	6.86

Analyser	Settings	Readbacks
LM 1 Resolution	2.8	
HM 1 Resolution	15.0	
Ion Energy 1	0.3	
MS Mode Collision Energy	15.00	
MSMS Mode Collision Energy	4.00	
MS Mode Entrance	1.00	
MS Mode Exit	1.00	
Gas On MS Mode Entrance	1.00	
Gas On MS Mode Exit	1.00	
Gas On MSMS Mode Entrance	1.00	
Gas On MSMS Mode Exit	1.00	
Gas Off MS Mode Entrance	30.00	
Gas Off MS Mode Exit	30.00	
Gas Off MSMS Mode Entrance	30.00	
Gas Off MSMS Mode Exit	30.00	
ScanWave MS Mode Entrance	1.00	
ScanWave MS Mode Exit	1.00	
ScanWave MSMS Mode Entrance	1.00	
ScanWave MSMS Mode Exit	1.00	
LM 2 Resolution	3.0	
HM 2 Resolution	14.8	

**Xevo TQ-XS Detector Tune Parameters - MassLynx MassLynx V4.2 SCN943 SCN979**

Page 2 of 2

File: C:\MassLynx\NITROIMIDAZOL\NITROIMIDAZOLES.PRO\ACQUDB\NIIMDZ.ipr

Instrument: XEVO-TQXS#WBA0233

Printed: Thursday, August 26, 2021 14:26:04 SA Pacific Standard Time

Ion Energy 2 1.0  
Gain 1.00  
Multiplier 521.61  
Active Reservoir C  
Soft Ionization Mode Disabled

**Pressure Gauges**

Collision Cell Pressure (mbar) 4.178315e-003

**Instrument Configuration**

Automatic Mode  
MS Inter-scan delay (secs) 0.003  
Polarity/Mode switch Inter-scan delay (secs) 0.020  
Enhanced Inter-scan delay (secs) 0.020  
Inter-channel delay - See Tables

MS 1 Delay Table:

R delay  
<= 1.250 0.001  
<= 4.000 0.002  
<= 10.000 0.003  
<= 20.000 0.004  
> 20.000 0.005

- **Monitoreo del 2do ion daughter**

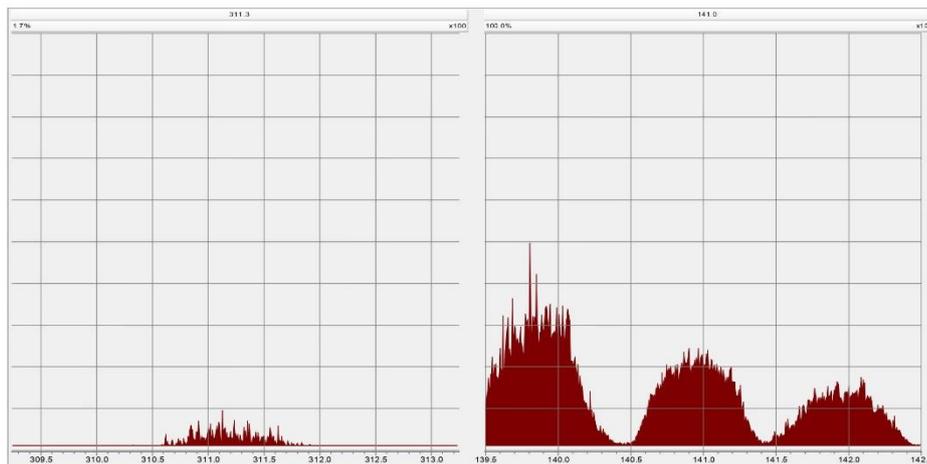
**Xevo TQ-XS Detector Tune Parameters - MassLynx MassLynx V4.2 SCN943 SCN979**

Page 1 of 2

File: C:\MassLynx\NITROIMIDAZOL\NITROIMIDAZOLES.PRO\ACQUDB\NIIMDZ.ipr

Instrument: XEVO-TQXS#WBA0233

Printed: Thursday, August 26, 2021 14:24:30 SA Pacific Standard Time



Type	Start Mass	End Mass	Set Mass
Parent Scan	309.25	313.25	311.00
MS2 Scan	139.50	142.50	

Source (ES+)	Settings	Readbacks
Capillary (kV)	3.00	3.06
Cone (V)	30.00	97.72
Source Offset (V)	30.0	
Source Temperature (°C)	150	150
Desolvation Temperature (°C)	500	500
Cone Gas Flow (L/Hr)	150	147
Desolvation Gas Flow (L/Hr)	1000	995
Collision Gas Flow (mL/Min)	0.15	0.15
Nebuliser Gas Flow (Bar)	7.00	6.85

Analyser	Settings	Readbacks
LM 1 Resolution	2.8	
HM 1 Resolution	15.0	
Ion Energy 1	0.3	
MS Mode Collision Energy	15.00	
MSMS Mode Collision Energy	4.00	
MS Mode Entrance	1.00	
MS Mode Exit	1.00	
Gas On MS Mode Entrance	1.00	
Gas On MS Mode Exit	1.00	
Gas On MSMS Mode Entrance	1.00	
Gas On MSMS Mode Exit	1.00	
Gas Off MS Mode Entrance	30.00	
Gas Off MS Mode Exit	30.00	
Gas Off MSMS Mode Entrance	30.00	
Gas Off MSMS Mode Exit	30.00	
ScanWave MS Mode Entrance	1.00	
ScanWave MS Mode Exit	1.00	
ScanWave MSMS Mode Entrance	1.00	
ScanWave MSMS Mode Exit	1.00	
LM 2 Resolution	3.0	
HM 2 Resolution	14.8	

**Xevo TQ-XS Detector Tune Parameters - MassLynx MassLynx V4.2 SCN943 SCN979**

Page 2 of 2

File: C:\MassLynx\NITROIMIDAZOL\NITROIMIDAZOLES.PRO\ACQUDB\NIIMDZ.ipr  
Instrument: XEVO-TQXS#WBA0233  
Printed: Thursday, August 26, 2021 14:24:30 SA Pacific Standard Time

Ion Energy 2 1.0  
Gain 1.00  
Multiplier 521.86  
Active Reservoir C  
Soft Ionization Mode Disabled

**Pressure Gauges**

Collision Cell Pressure (mbar) 4.230324e-003

**Instrument Configuration**

Automatic Mode  
MS Inter-scan delay (secs) 0.003  
Polarity/Mode switch Inter-scan delay (secs) 0.020  
Enhanced Inter-scan delay (secs) 0.020  
Inter-channel delay - See Tables

MS 1 Delay Table:  
R delay  
<= 1.250 0.001  
<= 4.000 0.002  
<= 10.000 0.003  
<= 20.000 0.004  
> 20.000 0.005

## b) Tune por el IntelliStart para el Teflubenzuron:

### Method Development Report

<b>MS1 Resolution</b>	0.75
<b>MS2 Resolution</b>	0.75
<b>Calibration Method</b>	C:\MassLynx\IntelliStart\Results\Unit Mass Resolution\Calibration_20210526.cal
<b>Tune Method</b>	C:\MassLynx\BENZOILUREAS.PRO\ACQUDB\BENZOILUREAS.IPR
<b>Cone Voltage Range</b>	10 - 40
<b>Collision Energy Range</b>	2 - 50
<b>Lowest Fragment Mass</b>	100.00
<b>Excluded Losses</b>	

Date: Generated on Fri 13 Aug 2021 at 10:52

### Results

IntelliStart generated the following experiments:

<b>MRM Experiment</b>	C:\MassLynx\BENZOILUREAS.PRO\ACQUDB\Benzoilureas.exp
-----------------------	------------------------------------------------------

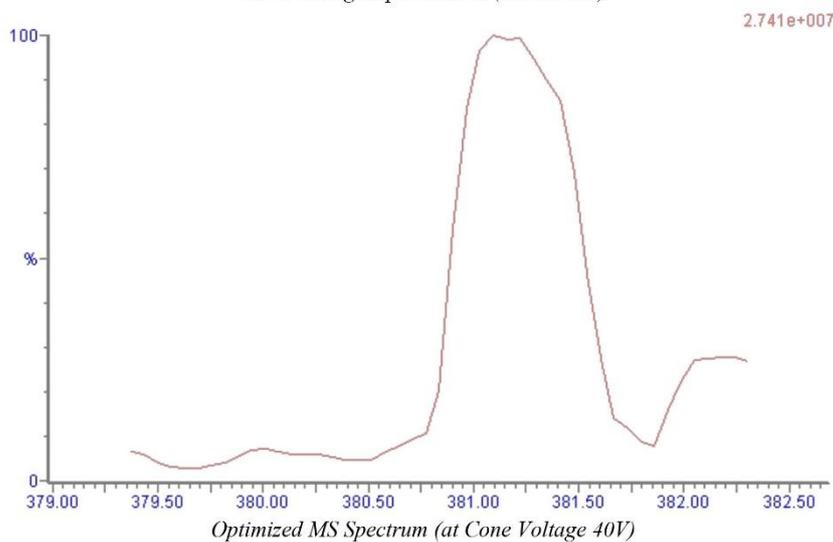
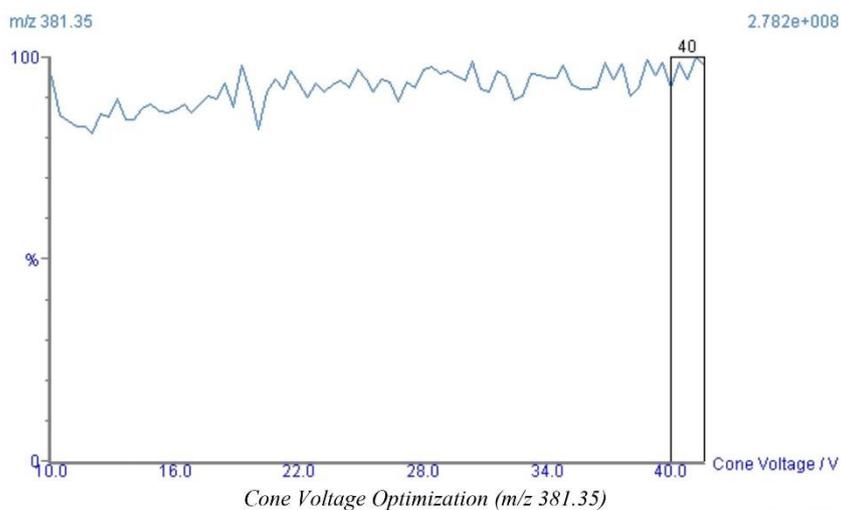
IntelliStart found the following compounds:

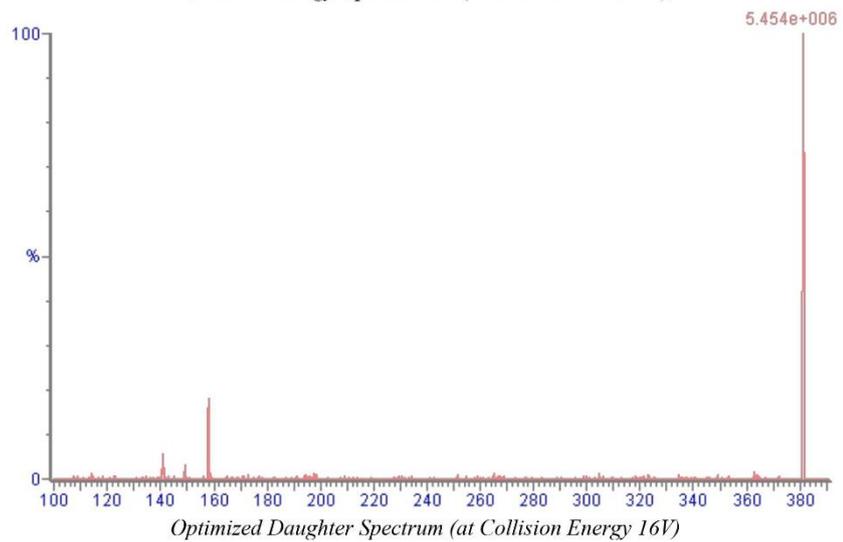
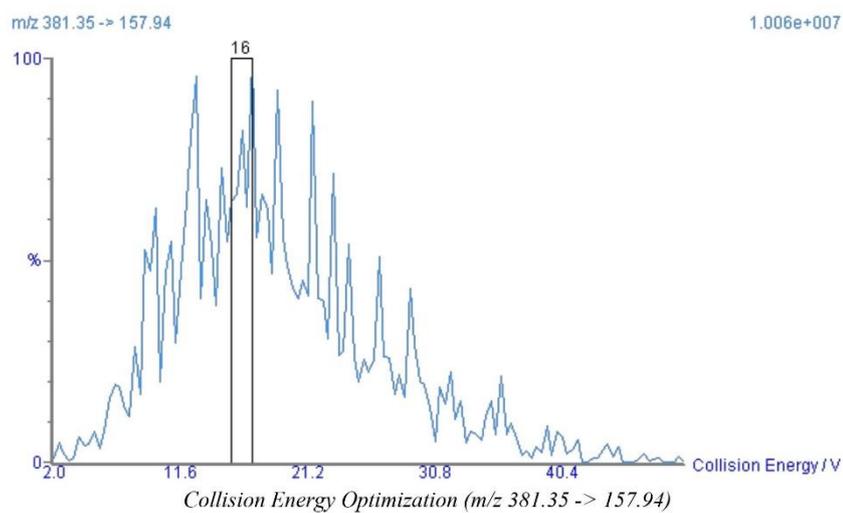
Compound	Formula/Mass		Parent m/z	Cone Voltage	Daughters	Collision Energy	Ion Mode	Soft Ionization Mode
Teflubenzuron	380	1	381.3	40	157.94	16	ES+	Disabled
		2	381.3	40	140.90	28	ES+	Disabled

### Compound

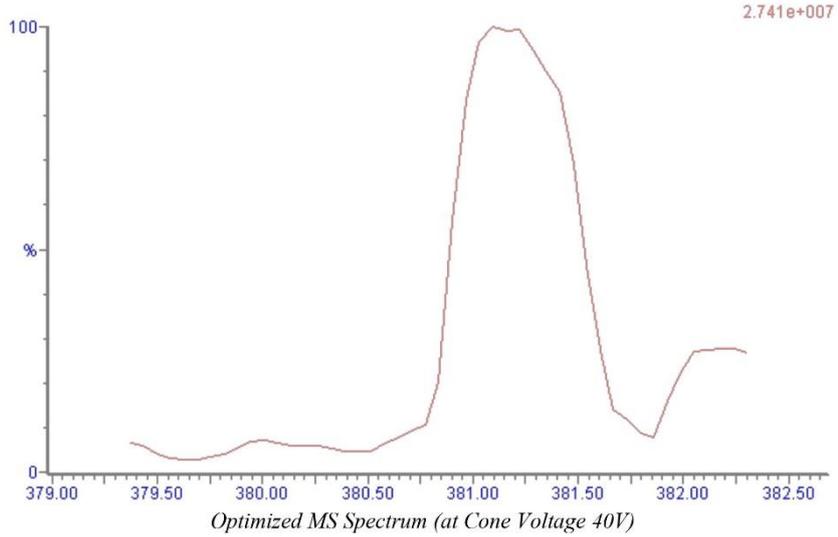
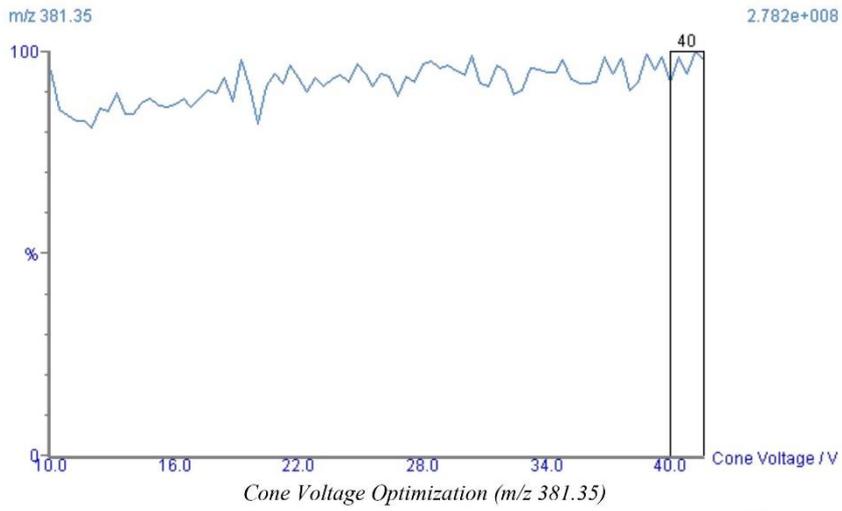
# Teflubenzuron (380)

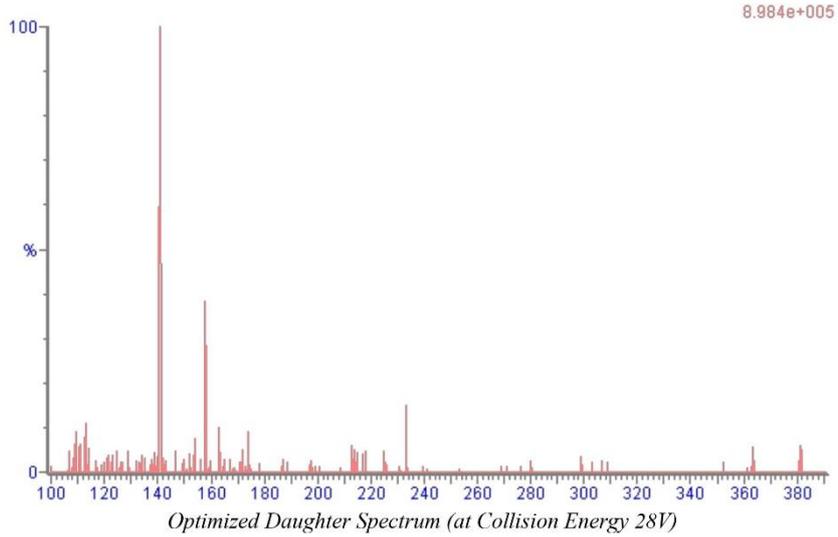
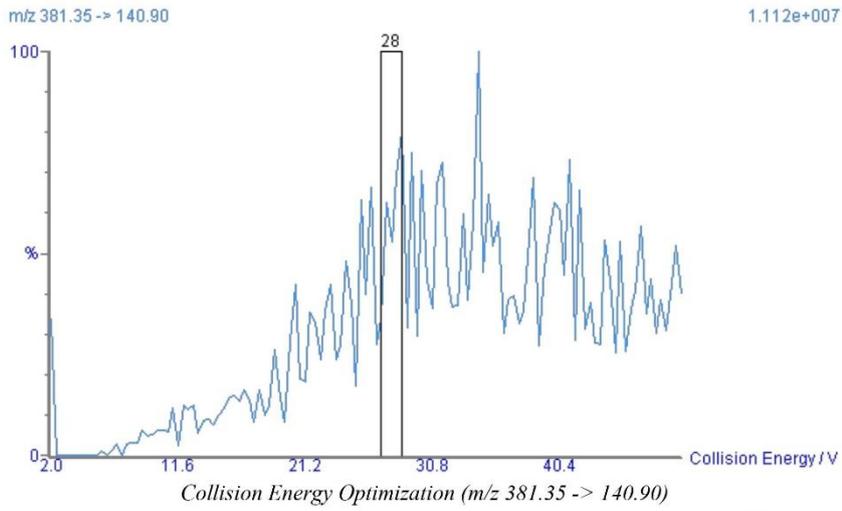
Transition 1: ES+, m/z 381.35 -> 157.94





**Transition 2: ES+, m/z 381.35 -> 140.90**





**ANEXO N° 8**  
**Resultados del equipo UPLC-MS/MS para el desarrollo del método**

**a) En Trucha Arcoíris:**

<b>Quantify Overview Report</b>		<b>MassLynx V4.2 SCN943 SCN979</b>		Page 1 of 1
CITEacuicola UPCH				
Dataset:		C:\MassLynx\BENZOILUREAS.PRO\Pbas-Extraccion_TRU.qld		
Printed:		Tuesday, November 16, 2021 08:52:54 SA Pacific Standard Time		
<b>Method: C:\MassLynx\BENZOILUREAS.PRO\MethDB\Benzoilureas_20211220_TRU.mdb 16 Nov 2021 08:49:51</b>				
<b>Calibration: 16 Nov 2021 08:51:44</b>				
	Diflubenzuron	Teflubenzuron	Emamectin Benzoate	
20211115-BNZ-Bk-FM-...				
20211115-BNZ-Bk-FM-...				
TRU-PBA1	1210.58	614.62	143.54	
TRU-PBA2	995.39	435.89	95.87	
TRU-PBA3	1017.83	445.27	94.96	
TRU-PBA4	1532.55	647.74	139.80	

**b) En Langostino:**

<b>Quantify Overview Report</b>		<b>MassLynx V4.2 SCN943 SCN979</b>		Page 1 of 1
CITEacuicola UPCH				
Dataset:		Untitled		
Printed:		Tuesday, September 14, 2021 11:02:25 SA Pacific Standard Time		
<b>Method: C:\MassLynx\BENZOILUREAS.PRO\MethDB\Benzoilureas_20211217_LG.mdb 14 Sep 2021 11:01:21</b>				
<b>Calibration: 14 Sep 2021 11:02:09</b>				
	Diflubenzuron	Teflubenzuron	Emamectin Benzoate	
20211115-Bk-FM-10				
20211115-Bk-FM-11				
LG-PBA1	1050.54	581.05	98.34	
LG-PBA2	1047.09	502.89	84.57	
LG-PBA3	987.73	481.12	84.79	
LG-PBA4	1552.30	751.36	130.68	

**ANEXO N° 9**  
**Resultados del equipo UPLC-MS/MS para el desarrollo de los parámetros de desempeño para la validación del método**

**a) Linealidad**

Quantify Compound Summary Report    MassLynx V4.2 SCN943 SCN979									Page 1 of 3
CITEacuicola UPCH									
Dataset:    C:\MassLynx\BENZOILUREAS.PRO\20211115_DIA1_LINEALIDAD.qld									
Printed:    Friday, November 19, 2021 09:00:11 SA Pacific Standard Time									
<b>Method: C:\MassLynx\BENZOILUREAS.PRO\MethDB\Benzoilureas_20211217_LG.mdb 14 Sep 2021 10:28:37</b>									
<b>Calibration: 19 Nov 2021 08:59:49</b>									
<b>Compound name: Diflubenzuron</b>									
Correlation coefficient: $r = 0.999607$ , $r^2 = 0.999214$									
Calibration curve: $1643.7 * x + 14227.1$									
Response type: External Std, Area									
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None									
	Name	RT	Area	Std. Conc	Conc.	Divisor1	Factor1	Factor2	
1	20211115-D1-LG-STD-1	1.023	174527.188	100.0	97.52	1.0000	1.0	1.00	
2	20211115-D1-LG-STD-2	1.023	352943.750	200.0	206.07	1.0000	1.0	1.00	
3	20211115-D1-LG-STD-3	1.023	514468.250	300.0	304.34	1.0000	1.0	1.00	
4	20211115-D1-LG-STD-4	1.023	665211.938	400.0	396.05	1.0000	1.0	1.00	
5	20211115-D1-LG-STD-5	1.023	979974.188	600.0	587.54	1.0000	1.0	1.00	
6	20211115-D1-LG-STD-6	1.023	1343123.750	800.0	808.48	1.0000	1.0	1.00	

Quantify Compound Summary Report    MassLynx V4.2 SCN943 SCN979									Page 2 of 3
CITEacuicola UPCH									
Dataset:    C:\MassLynx\BENZOILUREAS.PRO\20211115_DIA1_LINEALIDAD.qld									
Printed:    Friday, November 19, 2021 09:00:11 SA Pacific Standard Time									
<b>Compound name: Teflubenzuron</b>									
Correlation coefficient: $r = 0.999323$ , $r^2 = 0.998647$									
Calibration curve: $10.993 * x + -7.12136$									
Response type: External Std, Area									
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None									
	Name	RT	Area	Std. Conc	Conc.	Divisor1	Factor1	Factor2	
1	20211115-D1-LG-STD-1	1.582	98.893	10.0	9.64	1.0000	1.0	1.00	
2	20211115-D1-LG-STD-2	1.582	218.179	20.0	20.49	1.0000	1.0	1.00	
3	20211115-D1-LG-STD-3	1.582	568.602	50.0	52.37	1.0000	1.0	1.00	
4	20211115-D1-LG-STD-4	1.582	1084.029	100.0	99.26	1.0000	1.0	1.00	
5	20211115-D1-LG-STD-5	1.582	2082.768	200.0	190.11	1.0000	1.0	1.00	
6	20211115-D1-LG-STD-6	1.582	4479.346	400.0	408.12	1.0000	1.0	1.00	

Quantify Compound Summary Report MassLynx V4.2 SCN943 SCN979									Page 1 of 3
CITEacuicola UPCH									
Dataset: C:\MassLynx\BENZOILUREAS.PRO\20211116_DIA2_LINEALIDAD.qld									
Printed: Friday, November 19, 2021 09:01:04 SA Pacific Standard Time									
Method: C:\MassLynx\BENZOILUREAS.PRO\MethDB\Benzoilureas_20211217_LG.mdb 14 Sep 2021 10:27:40									
Calibration: 19 Nov 2021 09:00:51									
Compound name: Diflubenzuron									
Correlation coefficient: r = 0.998944, r <sup>2</sup> = 0.997890									
Calibration curve: 1748.45 * x + 963.133									
Response type: External Std, Area									
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None									
	Name	RT	Area	Std. Conc	Conc.	Divisor1	Factor1	Factor2	
1	20211116-D2-LG-STD-1	1.023	174214.828	100.0	99.09	1.0000	1.0	1.00	
2	20211116-D2-LG-STD-2	1.023	347096.188	200.0	197.97	1.0000	1.0	1.00	
3	20211116-D2-LG-STD-3	1.023	556423.563	300.0	317.69	1.0000	1.0	1.00	
4	20211116-D2-LG-STD-4	1.023	677693.250	400.0	387.05	1.0000	1.0	1.00	
5	20211116-D2-LG-STD-5	1.023	1028844.500	600.0	587.88	1.0000	1.0	1.00	
6	20211116-D2-LG-STD-6	1.023	1417792.125	800.0	810.33	1.0000	1.0	1.00	

Quantify Compound Summary Report MassLynx V4.2 SCN943 SCN979									Page 2 of 3
CITEacuicola UPCH									
Dataset: C:\MassLynx\BENZOILUREAS.PRO\20211116_DIA2_LINEALIDAD.qld									
Printed: Friday, November 19, 2021 09:01:04 SA Pacific Standard Time									
Compound name: Teflubenzuron									
Correlation coefficient: r = 0.998995, r <sup>2</sup> = 0.997990									
Calibration curve: 10.1937 * x + -7.99527									
Response type: External Std, Area									
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None									
	Name	RT	Area	Std. Conc	Conc.	Divisor1	Factor1	Factor2	
1	20211116-D2-LG-STD-1	1.582	111.395	10.0	11.71	1.0000	1.0	1.00	
2	20211116-D2-LG-STD-2	1.574	182.158	20.0	18.65	1.0000	1.0	1.00	
3	20211116-D2-LG-STD-3	1.574	466.451	50.0	46.54	1.0000	1.0	1.00	
4	20211116-D2-LG-STD-4	1.582	964.647	100.0	95.42	1.0000	1.0	1.00	
5	20211116-D2-LG-STD-5	1.574	1997.629	200.0	196.75	1.0000	1.0	1.00	
6	20211116-D2-LG-STD-6	1.574	4180.841	400.0	410.92	1.0000	1.0	1.00	

Quantify Compound Summary Report MassLynx V4.2 SCN943 SCN979									Page 1 of 3
CITEacuicola UPCH									
Dataset: C:\MassLynx\BENZOILUREAS.PRO\20211117_DIA3_LINEALIDAD.qld									
Printed: Friday, November 19, 2021 09:01:38 SA Pacific Standard Time									
Method: C:\MassLynx\BENZOILUREAS.PRO\MethDB\Benzoilureas_20211217_LG.mdb 14 Sep 2021 10:25:23									
Calibration: 19 Nov 2021 09:01:30									
Compound name: Diflubenzuron									
Correlation coefficient: r = 0.998814, r <sup>2</sup> = 0.997630									
Calibration curve: 1722.73 * x + 22046.1									
Response type: External Std, Area									
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None									
	Name	RT	Area	Std. Conc	Conc.	Divisor1	Factor1	Factor2	
1	20211117-D3-LG-STD-1	1.015	185426.781	100.0	94.84	1.0000	1.0	1.00	
2	20211117-D3-LG-STD-2	1.015	381069.688	200.0	208.40	1.0000	1.0	1.00	
3	20211117-D3-LG-STD-3	1.015	540830.000	300.0	301.14	1.0000	1.0	1.00	
4	20211117-D3-LG-STD-4	1.015	739303.938	400.0	416.35	1.0000	1.0	1.00	
5	20211117-D3-LG-STD-5	1.015	1017785.063	600.0	578.00	1.0000	1.0	1.00	
6	20211117-D3-LG-STD-6	1.015	1402407.500	800.0	801.27	1.0000	1.0	1.00	

Quantify Compound Summary Report MassLynx V4.2 SCN943 SCN979									Page 2 of 3
CITEacuicola UPCH									
Dataset: C:\MassLynx\BENZOILUREAS.PRO\20211117_DIA3_LINEALIDAD.qld									
Printed: Friday, November 19, 2021 09:01:38 SA Pacific Standard Time									
<b>Compound name: Teflubenzuron</b>									
Correlation coefficient: $r = 0.995542$ , $r^2 = 0.991103$									
Calibration curve: $10.1448 * x + 4.82775$									
Response type: External Std, Area									
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None									
	Name	RT	Area	Std. Conc	Conc.	Divisor1	Factor1	Factor2	
1	20211117-D3-LG-STD-1	1.566	98.630	10.0	9.25	1.0000	1.0	1.00	
2	20211117-D3-LG-STD-2	1.574	211.010	20.0	20.32	1.0000	1.0	1.00	
3	20211117-D3-LG-STD-3	1.566	543.660	50.0	53.11	1.0000	1.0	1.00	
4	20211117-D3-LG-STD-4	1.566	936.930	100.0	91.88	1.0000	1.0	1.00	
5	20211117-D3-LG-STD-5	1.566	2295.453	200.0	225.79	1.0000	1.0	1.00	
6	20211117-D3-LG-STD-6	1.566	3856.195	400.0	379.64	1.0000	1.0	1.00	

## b) Límite de Detección y Cuantificación

- Para Langostino:

Quantify Compound Summary Report MassLynx V4.2 SCN943 SCN979									Page 1 of 3
CITEacuicola UPCH									
Dataset: C:\MassLynx\BENZOILUREAS.PRO\20211109-LG-LD_LC-D1-.qld									
Printed: Tuesday, November 16, 2021 08:46:15 SA Pacific Standard Time									
<b>Method: C:\MassLynx\BENZOILUREAS.PRO\MethDB\Benzoilureas_20211217_LG.mdb 15 Nov 2021 22:27:02</b>									
<b>Calibration: 15 Nov 2021 22:28:05</b>									
<b>Compound name: Diflubenzuron</b>									
Coefficient of Determination: $R^2 = 0.995799$									
Calibration curve: $2924.93 * x$									
Response type: External Std, Area									
Curve type: Linear, Origin: Force, Weighting: 1/x, Axis trans: None									
	Name	RT	Area	Std. Conc	Conc.	Divisor1	Factor1	Factor2	
1	20211109-BNZ-ST1	1.046	280858.250	100.0	96.02	1.0000	1.0	1.00	
2	20211109-BNZ-ST2	1.046	564636.438	200.0	193.04	1.0000	1.0	1.00	
3	20211109-BNZ-ST3	1.046	865985.250	300.0	296.07	1.0000	1.0	1.00	
4	20211109-BNZ-ST4	1.046	1196493.000	400.0	409.07	1.0000	1.0	1.00	
5	20211109-BNZ-ST5	1.046	1858208.125	600.0	635.30	1.0000	1.0	1.00	
6	20211109-BNZ-ST6	1.046	2253652.500	800.0	770.50	1.0000	1.0	1.00	
7	20211109-BNZ-FM-2					0.0000	0.0	0.00	
8	20211109-BNZ-LoD-D1-1	1.046	71755.016		60.92	2.0135	5.0	0.00	
9	20211109-BNZ-LoD-D1-2	1.046	77766.805		66.07	2.0122	5.0	0.00	
10	20211109-BNZ-LoD-D1-3	1.046	69517.938		58.80	2.0211	5.0	0.00	
11	20211109-BNZ-LoD-D1-4	1.046	72120.266		61.38	2.0084	5.0	0.00	
12	20211109-BNZ-LoD-D1-5	1.046	70760.344		60.19	2.0097	5.0	0.00	
13	20211109-BNZ-LoD-D1-6	1.046	67279.398		57.49	2.0007	5.0	0.00	
14	20211109-BNZ-LoD-D1-7	1.046	64962.691		55.31	2.0078	5.0	0.00	
15	20211109-BNZ-LoD-D1-8	1.046	72056.188		61.43	2.0052	5.0	0.00	
16	20211109-BNZ-LoD-D1-9	1.046	74957.906		63.30	2.0242	5.0	0.00	
17	20211109-BNZ-LoD-D1-10	1.046	75290.930		63.90	2.0143	5.0	0.00	

Quantify Compound Summary Report MassLynx V4.2 SCN943 SCN979									
CITEacuicola UPCH									
Dataset: C:\MassLynx\BENZOILUREAS.PRO\20211109-LG-LD_LC-D1-.qld									
Printed: Tuesday, November 16, 2021 08:46:15 SA Pacific Standard Time									
<b>Compound name: Teflubenzuron</b>									
Coefficient of Determination: R <sup>2</sup> = 0.994983									
Calibration curve: 88.3897 * x									
Response type: External Std, Area									
Curve type: Linear, Origin: Force, Weighting: 1/x, Axis trans: None									
Name	RT	Area	Std. Conc	Conc.	Divisor1	Factor1	Factor2		
1	20211109-BNZ -ST1	1.628	998.796	10.0	11.30	1.0000	1.0	1.00	
2	20211109-BNZ -ST2	1.628	2035.771	20.0	23.03	1.0000	1.0	1.00	
3	20211109-BNZ -ST3	1.628	4583.599	50.0	51.86	1.0000	1.0	1.00	
4	20211109-BNZ -ST4	1.628	9905.240	100.0	112.06	1.0000	1.0	1.00	
5	20211109-BNZ -ST5	1.628	17504.834	200.0	198.04	1.0000	1.0	1.00	
6	20211109-BNZ -ST6	1.636	33915.758	400.0	383.71	1.0000	1.0	1.00	
7	20211109-BNZ-FM -2					0.0000	0.0	0.00	
8	20211109-BNZ-LoD-D1-1	1.628	447.854		12.58	2.0135	5.0	0.00	
9	20211109-BNZ-LoD-D1-2	1.628	431.952		12.14	2.0122	5.0	0.00	
10	20211109-BNZ-LoD-D1-3	1.636	399.864		11.19	2.0211	5.0	0.00	
11	20211109-BNZ-LoD-D1-4	1.628	370.035		10.42	2.0084	5.0	0.00	
12	20211109-BNZ-LoD-D1-5	1.628	422.196		11.88	2.0097	5.0	0.00	
13	20211109-BNZ-LoD-D1-6	1.628	363.958		10.29	2.0007	5.0	0.00	
14	20211109-BNZ-LoD-D1-7	1.628	400.917		11.30	2.0078	5.0	0.00	
15	20211109-BNZ-LoD-D1-8	1.628	437.684		12.35	2.0052	5.0	0.00	
16	20211109-BNZ-LoD-D1-9	1.628	483.822		13.52	2.0242	5.0	0.00	
17	20211109-BNZ-LoD-D1-10	1.628	390.081		10.95	2.0143	5.0	0.00	

Quantify Compound Summary Report MassLynx V4.2 SCN943 SCN979									
CITEacuicola UPCH									
Dataset: C:\MassLynx\BENZOILUREAS.PRO\20211110-LG-LD_LC-D2-.qld									
Printed: Tuesday, November 16, 2021 08:47:10 SA Pacific Standard Time									
<b>Method: C:\MassLynx\BENZOILUREAS.PRO\MethDB\Benzoilureas_20211217_LG.mdb 16 Nov 2021 08:37:11</b>									
<b>Calibration: 16 Nov 2021 08:37:23</b>									
<b>Compound name: Diflubenzuron</b>									
Coefficient of Determination: R <sup>2</sup> = 0.989764									
Calibration curve: 1858.9 * x									
Response type: External Std, Area									
Curve type: Linear, Origin: Force, Weighting: 1/x, Axis trans: None									
Name	RT	Area	Std. Conc	Conc.	Divisor1	Factor1	Factor2		
1	20211110-BNZ-LoD-D2-1	1.031	44854.328		59.95	2.0125	5.0	0.00	
2	20211110-BNZ-LoD-D2-2	1.023	42393.742		56.70	2.0111	5.0	0.00	
3	20211110-BNZ-LoD-D2-3	1.031	41416.340		55.54	2.0058	5.0	0.00	
4	20211110-BNZ-LoD-D2-4	1.023	44078.016		59.15	2.0045	5.0	0.00	
5	20211110-BNZ-LoD-D2-5	1.023	41864.801		56.03	2.0098	5.0	0.00	
6	20211110-BNZ-LoD-D2-6	1.023	48110.102		64.02	2.0212	5.0	0.00	
7	20211110-BNZ-LoD-D2-7	1.031	40193.227		54.02	2.0012	5.0	0.00	
8	20211110-BNZ-LoD-D2-8	1.023	43049.875		57.87	2.0008	5.0	0.00	
9	20211110-BNZ-LoD-D2-9	1.023	44799.598		59.46	2.0267	5.0	0.00	
10	20211110-BNZ-LoD-D2-10	1.023	44067.754		58.97	2.0101	5.0	0.00	
11	20211110-BNZ-FM -3					0.0000	0.0	0.00	
12	20211110-BNZ -ST1-	1.023	209518.188	100.0	112.71	1.0000	1.0	1.00	
13	20211110-BNZ -ST2-	1.023	339709.875	200.0	182.75	1.0000	1.0	1.00	
14	20211110-BNZ -ST3-	1.023	506773.125	300.0	272.62	1.0000	1.0	1.00	
15	20211110-BNZ -ST4-	1.023	811369.250	400.0	436.48	1.0000	1.0	1.00	
16	20211110-BNZ -ST5-	1.023	1115996.625	600.0	600.35	1.0000	1.0	1.00	
17	20211110-BNZ -ST6-	1.023	1477982.375	800.0	795.09	1.0000	1.0	1.00	

Quantify Compound Summary Report MassLynx V4.2 SCN943 SCN979									Page 2 of 3
CITEacuicola UPCH									
Dataset: C:\MassLynx\BENZOILUREAS.PRO\20211110-LG-LD_LC-D2-.qld									
Printed: Tuesday, November 16, 2021 08:47:10 SA Pacific Standard Time									
<b>Compound name: Teflubenzuron</b>									
Coefficient of Determination: R <sup>2</sup> = 0.997603									
Calibration curve: 17.9865 * x									
Response type: External Std, Area									
Curve type: Linear, Origin: Force, Weighting: 1/x, Axis trans: None									
	Name	RT	Area	Std. Conc	Conc.	Divisor1	Factor1	Factor2	
1	20211110-BNZ-LoD-D2-1	1.589	76.614		10.58	2.0125	5.0	0.00	
2	20211110-BNZ-LoD-D2-2	1.589	72.185		9.98	2.0111	5.0	0.00	
3	20211110-BNZ-LoD-D2-3	1.589	61.616		8.54	2.0058	5.0	0.00	
4	20211110-BNZ-LoD-D2-4	1.589	75.887		10.52	2.0045	5.0	0.00	
5	20211110-BNZ-LoD-D2-5	1.597	76.595		10.59	2.0098	5.0	0.00	
6	20211110-BNZ-LoD-D2-6	1.589	73.153		10.06	2.0212	5.0	0.00	
7	20211110-BNZ-LoD-D2-7	1.589	73.230		10.17	2.0012	5.0	0.00	
8	20211110-BNZ-LoD-D2-8	1.589	106.791		14.84	2.0008	5.0	0.00	
9	20211110-BNZ-LoD-D2-9	1.589	66.736		9.15	2.0267	5.0	0.00	
10	20211110-BNZ-LoD-D2-10	1.589	77.322		10.69	2.0101	5.0	0.00	
11	20211110-BNZ-FM -3					0.0000	0.0	0.00	
12	20211110-BNZ -ST1-	1.589	208.127	10.0	11.57	1.0000	1.0	1.00	
13	20211110-BNZ -ST2-	1.589	381.632	20.0	21.22	1.0000	1.0	1.00	
14	20211110-BNZ -ST3-	1.589	1013.594	50.0	56.35	1.0000	1.0	1.00	
15	20211110-BNZ -ST4-	1.589	1718.600	100.0	95.55	1.0000	1.0	1.00	
16	20211110-BNZ -ST5-	1.589	3583.482	200.0	199.23	1.0000	1.0	1.00	
17	20211110-BNZ -ST6-	1.589	7124.045	400.0	396.08	1.0000	1.0	1.00	

Quantify Compound Summary Report MassLynx V4.2 SCN943 SCN979									Page 1 of 3
CITEacuicola UPCH									
Dataset: C:\MassLynx\BENZOILUREAS.PRO\20211111-LG-LD_LC-D3-.qld									
Printed: Tuesday, November 16, 2021 08:47:50 SA Pacific Standard Time									
<b>Method: C:\MassLynx\BENZOILUREAS.PRO\MethDB\Benzoilureas_20211217_LG.mdb 16 Nov 2021 08:41:16</b>									
<b>Calibration: 16 Nov 2021 08:41:31</b>									
<b>Compound name: Diflubenzuron</b>									
Coefficient of Determination: R <sup>2</sup> = 0.997997									
Calibration curve: 1783.33 * x									
Response type: External Std, Area									
Curve type: Linear, Origin: Force, Weighting: 1/x, Axis trans: None									
	Name	RT	Area	Std. Conc	Conc.	Divisor1	Factor1	Factor2	
1	20211111-BNZ-LoD-D2-1	1.031	40295.348		56.11	2.0136	5.0	0.00	
2	20211111-BNZ-LoD-D2-2	1.023	43941.172		60.93	2.0221	5.0	0.00	
3	20211111-BNZ-LoD-D2-3	1.031	40084.449		56.14	2.0018	5.0	0.00	
4	20211111-BNZ-LoD-D2-4	1.023	41086.023		57.26	2.0117	5.0	0.00	
5	20211111-BNZ-LoD-D2-5	1.023	41152.523		57.28	2.0145	5.0	0.00	
6	20211111-BNZ-LoD-D2-6	1.023	43080.488		60.14	2.0085	5.0	0.00	
7	20211111-BNZ-LoD-D2-7	1.023	37745.023		52.75	2.0063	5.0	0.00	
8	20211111-BNZ-LoD-D2-8	1.023	41910.734		58.65	2.0035	5.0	0.00	
9	20211111-BNZ-LoD-D2-9	1.031	41291.512		57.84	2.0015	5.0	0.00	
10	20211111-BNZ-LoD-D2-10	1.023	41165.410		57.67	2.0012	5.0	0.00	
11	20211111-BNZ-FM -3					0.0000	0.0	0.00	
12	20211111-BNZ -ST1-	1.023	188597.719	100.0	105.76	1.0000	1.0	1.00	
13	20211111-BNZ -ST2-	1.031	355227.750	200.0	199.19	1.0000	1.0	1.00	
14	20211111-BNZ -ST3-	1.023	517070.531	300.0	289.95	1.0000	1.0	1.00	
15	20211111-BNZ -ST4-	1.031	702815.313	400.0	394.10	1.0000	1.0	1.00	
16	20211111-BNZ -ST5-	1.023	1089610.375	600.0	611.00	1.0000	1.0	1.00	

**Quantify Compound Summary Report**      **MassLynx V4.2 SCN943 SCN979** Page 2 of 3  
 CITEacuicola UPCH  
 Dataset: C:\MassLynx\BENZOILUREAS.PRO\20211111-LG-LD\_LC-D3-.qld  
 Printed: Tuesday, November 16, 2021 08:47:50 SA Pacific Standard Time

**Compound name: Teflubenzuron**  
 Coefficient of Determination: R<sup>2</sup> = 0.994174  
 Calibration curve: 12.5593 \* x  
 Response type: External Std, Area  
 Curve type: Linear, Origin: Force, Weighting: 1/x, Axis trans: None

	Name	RT	Area	Std. Conc	Conc.	Divisor1	Factor1	Factor2
1	20211111-BNZ-LoD-D2-1	1.589	56.543		11.18	2.0136	5.0	0.00
2	20211111-BNZ-LoD-D2-2	1.589	55.946		11.01	2.0221	5.0	0.00
3	20211111-BNZ-LoD-D2-3	1.589	64.869		12.90	2.0018	5.0	0.00
4	20211111-BNZ-LoD-D2-4	1.589	67.073		13.27	2.0117	5.0	0.00
5	20211111-BNZ-LoD-D2-5	1.589	52.589		10.39	2.0145	5.0	0.00
6	20211111-BNZ-LoD-D2-6	1.589	59.815		11.86	2.0085	5.0	0.00
7	20211111-BNZ-LoD-D2-7	1.589	52.007		10.32	2.0063	5.0	0.00
8	20211111-BNZ-LoD-D2-8	1.589	45.452		9.03	2.0035	5.0	0.00
9	20211111-BNZ-LoD-D2-9	1.589	63.972		12.72	2.0015	5.0	0.00
10	20211111-BNZ-LoD-D2-10	1.582	55.087		10.96	2.0012	5.0	0.00
11	20211111-BNZ-FM -3				0.0000		0.0	0.00
12	20211111-BNZ -ST1-	1.589	144.917	10.0	11.54	1.0000	1.0	1.00
13	20211111-BNZ -ST2-	1.589	302.288	20.0	24.07	1.0000	1.0	1.00
14	20211111-BNZ -ST3-	1.589	633.467	50.0	50.44	1.0000	1.0	1.00
15	20211111-BNZ -ST4-	1.589	1191.781	100.0	94.89	1.0000	1.0	1.00
16	20211111-BNZ -ST5-	1.589	2500.088	200.0	199.06	1.0000	1.0	1.00

- **Para trucha arcoíris:**

**Quantify Overview Report**      **MassLynx V4.2 SCN943 SCN979** Page 1 of 1  
 CITEacuicola UPCH  
 Dataset: C:\MassLynx\BENZOILUREAS.PRO\20211109\_LD-LC\_D1.qld  
 Printed: Thursday, September 09, 2021 20:08:35 SA Pacific Standard Time

**Method: C:\MassLynx\BENZOILUREAS.PRO\MethDB\Benzoilureas\_20211110.mdb 11 Nov 2021 10:14:34**  
**Calibration: 11 Nov 2021 10:14:50**

	Diflubenzuron	Teflubenzuron	Emamectin Benzoate
20211109-Bk-FM-96			
20211109-LoD-D1-1	10.14	11.05	1.12
20211109-LoD-D1-2	9.01	11.78	1.13
20211109-LoD-D1-3	8.68	10.00	1.07
20211109-LoD-D1-4	11.35	12.51	1.10
20211109-LoD-D1-5	9.95	12.85	1.06
20211109-LoD-D1-6	10.08	8.78	1.00
20211109-LoD-D1-7	9.09	9.78	0.95
20211109-LoD-D1-8	10.24	10.60	0.97
20211109-LoD-D1-9	10.56	10.72	0.97
20211109-LoD-D1-10	9.15	11.02	0.94

Quantify Overview Report		MassLynx V4.2 SCN943 SCN979		Page 1 of 1
CITEacuicola UPCH				
Dataset: C:\MassLynx\BENZOILUREAS.PRO\20211110_LD-LC_D2.qld				
Printed: Thursday, September 09, 2021 20:09:40 SA Pacific Standard Time				
<b>Method: C:\MassLynx\BENZOILUREAS.PRO\MethDB\Benzoilureas_20211110.mdb 11 Nov 2021 09:51:50</b>				
<b>Calibration: 11 Nov 2021 09:54:12</b>				
	Diflubenzuron	Teflubenzuron	Emamectin Benzoate	
20211110-DFB-BK-Mx-Tru				
20211110-Bk-FM-2				
20211110-LoD-D2-1	9.38	14.27	1.17	
20211110-LoD-D2-2	10.31	9.23	1.17	
20211110-LoD-D2-3	9.85	10.92	1.09	
20211110-LoD-D2-4	10.75	11.32	1.16	
20211110-LoD-D2-5	9.82	10.01	1.03	
20211110-LoD-D2-6	9.78	9.21	1.00	
20211110-LoD-D2-7	8.79	9.44	0.90	
20211110-LoD-D2-8	9.75	8.45	1.02	
20211110-LoD-D2-9	8.85	9.06	0.95	
20211110-LoD-D2-10	10.67	8.36	1.00	

Quantify Overview Report		MassLynx V4.2 SCN943 SCN979		Page 1 of 1
CITEacuicola UPCH				
Dataset: C:\MassLynx\BENZOILUREAS.PRO\20211113_LD-LC_D3.qld				
Printed: Thursday, September 09, 2021 20:33:12 SA Pacific Standard Time				
<b>Method: C:\MassLynx\BENZOILUREAS.PRO\MethDB\Benzoilureas_20211110.mdb 15 Nov 2021 08:38:39</b>				
<b>Calibration: 15 Nov 2021 08:38:56</b>				
	Diflubenzuron	Teflubenzuron	Emamectin Benzoate	
20211113-DFB-BK-Mx-Tru				
20211113 -Bk-FM-1				
20211113-LoD-D3-1	10.06	11.56	1.05	
20211113-LoD-D3-2	10.44	10.21	0.99	
20211113-LoD-D3-3	9.63	10.58	0.96	
20211113-LoD-D3-4	8.54	10.10	0.87	
20211113-LoD-D3-5	10.28	9.68	0.97	
20211113-LoD-D3-6	9.07	11.22	0.88	
20211113-LoD-D3-7	9.89	10.36	0.89	
20211113-LoD-D3-8	9.78	9.91	0.84	
20211113-LoD-D3-9	9.65	10.40	0.77	
20211113-LoD-D3-10	8.64	9.36	0.81	

### c) Veracidad y precisión

- Para trucha arcoíris

Quantify Compound Summary Report MassLynx V4.2 SCN943 SCN979									Page 1 of 6
CITEacuicola UPCH									
Dataset: C:\MassLynx\BENZOILUREAS.PRO\20211113_TRU_Nv1-2-3_FINAL.qld									
Printed: Friday, September 17, 2021 10:00:48 SA Pacific Standard Time									
Method: C:\MassLynx\BENZOILUREAS.PRO\MethDB\Benzoilureas_20211220_TRU.mdb 17 Nov 2021 18:31:46									
Calibration: 17 Nov 2021 18:31:46									
Compound name: Diflubenzuron									
Correlation coefficient: r = 0.997739, r <sup>2</sup> = 0.995483									
Calibration curve: 3071.84 * x + -9552.62									
Response type: External Std, Area									
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None									
	Name	RT	Area	Std. Conc	Conc.	Divisor1	Factor1	Factor2	
1	20211113-D1-BK-Mx-Truc...					2.0000	5.0	0.00	
2	20211113-D1-T-STD-1	1.046	305726.219	100.0	102.64	1.0000	1.0	1.00	
3	20211113-D1-T-STD-2	1.046	621301.063	200.0	205.37	1.0000	1.0	1.00	
4	20211113-D1-T-STD-3	1.046	858938.875	300.0	282.73	1.0000	1.0	1.00	
5	20211113-D1-T-STD-4	1.046	1230471.375	400.0	403.67	1.0000	1.0	1.00	
6	20211113-D1-T-STD-5	1.046	1746635.875	600.0	571.71	1.0000	1.0	1.00	
7	20211113-D1-T-STD-6	1.038	2552029.750	800.0	833.89	1.0000	1.0	1.00	
8	20211113-Bk-FM-3-					0.0000	0.0	0.00	
9	20211113-D1-T-Nv1-A1-1	1.038	350671.375		292.71	2.0031	5.0	0.00	
10	20211113-D1-T-Nv1-A1-2	1.046	291602.563		244.18	2.0075	5.0	0.00	
11	20211113-D1-T-Nv1-A1-3	1.046	344885.656		287.25	2.0084	5.0	0.00	
12	20211113-D1-T-Nv1-A1-4	1.046	314489.406		263.50	2.0017	5.0	0.00	
13	20211113-D1-T-Nv1-A1-5	1.038	324813.156		270.79	2.0098	5.0	0.00	
14	20211113-D1-T-Nv1-A1-6	1.046	312991.844		261.18	2.0101	5.0	0.00	
15	20211113-D1-T-Nv1-A1-7	1.046	311706.688		259.70	2.0135	5.0	0.00	
16	20211113-D1-T-Nv1-A1-8	1.038	322962.625		267.75	2.0214	5.0	0.00	
17	20211113-Bk-FM-4-					0.0000	0.0	0.00	
18	20211113-D1-T-Nv1-A2-1	1.046	350617.938		290.98	2.0147	5.0	0.00	
19	20211113-D1-T-Nv1-A2-2	1.038	346182.438		288.96	2.0038	5.0	0.00	
20	20211113-D1-T-Nv1-A2-3	1.038	374763.875		311.61	2.0075	5.0	0.00	
21	20211113-D1-T-Nv1-A2-4	1.038	321275.250		269.23	2.0001	5.0	0.00	
22	20211113-D1-T-Nv1-A2-5	1.038	328620.656		273.62	2.0117	5.0	0.00	
23	20211113-D1-T-Nv1-A2-6	1.038	332667.250		278.03	2.0035	5.0	0.00	
24	20211113-D1-T-Nv1-A2-7	1.038	319467.000		264.83	2.0222	5.0	0.00	
25	20211113-D1-T-Nv1-A2-8	1.038	320313.750		267.98	2.0036	5.0	0.00	
26	20211113-Bk-FM-5-					0.0000	0.0	0.00	
27	20211113-D1-T-Nv2-A1-1	1.038	1406634.375		1150.54	2.0035	5.0	0.00	
28	20211113-D1-T-Nv2-A1-2	1.038	1214940.625		995.20	2.0027	5.0	0.00	
29	20211113-D1-T-Nv2-A1-3	1.038	1326205.625		1086.07	2.0019	5.0	0.00	
30	20211113-D1-T-Nv2-A1-4	1.046	1185026.125		972.20	2.0000	5.0	0.00	
31	20211113-D1-T-Nv2-A1-5	1.038	1234005.375		1005.33	2.0134	5.0	0.00	
32	20211113-D1-T-Nv2-A1-6	1.046	1060857.375		858.23	2.0301	5.0	0.00	
33	20211113-D1-T-Nv2-A1-7	1.038	1206875.250		985.06	2.0100	5.0	0.00	
34	20211113-D1-T-Nv2-A1-8	1.038	1256490.750		1026.56	2.0074	5.0	0.00	
35	20211113-Bk-FM-6-					0.0000	0.0	0.00	
36	20211113-D1-T-Nv2-A2-1	1.038	1418499.000		1157.12	2.0088	5.0	0.00	
37	20211113-D1-T-Nv2-A2-2	1.038	1329189.625		1084.65	2.0090	5.0	0.00	
38	20211113-D1-T-Nv2-A2-3	1.038	1223490.125		1001.45	2.0041	5.0	0.00	
39	20211113-D1-T-Nv2-A2-4	1.038	1238910.625		1015.60	2.0009	5.0	0.00	
40	20211113-D1-T-Nv2-A2-5	1.038	1204724.125		985.08	2.0064	5.0	0.00	
41	20211113-D1-T-Nv2-A2-6	1.038	1191810.625		972.91	2.0099	5.0	0.00	
42	20211113-D1-T-Nv2-A2-7	1.038	1198616.750		982.18	2.0022	5.0	0.00	
43	20211113-D1-T-Nv2-A2-8	1.038	1094933.875		898.48	2.0009	5.0	0.00	
44	20211113-Bk-FM-7-					0.0000	0.0	0.00	
45	20211113-D1-T-Nv3-A1-1	1.038	2066055.250		1679.23	2.0119	5.0	0.00	

LC-MS/MS

CITEacuicola UPCH

Dataset: C:\MassLynx\BENZOILUREAS.PRO\20211113\_TRU\_Nv1-2-3\_FINAL.qld

Printed: Friday, September 17, 2021 10:00:48 SA Pacific Standard Time

Compound name: Diflubenzuron

	Name	RT	Area	Std. Conc	Conc.	Divisor1	Factor1	Factor2
46	20211113-D1-T-Nv3-A1-2	1.038	1970863.125		1609.50	2.0028	5.0	0.00
47	20211113-D1-T-Nv3-A1-3	1.038	2048607.000		1669.26	2.0069	5.0	0.00
48	20211113-D1-T-Nv3-A1-4	1.038	1821890.375		1487.76	2.0037	5.0	0.00
49	20211113-D1-T-Nv3-A1-5	1.038	2120994.000		1722.31	2.0135	5.0	0.00
50	20211113-D1-T-Nv3-A1-6	1.038	1911179.125		1546.86	2.0211	5.0	0.00
51	20211113-D1-T-Nv3-A1-7	1.046	1944504.250		1576.58	2.0174	5.0	0.00
52	20211113-D1-T-Nv3-A1-8	1.038	1900472.375		1539.61	2.0193	5.0	0.00
53	20211113-Bk-FM-8-				0.0000		0.0	0.00
54	20211113-D1-T-Nv3-A2-1	1.038	2133829.250		1741.33	2.0035	5.0	0.00
55	20211113-D1-T-Nv3-A2-2	1.038	2114665.500		1713.02	2.0184	5.0	0.00
56	20211113-D1-T-Nv3-A2-3	1.038	1878078.000		1524.27	2.0157	5.0	0.00
57	20211113-D1-T-Nv3-A2-4	1.038	1980883.250		1608.40	2.0143	5.0	0.00
58	20211113-D1-T-Nv3-A2-5	1.038	1963884.000		1592.22	2.0174	5.0	0.00
59	20211113-D1-T-Nv3-A2-6	1.038	1723924.250		1409.79	2.0014	5.0	0.00
60	20211113-D1-T-Nv3-A2-7	1.038	1922901.000		1556.07	2.0214	5.0	0.00
61	20211113-D1-T-Nv3-A2-8	1.038	1895262.250		1537.08	2.0171	5.0	0.00

Quantify Compound Summary Report

MassLynx V4.2 SCN943 SCN979

CITEacuicola UPCH

Dataset: C:\MassLynx\BENZOILUREAS.PRO\20211113\_TRU\_Nv1-2-3\_FINAL.qld

Printed: Friday, September 17, 2021 10:00:48 SA Pacific Standard Time

Compound name: Teflubenzuron

Correlation coefficient: r = 0.999544, r<sup>2</sup> = 0.999088

Calibration curve: 102.728 \* x + -95.4574

Response type: External Std, Area

Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

	Name	RT	Area	Std. Conc	Conc.	Divisor1	Factor1	Factor2
1	20211113-D1-BK-Mx-Trruc...					2.0000	5.0	0.00
2	20211113-D1-T-STD-1	1.628	953.925	10.0	10.22	1.0000	1.0	1.00
3	20211113-D1-T-STD-2	1.628	2092.099	20.0	21.29	1.0000	1.0	1.00
4	20211113-D1-T-STD-3	1.628	4568.968	50.0	45.41	1.0000	1.0	1.00
5	20211113-D1-T-STD-4	1.628	10123.884	100.0	99.48	1.0000	1.0	1.00
6	20211113-D1-T-STD-5	1.628	20525.186	200.0	200.73	1.0000	1.0	1.00
7	20211113-D1-T-STD-6	1.620	41290.922	400.0	402.87	1.0000	1.0	1.00
8	20211113-Bk-FM-3-					0.0000	0.0	0.00
9	20211113-D1-T-Nv1-A1-1	1.628	2444.906		61.73	2.0031	5.0	0.00
10	20211113-D1-T-Nv1-A1-2	1.628	2259.406		57.09	2.0075	5.0	0.00
11	20211113-D1-T-Nv1-A1-3	1.628	2030.150		51.51	2.0084	5.0	0.00
12	20211113-D1-T-Nv1-A1-4	1.628	2157.989		54.79	2.0017	5.0	0.00
13	20211113-D1-T-Nv1-A1-5	1.620	2252.415		56.86	2.0098	5.0	0.00
14	20211113-D1-T-Nv1-A1-6	1.620	2083.171		52.75	2.0101	5.0	0.00
15	20211113-D1-T-Nv1-A1-7	1.628	1973.516		50.01	2.0135	5.0	0.00
16	20211113-D1-T-Nv1-A1-8	1.628	2013.835		50.79	2.0214	5.0	0.00
17	20211113-Bk-FM-4-					0.0000	0.0	0.00
18	20211113-D1-T-Nv1-A2-1	1.628	2694.739		67.41	2.0147	5.0	0.00
19	20211113-D1-T-Nv1-A2-2	1.620	2265.132		57.34	2.0038	5.0	0.00
20	20211113-D1-T-Nv1-A2-3	1.620	2215.761		56.04	2.0075	5.0	0.00
21	20211113-D1-T-Nv1-A2-4	1.620	2088.757		53.15	2.0001	5.0	0.00
22	20211113-D1-T-Nv1-A2-5	1.620	2305.939		58.10	2.0117	5.0	0.00
23	20211113-D1-T-Nv1-A2-6	1.620	2081.218		52.88	2.0035	5.0	0.00
24	20211113-D1-T-Nv1-A2-7	1.620	2024.887		51.03	2.0222	5.0	0.00
25	20211113-D1-T-Nv1-A2-8	1.620	2063.638		52.45	2.0036	5.0	0.00
26	20211113-Bk-FM-5-					0.0000	0.0	0.00
27	20211113-D1-T-Nv2-A1-1	1.620	23762.354		579.59	2.0035	5.0	0.00
28	20211113-D1-T-Nv2-A1-2	1.620	21703.600		529.79	2.0027	5.0	0.00
29	20211113-D1-T-Nv2-A1-3	1.620	20381.541		497.86	2.0019	5.0	0.00
30	20211113-D1-T-Nv2-A1-4	1.620	19911.479		486.89	2.0000	5.0	0.00
31	20211113-D1-T-Nv2-A1-5	1.620	19622.457		476.66	2.0134	5.0	0.00
32	20211113-D1-T-Nv2-A1-6	1.620	20382.469		490.96	2.0301	5.0	0.00
33	20211113-D1-T-Nv2-A1-7	1.620	18669.516		454.40	2.0100	5.0	0.00
34	20211113-D1-T-Nv2-A1-8	1.620	20239.281		493.04	2.0074	5.0	0.00
35	20211113-Bk-FM-6-					0.0000	0.0	0.00
36	20211113-D1-T-Nv2-A2-1	1.620	23580.166		573.65	2.0088	5.0	0.00
37	20211113-D1-T-Nv2-A2-2	1.620	20874.982		508.05	2.0090	5.0	0.00
38	20211113-D1-T-Nv2-A2-3	1.620	19112.604		466.49	2.0041	5.0	0.00
39	20211113-D1-T-Nv2-A2-4	1.620	20392.732		498.38	2.0009	5.0	0.00
40	20211113-D1-T-Nv2-A2-5	1.620	19221.113		468.59	2.0064	5.0	0.00
41	20211113-D1-T-Nv2-A2-6	1.620	18929.625		460.72	2.0099	5.0	0.00
42	20211113-D1-T-Nv2-A2-7	1.620	18657.969		455.88	2.0022	5.0	0.00
43	20211113-D1-T-Nv2-A2-8	1.620	20319.535		496.60	2.0009	5.0	0.00
44	20211113-Bk-FM-7-					0.0000	0.0	0.00
45	20211113-D1-T-Nv3-A1-1	1.620	35454.129		860.02	2.0119	5.0	0.00
46	20211113-D1-T-Nv3-A1-2	1.620	31288.832		762.70	2.0028	5.0	0.00
47	20211113-D1-T-Nv3-A1-3	1.620	30871.299		751.02	2.0069	5.0	0.00
48	20211113-D1-T-Nv3-A1-4	1.620	30761.971		749.56	2.0037	5.0	0.00
49	20211113-D1-T-Nv3-A1-5	1.620	31879.109		772.92	2.0135	5.0	0.00

LC-MS/MS

CITEacuicola UPCH

Dataset: C:\MassLynx\BENZOILUREAS.PRO\20211113\_TRU\_Nv1-2-3\_FINAL.qld

Printed: Friday, September 17, 2021 10:00:48 SA Pacific Standard Time

Compound name: Teflubenzuron

	Name	RT	Area	Std. Conc	Conc.	Divisor1	Factor1	Factor2
50	20211113-D1-T-Nv3-A1-6	1.620	30218.240		730.02	2.0211	5.0	0.00
51	20211113-D1-T-Nv3-A1-7	1.620	29075.379		703.78	2.0174	5.0	0.00
52	20211113-D1-T-Nv3-A1-8	1.620	31726.631		767.03	2.0193	5.0	0.00
53	20211113-Bk-FM-8-					0.0000	0.0	0.00
54	20211113-D1-T-Nv3-A2-1	1.620	33705.781		821.15	2.0035	5.0	0.00
55	20211113-D1-T-Nv3-A2-2	1.620	31267.234		756.29	2.0184	5.0	0.00
56	20211113-D1-T-Nv3-A2-3	1.620	30774.328		745.40	2.0157	5.0	0.00
57	20211113-D1-T-Nv3-A2-4	1.620	30146.357		730.74	2.0143	5.0	0.00
58	20211113-D1-T-Nv3-A2-5	1.620	30068.402		727.74	2.0174	5.0	0.00
59	20211113-D1-T-Nv3-A2-6	1.620	30123.057		734.89	2.0014	5.0	0.00
60	20211113-D1-T-Nv3-A2-7	1.620	28694.334		693.22	2.0214	5.0	0.00
61	20211113-D1-T-Nv3-A2-8	1.620	29730.938		719.71	2.0171	5.0	0.00

LC-MS/MS

Quantify Compound Summary Report MassLynx V4.2 SCN943 SCN979

CITEacuicola UPCH

Dataset: C:\MassLynx\BENZOILUREAS.PRO\20211115\_TRU\_Nv1-2-3\_FINAL.qld

Printed: Wednesday, November 17, 2021 11:14:52 SA Pacific Standard Time

Method: C:\MassLynx\BENZOILUREAS.PRO\MethDB\Benzoilureas\_20211220\_TRU.mdb 17 Nov 2021 18:58:54  
 Calibration: 17 Nov 2021 18:58:54

Compound name: Diflubenzuron

Correlation coefficient: r = 0.995820, r^2 = 0.991658

Calibration curve: 1874.6 \* x + -10699.9

Response type: External Std, Area

Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

	Name	RT	Area	Std. Conc	Conc.	Divisor1	Factor1	Factor2
1	20211115-D1-T-Nv1-A1-1	1.023	207146.953		288.89	2.0113	5.0	0.00
2	20211115-D1-T-Nv1-A1-2	1.023	190773.438		266.37	2.0174	5.0	0.00
3	20211115-D1-T-Nv1-A1-3	1.023	204738.188		285.39	2.0135	5.0	0.00
4	20211115-D1-T-Nv1-A1-4	1.023	199406.219		278.18	2.0145	5.0	0.00
5	20211115-D1-T-Nv1-A1-5	1.023	188111.422		262.80	2.0178	5.0	0.00
6	20211115-D1-T-Nv1-A1-6	1.023	199213.484		278.32	2.0117	5.0	0.00
7	20211115-D1-T-Nv1-A1-7	1.023	200587.813		280.72	2.0075	5.0	0.00
8	20211115-D1-T-Nv1-A1-8	1.023	204508.859		286.46	2.0038	5.0	0.00
9	20211115-BNZ-Bk-FM-4--					0.0000	0.0	0.00
10	20211115-D1-T-Nv1-A2-1	1.023	219008.109		306.08	2.0017	5.0	0.00
11	20211115-D1-T-Nv1-A2-2	1.023	190909.047		268.40	2.0035	5.0	0.00
12	20211115-D1-T-Nv1-A2-3	1.023	196886.344		275.76	2.0078	5.0	0.00
13	20211115-D1-T-Nv1-A2-4	1.023	214418.359		299.10	2.0075	5.0	0.00
14	20211115-D1-T-Nv1-A2-5	1.023	191778.219		269.52	2.0038	5.0	0.00
15	20211115-D1-T-Nv1-A2-6	1.023	178809.906		252.17	2.0045	5.0	0.00
16	20211115-D1-T-Nv1-A2-7	1.023	200186.797		280.27	2.0069	5.0	0.00
17	20211115-D1-T-Nv1-A2-8	1.023	197261.844		276.03	2.0095	5.0	0.00
18	20211115-BNZ-Bk-FM-5--					0.0000	0.0	0.00
19	20211115-D1-T-Nv2-A1-1	1.023	897730.063		1206.79	2.0078	5.0	0.00
20	20211115-D1-T-Nv2-A1-2	1.023	756975.813		1022.91	2.0017	5.0	0.00
21	20211115-D1-T-Nv2-A1-3	1.023	722741.250		976.42	2.0035	5.0	0.00
22	20211115-D1-T-Nv2-A1-4	1.023	806461.438		1084.46	2.0098	5.0	0.00
23	20211115-D1-T-Nv2-A1-5	1.023	829873.000		1116.20	2.0086	5.0	0.00
24	20211115-D1-T-Nv2-A1-6	1.023	704020.438		949.65	2.0074	5.0	0.00
25	20211115-D1-T-Nv2-A1-7	1.023	765123.313		1032.79	2.0036	5.0	0.00
26	20211115-D1-T-Nv2-A1-8	1.023	728762.938		985.27	2.0018	5.0	0.00
27	20211115-BNZ-Bk-FM-6--					0.0000	0.0	0.00
28	20211115-D1-T-Nv2-A2-1	1.023	909720.563		1217.08	2.0171	5.0	0.00
29	20211115-D1-T-Nv2-A2-2	1.023	683594.125		915.17	2.0235	5.0	0.00
30	20211115-D1-T-Nv2-A2-3	1.023	764383.625		1017.69	2.0314	5.0	0.00
31	20211115-D1-T-Nv2-A2-4	1.023	717965.000		970.98	2.0016	5.0	0.00
32	20211115-D1-T-Nv2-A2-5	1.023	889801.813		1199.42	2.0025	5.0	0.00
33	20211115-D1-T-Nv2-A2-6	1.023	718865.000		966.24	2.0139	5.0	0.00
34	20211115-D1-T-Nv2-A2-7	1.023	738684.375		988.57	2.0219	5.0	0.00
35	20211115-D1-T-Nv2-A2-8	1.023	756663.438		1017.42	2.0117	5.0	0.00
36	20211115-BNZ-Bk-FM-7--					0.0000	0.0	0.00
37	20211115-D1-T-Nv3-A1-1	1.023	1244013.750		1670.30	2.0036	5.0	0.00
38	20211115-D1-T-Nv3-A1-2	1.023	1420222.000		1906.58	2.0018	5.0	0.00
39	20211115-D1-T-Nv3-A1-3	1.023	1179835.250		1575.97	2.0149	5.0	0.00
40	20211115-D1-T-Nv3-A1-4	1.023	1119515.500		1484.92	2.0301	5.0	0.00
41	20211115-D1-T-Nv3-A1-5	1.023	1295158.625		1724.18	2.0201	5.0	0.00
42	20211115-D1-T-Nv3-A1-6	1.023	1364485.250		1821.13	2.0141	5.0	0.00
43	20211115-D1-T-Nv3-A1-7	1.023	1095175.875		1469.74	2.0069	5.0	0.00
44	20211115-D1-T-Nv3-A1-8	1.023	1122852.875		1501.44	2.0137	5.0	0.00
45	20211115-BNZ-Bk-FM-8--					0.0000	0.0	0.00

LC-MS/MS

CITEacuicola UPCH

Dataset: C:\MassLynx\BENZOILUREAS.PRO\20211115\_TRU\_Nv1-2-3\_FINAL.qld

Printed: Wednesday, November 17, 2021 11:14:52 SA Pacific Standard Time

Compound name: Diflubenzuron

	Name	RT	Area	Std. Conc	Conc.	Divisor1	Factor1	Factor2
46	20211115-D1-T-Nv3-A2-1	1.023	1363326.250		1818.42	2.0154	5.0	0.00
47	20211115-D1-T-Nv3-A2-2	1.023	1299319.875		1740.80	2.0072	5.0	0.00
48	20211115-D1-T-Nv3-A2-3	1.023	1150039.125		1543.66	2.0056	5.0	0.00
49	20211115-D1-T-Nv3-A2-4	1.023	1078733.375		1451.65	2.0017	5.0	0.00
50	20211115-D1-T-Nv3-A2-5	1.023	1127062.875		1509.94	2.0098	5.0	0.00
51	20211115-D1-T-Nv3-A2-6	1.023	1220615.375		1640.71	2.0017	5.0	0.00
52	20211115-D1-T-Nv3-A2-7	1.023	1128871.875		1513.09	2.0088	5.0	0.00
53	20211115-D1-T-Nv3-A2-8	1.023	1162000.625		1563.38	2.0007	5.0	0.00
54	20211115-BNZ-BK-FM-9-				0.0000	0.0000	0.0	0.00
55	20211115-D1-T-STD-1-	1.023	202441.922	100.0	113.70	1.0000	1.0	1.00
56	20211115-D1-T-STD-2-	1.023	334093.000	200.0	183.93	1.0000	1.0	1.00
57	20211115-D1-T-STD-3-	1.023	492406.594	300.0	268.38	1.0000	1.0	1.00
58	20211115-D1-T-STD-4-	1.023	746240.688	400.0	403.79	1.0000	1.0	1.00
59	20211115-D1-T-STD-5-	1.023	1120979.625	600.0	603.69	1.0000	1.0	1.00
60	20211115-D1-T-STD-6-	1.023	1538688.000	800.0	826.51	1.0000	1.0	1.00

LC-MS/MS

**Quantify Compound Summary Report**

MassLynx V4.2 SCN943 SCN979

CITEacuicola UPCH

Dataset: C:\MassLynx\BENZOILUREAS.PRO\20211115\_TRU\_Nv1-2-3\_FINAL.qld

Printed: Wednesday, November 17, 2021 11:14:52 SA Pacific Standard Time

**Compound name: Teflubenzuron**

Correlation coefficient:  $r = 0.996767$ ,  $r^2 = 0.993545$

Calibration curve:  $9.43504 * x + -14.2537$

Response type: External Std, Area

Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

	Name	RT	Area	Std. Conc	Conc.	Divisor1	Factor1	Factor2
1	20211115-D1-T-Nv1-A1-1	1.582	247.501		68.97	2.0113	5.0	0.00
2	20211115-D1-T-Nv1-A1-2	1.582	209.714		58.83	2.0174	5.0	0.00
3	20211115-D1-T-Nv1-A1-3	1.582	200.545		56.53	2.0135	5.0	0.00
4	20211115-D1-T-Nv1-A1-4	1.582	201.197		56.68	2.0145	5.0	0.00
5	20211115-D1-T-Nv1-A1-5	1.582	209.207		58.69	2.0178	5.0	0.00
6	20211115-D1-T-Nv1-A1-6	1.582	199.994		56.44	2.0117	5.0	0.00
7	20211115-D1-T-Nv1-A1-7	1.582	202.713		57.27	2.0075	5.0	0.00
8	20211115-D1-T-Nv1-A1-8	1.589	230.730		64.79	2.0038	5.0	0.00
9	20211115-BNZ-Bk-FM-4--					0.0000	0.0	0.00
10	20211115-D1-T-Nv1-A2-1	1.582	213.107		60.19	2.0017	5.0	0.00
11	20211115-D1-T-Nv1-A2-2	1.582	211.206		59.64	2.0035	5.0	0.00
12	20211115-D1-T-Nv1-A2-3	1.582	202.398		57.18	2.0078	5.0	0.00
13	20211115-D1-T-Nv1-A2-4	1.582	145.034		42.05	2.0075	5.0	0.00
14	20211115-D1-T-Nv1-A2-5	1.582	175.712		50.24	2.0038	5.0	0.00
15	20211115-D1-T-Nv1-A2-6	1.582	193.023		54.80	2.0045	5.0	0.00
16	20211115-D1-T-Nv1-A2-7	1.582	175.322		50.06	2.0069	5.0	0.00
17	20211115-D1-T-Nv1-A2-8	1.582	202.354		57.12	2.0095	5.0	0.00
18	20211115-BNZ-Bk-FM-5--					0.0000	0.0	0.00
19	20211115-D1-T-Nv2-A1-1	1.582	2262.526		600.93	2.0078	5.0	0.00
20	20211115-D1-T-Nv2-A1-2	1.582	1920.016		512.09	2.0017	5.0	0.00
21	20211115-D1-T-Nv2-A1-3	1.574	2023.836		539.09	2.0035	5.0	0.00
22	20211115-D1-T-Nv2-A1-4	1.582	1885.959		501.04	2.0098	5.0	0.00
23	20211115-D1-T-Nv2-A1-5	1.582	1879.991		499.77	2.0086	5.0	0.00
24	20211115-D1-T-Nv2-A1-6	1.582	2157.947		573.45	2.0074	5.0	0.00
25	20211115-D1-T-Nv2-A1-7	1.582	1909.595		508.85	2.0036	5.0	0.00
26	20211115-D1-T-Nv2-A1-8	1.582	1832.336		488.85	2.0018	5.0	0.00
27	20211115-BNZ-Bk-FM-6--					0.0000	0.0	0.00
28	20211115-D1-T-Nv2-A2-1	1.582	2272.160		600.69	2.0171	5.0	0.00
29	20211115-D1-T-Nv2-A2-2	1.582	1873.684		494.44	2.0235	5.0	0.00
30	20211115-D1-T-Nv2-A2-3	1.582	1972.557		518.31	2.0314	5.0	0.00
31	20211115-D1-T-Nv2-A2-4	1.582	1833.842		489.30	2.0016	5.0	0.00
32	20211115-D1-T-Nv2-A2-5	1.582	1972.811		525.85	2.0025	5.0	0.00
33	20211115-D1-T-Nv2-A2-6	1.582	1744.670		462.84	2.0139	5.0	0.00
34	20211115-D1-T-Nv2-A2-7	1.582	1739.043		459.54	2.0219	5.0	0.00
35	20211115-D1-T-Nv2-A2-8	1.582	1775.050		471.35	2.0117	5.0	0.00
36	20211115-BNZ-Bk-FM-7--					0.0000	0.0	0.00
37	20211115-D1-T-Nv3-A1-1	1.582	3204.981		851.47	2.0036	5.0	0.00
38	20211115-D1-T-Nv3-A1-2	1.582	3009.254		800.42	2.0018	5.0	0.00
39	20211115-D1-T-Nv3-A1-3	1.582	2604.228		688.69	2.0149	5.0	0.00
40	20211115-D1-T-Nv3-A1-4	1.574	2841.790		745.54	2.0301	5.0	0.00
41	20211115-D1-T-Nv3-A1-5	1.582	2915.044		768.45	2.0201	5.0	0.00
42	20211115-D1-T-Nv3-A1-6	1.582	3142.330		830.54	2.0141	5.0	0.00
43	20211115-D1-T-Nv3-A1-7	1.582	2655.582		704.99	2.0069	5.0	0.00
44	20211115-D1-T-Nv3-A1-8	1.582	2760.931		730.34	2.0137	5.0	0.00
45	20211115-BNZ-Bk-FM-8--					0.0000	0.0	0.00
46	20211115-D1-T-Nv3-A2-1	1.582	3245.153		857.05	2.0154	5.0	0.00
47	20211115-D1-T-Nv3-A2-2	1.582	2910.208		772.11	2.0072	5.0	0.00
48	20211115-D1-T-Nv3-A2-3	1.574	2645.019		702.66	2.0056	5.0	0.00
49	20211115-D1-T-Nv3-A2-4	1.574	3093.321		822.71	2.0017	5.0	0.00

LC-MS/MS

**Quantify Compound Summary Report**

MassLynx V4.2 SCN943 SCN979

Page 4 of 6

CITEacuicola UPCH

Dataset: C:\MassLynx\BENZOILUREAS.PRO\20211115\_TRU\_Nv1-2-3\_FINAL.qld

Printed: Wednesday, November 17, 2021 11:14:52 SA Pacific Standard Time

**Compound name: Teflubenzuron**

	Name	RT	Area	Std. Conc	Conc.	Divisor1	Factor1	Factor2
50	20211115-D1-T-Nv3-A2-5	1.574	2708.376		717.90	2.0098	5.0	0.00
51	20211115-D1-T-Nv3-A2-6	1.582	3157.863		839.80	2.0017	5.0	0.00
52	20211115-D1-T-Nv3-A2-7	1.574	2501.280		663.62	2.0088	5.0	0.00
53	20211115-D1-T-Nv3-A2-8	1.582	2649.206		705.49	2.0007	5.0	0.00
54	20211115-BNZ-Bk-FM-9-				0.0000		0.0	0.00
55	20211115-D1-T-STD-1-	1.582	110.271	10.0	13.20	1.0000	1.0	1.00
56	20211115-D1-T-STD-2-	1.574	145.735	20.0	16.96	1.0000	1.0	1.00
57	20211115-D1-T-STD-3-	1.582	377.503	50.0	41.52	1.0000	1.0	1.00
58	20211115-D1-T-STD-4-	1.574	928.775	100.0	99.95	1.0000	1.0	1.00
59	20211115-D1-T-STD-5-	1.574	1802.878	200.0	192.59	1.0000	1.0	1.00
60	20211115-D1-T-STD-6-	1.574	3908.645	400.0	415.78	1.0000	1.0	1.00

LC-MS/MS

Quantify Compound Summary Report MassLynx V4.2 SCN943 SCN979

CITEacuiicola UPOCH

Dataset: C:\MassLynx\BENZOILUREAS.PRO\20211116\_TRU\_Nv1-2-3\_FINAL.qld

Printed: Wednesday, November 17, 2021 11:17:00 SA Pacific Standard Time

Method: C:\MassLynx\BENZOILUREAS.PRO\MethDB\Benzoilureas\_20211220\_TRU.mdb 17 Nov 2021 19:25:23

Calibration: 17 Nov 2021 19:25:23

Compound name: Diflubenzuron

Correlation coefficient: r = 0.997849, r<sup>2</sup> = 0.995703

Calibration curve: 2136.76 \* x + -11889.2

Response type: External Std, Area

Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

	Name	RT	Area	Std. Conc	Conc.	Divisor1	Factor1	Factor2
1	20211116-D3-BK-Mx-Truc...					2.0019	5.0	0.00
2	20211116-D3-T-STD-1	1.023	214437.375	100.0	105.92	1.0000	1.0	1.00
3	20211116-D3-T-STD-2	1.023	414311.875	200.0	199.46	1.0000	1.0	1.00
4	20211116-D3-T-STD-3	1.023	595402.500	300.0	284.21	1.0000	1.0	1.00
5	20211116-D3-T-STD-4	1.015	828864.375	400.0	393.47	1.0000	1.0	1.00
6	20211116-D3-T-STD-5	1.023	1225385.625	600.0	579.04	1.0000	1.0	1.00
7	20211116-D3-T-STD-6	1.023	1778483.750	800.0	837.89	1.0000	1.0	1.00
8	20211116-BNZ-Bk-FM-3--					0.0000	0.0	0.00
9	20211116-D3-T-Nv1-A1-1	1.023	235878.609		289.61	2.0019	5.0	0.00
10	20211116-D3-T-Nv1-A1-2	1.023	211547.469		260.96	2.0035	5.0	0.00
11	20211116-D3-T-Nv1-A1-3	1.023	227508.563		279.44	2.0047	5.0	0.00
12	20211116-D3-T-Nv1-A1-4	1.023	256162.625		312.70	2.0059	5.0	0.00
13	20211116-D3-T-Nv1-A1-5	1.023	213910.094		263.16	2.0078	5.0	0.00
14	20211116-D3-T-Nv1-A1-6	1.023	222129.453		273.65	2.0011	5.0	0.00
15	20211116-D3-T-Nv1-A1-7	1.023	215913.078		266.43	2.0007	5.0	0.00
16	20211116-D3-T-Nv1-A1-8	1.023	244059.172		299.41	2.0003	5.0	0.00
17	20211116-BNZ-Bk-FM-4--					0.0000	0.0	0.00
18	20211116-D3-T-Nv1-A2-1	1.015	245201.297		298.78	2.0135	5.0	0.00
19	20211116-D3-T-Nv1-A2-2	1.023	227657.344		276.89	2.0244	5.0	0.00
20	20211116-D3-T-Nv1-A2-3	1.023	219655.094		267.75	2.0236	5.0	0.00
21	20211116-D3-T-Nv1-A2-4	1.023	238200.766		289.46	2.0217	5.0	0.00
22	20211116-D3-T-Nv1-A2-5	1.015	225366.047		273.34	2.0311	5.0	0.00
23	20211116-D3-T-Nv1-A2-6	1.023	231475.422		282.27	2.0175	5.0	0.00
24	20211116-D3-T-Nv1-A2-7	1.023	218072.328		268.81	2.0018	5.0	0.00
25	20211116-D3-T-Nv1-A2-8	1.023	239740.484		293.39	2.0069	5.0	0.00
26	20211116-BNZ-Bk-FM-5--					0.0000	0.0	0.00
27	20211116-D3-T-Nv2-A1-1	1.023	1146058.125		1345.84	2.0133	5.0	0.00
28	20211116-D3-T-Nv2-A1-2	1.023	885964.750		1044.84	2.0108	5.0	0.00
29	20211116-D3-T-Nv2-A1-3	1.015	889068.188		1048.14	2.0114	5.0	0.00
30	20211116-D3-T-Nv2-A1-4	1.023	858103.813		1007.31	2.0210	5.0	0.00
31	20211116-D3-T-Nv2-A1-5	1.023	982769.250		1150.23	2.0235	5.0	0.00
32	20211116-D3-T-Nv2-A1-6	1.015	869474.438		1022.55	2.0169	5.0	0.00
33	20211116-D3-T-Nv2-A1-7	1.015	862363.375		1012.85	2.0198	5.0	0.00
34	20211116-D3-T-Nv2-A1-8	1.023	844985.688		994.73	2.0157	5.0	0.00
35	20211116-BNZ-Bk-FM-6--					0.0000	0.0	0.00
36	20211116-D3-T-Nv2-A2-1	1.023	1035402.188		1219.35	2.0098	5.0	0.00
37	20211116-D3-T-Nv2-A2-2	1.015	834558.125		986.54	2.0077	5.0	0.00
38	20211116-D3-T-Nv2-A2-3	1.023	897224.250		1053.28	2.0197	5.0	0.00
39	20211116-D3-T-Nv2-A2-4	1.015	782255.000		914.69	2.0316	5.0	0.00
40	20211116-D3-T-Nv2-A2-5	1.023	951489.625		1115.05	2.0217	5.0	0.00
41	20211116-D3-T-Nv2-A2-6	1.015	799006.625		943.13	2.0119	5.0	0.00
42	20211116-D3-T-Nv2-A2-7	1.015	896500.125		1059.47	2.0063	5.0	0.00
43	20211116-D3-T-Nv2-A2-8	1.015	897814.938		1062.92	2.0027	5.0	0.00
44	20211116-BNZ-Bk-FM-7--					0.0000	0.0	0.00
45	20211116-D3-T-Nv3-A1-1	1.015	1694064.500		1974.44	2.0218	5.0	0.00

LC-MS/MS

**Quantify Compound Summary Report**

MassLynx V4.2 SCN943 SCN979

Page 2 of 6

CITEacuicola UPCH

Dataset: C:\MassLynx\BENZOILUREAS.PRO\20211116\_TRU\_Nv1-2-3\_FINAL.qld

Printed: Wednesday, November 17, 2021 11:17:00 SA Pacific Standard Time

**Compound name: Diflubenzuron**

	Name	RT	Area	Std. Conc	Conc.	Divisor1	Factor1	Factor2
46	20211116-D3-T-Nv3-A1-2	1.023	1739593.125		2017.95	2.0310	5.0	0.00
47	20211116-D3-T-Nv3-A1-3	1.015	1275066.500		1495.94	2.0131	5.0	0.00
48	20211116-D3-T-Nv3-A1-4	1.015	1245205.250		1463.99	2.0093	5.0	0.00
49	20211116-D3-T-Nv3-A1-5	1.015	1476563.250		1735.06	2.0074	5.0	0.00
50	20211116-D3-T-Nv3-A1-6	1.023	1706665.625		2009.90	2.0008	5.0	0.00
51	20211116-D3-T-Nv3-A1-7	1.015	1302704.125		1536.46	2.0021	5.0	0.00
52	20211116-D3-T-Nv3-A1-8	1.015	1312650.750		1546.07	2.0047	5.0	0.00
53	20211116-BNZ-Bk-FM-8--					0.0000	0.0	0.00
54	20211116-D3-T-Nv3-A2-1	1.023	1361175.250		1600.00	2.0081	5.0	0.00
55	20211116-D3-T-Nv3-A2-2	1.015	1702070.000		1998.63	2.0067	5.0	0.00
56	20211116-D3-T-Nv3-A2-3	1.023	1241326.500		1463.62	2.0036	5.0	0.00
57	20211116-D3-T-Nv3-A2-4	1.015	1280171.625		1505.08	2.0088	5.0	0.00
58	20211116-D3-T-Nv3-A2-5	1.015	1482062.000		1736.28	2.0134	5.0	0.00
59	20211116-D3-T-Nv3-A2-6	1.023	1496964.250		1749.87	2.0177	5.0	0.00
60	20211116-D3-T-Nv3-A2-7	1.015	1168608.625		1372.74	2.0123	5.0	0.00
61	20211116-D3-T-Nv3-A2-8	1.015	1286941.375		1518.41	2.0016	5.0	0.00

LC-MS/MS

Quantify Compound Summary Report MassLynx V4.2 SCN943 SCN979

CITEacuiicola UPCH

Dataset: C:\MassLynx\BENZOILUREAS.PRO\20211116\_TRU\_Nv1-2-3\_FINAL.qld

Printed: Wednesday, November 17, 2021 11:17:00 SA Pacific Standard Time

Compound name: Teflubenzuron

Correlation coefficient:  $r = 0.999398$ ,  $r^2 = 0.998796$

Calibration curve:  $17.2298 * x + 6.42285$

Response type: External Std, Area

Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

	Name	RT	Area	Std. Conc	Conc.	Divisor1	Factor1	Factor2
1	20211116-D3-BK-Mx-Truc...	1.551	4.280			2.0019	5.0	0.00
2	20211116-D3-T-STD-1	1.574	195.342	10.0	10.96	1.0000	1.0	1.00
3	20211116-D3-T-STD-2	1.574	342.839	20.0	19.53	1.0000	1.0	1.00
4	20211116-D3-T-STD-3	1.574	788.355	50.0	45.38	1.0000	1.0	1.00
5	20211116-D3-T-STD-4	1.574	1717.196	100.0	99.29	1.0000	1.0	1.00
6	20211116-D3-T-STD-5	1.574	3553.059	200.0	205.84	1.0000	1.0	1.00
7	20211116-D3-T-STD-6	1.574	6880.970	400.0	398.99	1.0000	1.0	1.00
8	20211116-BNZ-Bk-FM-3--					0.0000	0.0	0.00
9	20211116-D3-T-Nv1-A1-1	1.574	453.589		64.82	2.0019	5.0	0.00
10	20211116-D3-T-Nv1-A1-2	1.574	355.504		50.56	2.0035	5.0	0.00
11	20211116-D3-T-Nv1-A1-3	1.574	363.364		51.67	2.0047	5.0	0.00
12	20211116-D3-T-Nv1-A1-4	1.574	373.925		53.17	2.0059	5.0	0.00
13	20211116-D3-T-Nv1-A1-5	1.574	394.641		56.11	2.0078	5.0	0.00
14	20211116-D3-T-Nv1-A1-6	1.574	337.423		48.00	2.0011	5.0	0.00
15	20211116-D3-T-Nv1-A1-7	1.574	311.839		44.30	2.0007	5.0	0.00
16	20211116-D3-T-Nv1-A1-8	1.574	352.281		50.18	2.0003	5.0	0.00
17	20211116-BNZ-Bk-FM-4--					0.0000	0.0	0.00
18	20211116-D3-T-Nv1-A2-1	1.574	443.534		63.00	2.0135	5.0	0.00
19	20211116-D3-T-Nv1-A2-2	1.574	344.174		48.42	2.0244	5.0	0.00
20	20211116-D3-T-Nv1-A2-3	1.574	346.852		48.82	2.0236	5.0	0.00
21	20211116-D3-T-Nv1-A2-4	1.574	322.028		45.30	2.0217	5.0	0.00
22	20211116-D3-T-Nv1-A2-5	1.574	342.683		48.04	2.0311	5.0	0.00
23	20211116-D3-T-Nv1-A2-6	1.574	361.240		51.04	2.0175	5.0	0.00
24	20211116-D3-T-Nv1-A2-7	1.574	316.937		45.01	2.0018	5.0	0.00
25	20211116-D3-T-Nv1-A2-8	1.574	391.103		55.62	2.0069	5.0	0.00
26	20211116-BNZ-Bk-FM-5--	1.559	1.198			0.0000	0.0	0.00
27	20211116-D3-T-Nv2-A1-1	1.574	4087.132		588.19	2.0133	5.0	0.00
28	20211116-D3-T-Nv2-A1-2	1.574	3347.900		482.24	2.0108	5.0	0.00
29	20211116-D3-T-Nv2-A1-3	1.574	3337.792		480.63	2.0114	5.0	0.00
30	20211116-D3-T-Nv2-A1-4	1.574	3371.388		483.18	2.0210	5.0	0.00
31	20211116-D3-T-Nv2-A1-5	1.574	3095.688		443.04	2.0235	5.0	0.00
32	20211116-D3-T-Nv2-A1-6	1.574	3152.606		452.68	2.0169	5.0	0.00
33	20211116-D3-T-Nv2-A1-7	1.566	3190.227		457.43	2.0198	5.0	0.00
34	20211116-D3-T-Nv2-A1-8	1.574	3128.262		449.44	2.0157	5.0	0.00
35	20211116-BNZ-Bk-FM-6--	1.574	4.304			0.0000	0.0	0.00
36	20211116-D3-T-Nv2-A2-1	1.574	4188.787		603.89	2.0098	5.0	0.00
37	20211116-D3-T-Nv2-A2-2	1.566	3074.702		443.49	2.0077	5.0	0.00
38	20211116-D3-T-Nv2-A2-3	1.574	3491.526		500.75	2.0197	5.0	0.00
39	20211116-D3-T-Nv2-A2-4	1.566	3025.835		431.30	2.0316	5.0	0.00
40	20211116-D3-T-Nv2-A2-5	1.574	3360.390		481.43	2.0217	5.0	0.00
41	20211116-D3-T-Nv2-A2-6	1.574	2935.494		422.49	2.0119	5.0	0.00
42	20211116-D3-T-Nv2-A2-7	1.574	3092.361		446.36	2.0063	5.0	0.00
43	20211116-D3-T-Nv2-A2-8	1.574	3217.451		465.28	2.0027	5.0	0.00
44	20211116-BNZ-Bk-FM-7--					0.0000	0.0	0.00
45	20211116-D3-T-Nv3-A1-1	1.574	6261.319		897.78	2.0218	5.0	0.00
46	20211116-D3-T-Nv3-A1-2	1.574	5836.501		833.02	2.0310	5.0	0.00
47	20211116-D3-T-Nv3-A1-3	1.574	4360.841		627.70	2.0131	5.0	0.00
48	20211116-D3-T-Nv3-A1-4	1.574	4949.195		713.87	2.0093	5.0	0.00
49	20211116-D3-T-Nv3-A1-5	1.574	5432.739		784.44	2.0074	5.0	0.00

LC-MS/MS

CITEacucicola UPCH

Dataset: C:\MassLynx\BENZOILUREAS.PRO\20211116\_TRU\_Nv1-2-3\_FINAL.qld

Printed: Wednesday, November 17, 2021 11:17:00 SA Pacific Standard Time

Compound name: Teflubenzuron

	Name	RT	Area	Std. Conc	Conc.	Divisor1	Factor1	Factor2
50	20211116-D3-T-Nv3-A1-6	1.574	5432.867		787.05	2.0008	5.0	0.00
51	20211116-D3-T-Nv3-A1-7	1.574	4074.591		589.66	2.0021	5.0	0.00
52	20211116-D3-T-Nv3-A1-8	1.574	4562.425		659.52	2.0047	5.0	0.00
53	20211116-BNZ-Bk-FM-8--	1.582	4.207			0.0000	0.0	0.00
54	20211116-D3-T-Nv3-A2-1	1.574	6528.686		942.55	2.0081	5.0	0.00
55	20211116-D3-T-Nv3-A2-2	1.574	5471.970		790.39	2.0067	5.0	0.00
56	20211116-D3-T-Nv3-A2-3	1.574	4521.773		653.99	2.0036	5.0	0.00
57	20211116-D3-T-Nv3-A2-4	1.566	4243.008		612.03	2.0088	5.0	0.00
58	20211116-D3-T-Nv3-A2-5	1.574	5087.733		732.38	2.0134	5.0	0.00
59	20211116-D3-T-Nv3-A2-6	1.574	5164.540		741.87	2.0177	5.0	0.00
60	20211116-D3-T-Nv3-A2-7	1.566	3997.090		575.50	2.0123	5.0	0.00
61	20211116-D3-T-Nv3-A2-8	1.566	4517.008		653.95	2.0016	5.0	0.00

LC-MS/MS

• Para Langostino

Quantify Compound Summary Report MassLynx V4.2 SCN943 SCN979									Page 1 of 6
CITEacuicola UPCH									
Dataset: C:\MassLynx\BENZOILUREAS.PRO\20211115_LG_Nv1-2-3_FINAL2.qld									
Printed: Thursday, November 18, 2021 09:06:06 SA Pacific Standard Time									
Method: C:\MassLynx\BENZOILUREAS.PRO\MethDB\Benzoilureas_20211217_LG.mdb 15 Sep 2021 09:18:02									
Calibration: 18 Nov 2021 09:04:53									
Compound name: Diflubenzuron									
Correlation coefficient: r = 0.999607, r <sup>2</sup> = 0.999214									
Calibration curve: 1643.7 * x + 14227.1									
Response type: External Std, Area									
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None									
	Name	RT	Area	Std. Conc	Conc.	Divisor1	Factor1	Factor2	
1	20211115-D1-LG-STD-1	1.023	174527.188	100.0	97.52	1.0000	1.0	1.00	
2	20211115-D1-LG-STD-2	1.023	352943.750	200.0	206.07	1.0000	1.0	1.00	
3	20211115-D1-LG-STD-3	1.023	514468.250	300.0	304.34	1.0000	1.0	1.00	
4	20211115-D1-LG-STD-4	1.023	665211.938	400.0	396.05	1.0000	1.0	1.00	
5	20211115-D1-LG-STD-5	1.023	979974.188	600.0	587.54	1.0000	1.0	1.00	
6	20211115-D1-LG-STD-6	1.023	1343123.750	800.0	808.48	1.0000	1.0	1.00	
7	20211115-Bk-FM-3	1.031	174.335			0.0000	0.0	0.00	
8	20211115-D1 LG Nv1-A1-1	1.023	178847.500		250.17	2.0017	5.0	0.00	
9	20211115-D1 LG Nv1-A1-2	1.023	175750.406		245.47	2.0016	5.0	0.00	
10	20211115-D1 LG Nv1-A1-3	1.023	182889.078		254.78	2.0137	5.0	0.00	
11	20211115-D1 LG Nv1-A1-4	1.015	181949.844		253.12	2.0156	5.0	0.00	
12	20211115-D1 LG Nv1-A1-5	1.015	181689.672		253.36	2.0106	5.0	0.00	
13	20211115-D1-LG-Nv1-A1-6	1.023	175809.156		244.17	2.0130	5.0	0.00	
14	20211115-D1-LG-Nv1-A1-7	1.023	173730.406		241.62	2.0081	5.0	0.00	
15	20211115-D1-LG-Nv1-A1-8	1.023	177280.094		246.81	2.0096	5.0	0.00	
16	20211115-Bk-FM-4	1.031	114.132			0.0000	0.0	0.00	
17	20211115-D1 LG Nv1-A2-1	1.023	185165.766		259.03	2.0074	5.0	0.00	
18	20211115-D1 LG Nv1-A2-2	1.023	182686.453		255.50	2.0056	5.0	0.00	
19	20211115-D1 LG Nv1-A2-3	1.023	184522.453		258.28	2.0057	5.0	0.00	
20	20211115-D1-LG-Nv1-A2-4	1.023	177455.297		247.76	2.0041	5.0	0.00	
21	20211115-D1-LG-Nv1-A2-5	1.023	186842.578		261.68	2.0066	5.0	0.00	
22	20211115-D1-LG-Nv1-A2-6	1.023	177550.813		248.38	2.0002	5.0	0.00	
23	20211115-D1 LG Nv1-A2-7	1.015	193028.453		271.84	2.0008	5.0	0.00	
24	20211115-D1 LG Nv1-A2-8	1.015	180734.328		253.12	2.0010	5.0	0.00	
25	20211115-Bk-FM-5	1.031	196.482			0.0000	0.0	0.00	
26	20211115-D1 LG Nv2-A1-1	1.023	738953.313		1097.56	2.0086	5.0	0.00	
27	20211115-D1 LG Nv2-A1-2	1.023	758061.563		1126.05	2.0094	5.0	0.00	
28	20211115-D1 LG Nv2-A1-3	1.023	770918.688		1149.80	2.0019	5.0	0.00	
29	20211115-D1-LG-Nv2-A1-4	1.023	657714.563		976.96	2.0036	5.0	0.00	
30	20211115-D1-LG-Nv2-A1-5	1.023	690732.563		1026.16	2.0054	5.0	0.00	
31	20211115-D1-LG-Nv2-A1-6	1.023	702825.000		1044.98	2.0045	5.0	0.00	
32	20211115-D1 LG Nv2-A1-7	1.015	773397.125		1148.52	2.0107	5.0	0.00	
33	20211115-D1 LG Nv2-A1-8	1.015	724942.500		1075.59	2.0100	5.0	0.00	
34	20211115-Bk-FM-6	1.023	258.217			0.0000	0.0	0.00	
35	20211115-D1-LG-Nv2-A2-1	1.023	683533.313		1017.12	2.0017	5.0	0.00	
36	20211115-D1 LG Nv2-A2-2	1.015	797656.688		1187.76	2.0064	5.0	0.00	
37	20211115-D1 LG Nv2-A2-3	1.015	744241.875		1108.21	2.0038	5.0	0.00	
38	20211115-D1-LG-Nv2-A2-4	1.023	653658.563		969.59	2.0061	5.0	0.00	
39	20211115-D1-LG-Nv2-A2-5	1.023	665651.000		986.94	2.0078	5.0	0.00	
40	20211115-D1 LG Nv2-A2-6	1.023	717617.500		1061.12	2.0164	5.0	0.00	
41	20211115-D1 LG Nv2-A2-7	1.023	701705.250		1036.40	2.0178	5.0	0.00	
42	20211115-D1 LG Nv2-A2-8	1.023	733639.563		1085.83	2.0154	5.0	0.00	
43	20211115-Bk-FM-7					0.0000	0.0	0.00	
44	20211115-D1-LG-Nv3-A1-1	1.023	1095652.250		1643.24	2.0019	5.0	0.00	
45	20211115-D1-LG-Nv3-A1-2	1.023	1153121.375		1728.92	2.0038	5.0	0.00	

LC-MS/MS

CITEacuicola UPCH

Dataset: C:\MassLynx\BENZOILUREAS.PRO\20211115\_LG\_Nv1-2-3\_FINAL2.qld

Printed: Thursday, November 18, 2021 09:06:06 SA Pacific Standard Time

Compound name: Diflubenzuron

	Name	RT	Area	Std. Conc	Conc.	Divisor1	Factor1	Factor2
46	20211115-D1-LG-Nv3-A1-3	1.023	1027737.250		1537.89	2.0047	5.0	0.00
47	20211115-D1 LG Nv3-A1-4	1.023	1145940.875		1713.66	2.0089	5.0	0.00
48	20211115-D1 LG Nv3-A1-5	1.023	1180630.375		1767.95	2.0069	5.0	0.00
49	20211115-D1 LG Nv3-A1-6	1.023	1153414.000		1726.27	2.0074	5.0	0.00
50	20211115-D1 LG Nv3-A1-7	1.015	1257400.500		1875.71	2.0161	5.0	0.00
51	20211115-D1 LG Nv3-A1-8	1.015	1264088.000		1890.49	2.0111	5.0	0.00
52	20211115-Bk-FM-8				0.0000		0.0	0.00
53	20211115-D1 LG Nv3-A2-1	1.015	1259550.375		1881.10	2.0138	5.0	0.00
54	20211115-D1 LG Nv3-A2-2	1.015	1206242.125		1797.37	2.0174	5.0	0.00
55	20211115-D1-LG-Nv3-A2-3	1.023	1072556.250		1600.95	2.0109	5.0	0.00
56	20211115-D1-LG-Nv3-A2-4	1.023	1113301.250		1664.57	2.0085	5.0	0.00
57	20211115-D1 LG Nv3-A2-5	1.023	1214973.625		1825.01	2.0014	5.0	0.00
58	20211115-D1 LG Nv3-A2-6	1.023	1167672.250		1747.52	2.0078	5.0	0.00
59	20211115-D1 LG Nv3-A2-7	1.023	1143002.250		1715.19	2.0019	5.0	0.00
60	20211115-D1-LG-Nv3-A2-8	1.023	1110658.000		1667.54	2.0001	5.0	0.00

LC-MS/MS

Quantify Compound Summary Report MassLynx V4.2 SCN943 SCN979

CITEacuicola UPOCH

Dataset: C:\MassLynx\BENZOILUREAS.PRO\20211115\_LG\_Nv1-2-3\_FINAL2.qld

Printed: Thursday, November 18, 2021 09:06:06 SA Pacific Standard Time

Compound name: Teflubenzuron

Correlation coefficient:  $r = 0.999323$ ,  $r^2 = 0.998647$

Calibration curve:  $10.993 * x + -7.12136$

Response type: External Std, Area

Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

	Name	RT	Area	Std. Conc	Conc.	Divisor1	Factor1	Factor2
1	20211115-D1-LG-STD-1	1.582	98.893	10.0	9.64	1.0000	1.0	1.00
2	20211115-D1-LG-STD-2	1.582	218.179	20.0	20.49	1.0000	1.0	1.00
3	20211115-D1-LG-STD-3	1.582	568.602	50.0	52.37	1.0000	1.0	1.00
4	20211115-D1-LG-STD-4	1.582	1084.029	100.0	99.26	1.0000	1.0	1.00
5	20211115-D1-LG-STD-5	1.582	2082.768	200.0	190.11	1.0000	1.0	1.00
6	20211115-D1-LG-STD-6	1.582	4479.346	400.0	408.12	1.0000	1.0	1.00
7	20211115-Bk-FM-3					0.0000	0.0	0.00
8	20211115-D1 LG Nv1-A1-1	1.574	207.148		48.69	2.0017	5.0	0.00
9	20211115-D1 LG Nv1-A1-2	1.574	226.900		53.18	2.0016	5.0	0.00
10	20211115-D1 LG Nv1-A1-3	1.582	222.814		51.94	2.0137	5.0	0.00
11	20211115-D1 LG Nv1-A1-4	1.566	182.483		42.79	2.0156	5.0	0.00
12	20211115-D1 LG Nv1-A1-5	1.566	194.968		45.72	2.0106	5.0	0.00
13	20211115-D1-LG-Nv1-A1-6	1.582	203.232		47.53	2.0130	5.0	0.00
14	20211115-D1-LG-Nv1-A1-7	1.582	232.108		54.19	2.0081	5.0	0.00
15	20211115-D1-LG-Nv1-A1-8	1.582	176.528		41.57	2.0096	5.0	0.00
16	20211115-Bk-FM-4					0.0000	0.0	0.00
17	20211115-D1 LG Nv1-A2-1	1.574	243.779		56.85	2.0074	5.0	0.00
18	20211115-D1 LG Nv1-A2-2	1.582	181.002		42.66	2.0056	5.0	0.00
19	20211115-D1 LG Nv1-A2-3	1.582	204.129		47.91	2.0057	5.0	0.00
20	20211115-D1-LG-Nv1-A2-4	1.582	175.184		41.37	2.0041	5.0	0.00
21	20211115-D1-LG-Nv1-A2-5	1.582	225.710		52.78	2.0066	5.0	0.00
22	20211115-D1-LG-Nv1-A2-6	1.589	202.786		47.73	2.0002	5.0	0.00
23	20211115-D1 LG Nv1-A2-7	1.566	196.239		46.23	2.0008	5.0	0.00
24	20211115-D1 LG Nv1-A2-8	1.566	190.931		45.02	2.0010	5.0	0.00
25	20211115-Bk-FM-5					0.0000	0.0	0.00
26	20211115-D1 LG Nv2-A1-1	1.574	2611.019		592.86	2.0086	5.0	0.00
27	20211115-D1 LG Nv2-A1-2	1.582	2369.585		537.98	2.0094	5.0	0.00
28	20211115-D1 LG Nv2-A1-3	1.574	2472.576		563.39	2.0019	5.0	0.00
29	20211115-D1-LG-Nv2-A1-4	1.582	2037.355		464.11	2.0036	5.0	0.00
30	20211115-D1-LG-Nv2-A1-5	1.582	1900.032		432.55	2.0054	5.0	0.00
31	20211115-D1-LG-Nv2-A1-6	1.582	2145.932		488.54	2.0045	5.0	0.00
32	20211115-D1 LG Nv2-A1-7	1.566	2498.305		566.75	2.0107	5.0	0.00
33	20211115-D1 LG Nv2-A1-8	1.566	2471.771		560.94	2.0100	5.0	0.00
34	20211115-Bk-FM-6					0.0000	0.0	0.00
35	20211115-D1-LG-Nv2-A2-1	1.582	2321.702		529.16	2.0017	5.0	0.00
36	20211115-D1 LG Nv2-A2-2	1.566	2477.900		563.33	2.0064	5.0	0.00
37	20211115-D1 LG Nv2-A2-3	1.566	2455.139		558.90	2.0038	5.0	0.00
38	20211115-D1-LG-Nv2-A2-4	1.582	1818.535		413.92	2.0061	5.0	0.00
39	20211115-D1-LG-Nv2-A2-5	1.582	1914.869		435.40	2.0078	5.0	0.00
40	20211115-D1 LG Nv2-A2-6	1.574	3113.476		703.91	2.0164	5.0	0.00
41	20211115-D1 LG Nv2-A2-7	1.574	2483.558		561.43	2.0178	5.0	0.00
42	20211115-D1 LG Nv2-A2-8	1.582	2530.264		572.64	2.0154	5.0	0.00
43	20211115-Bk-FM-7					0.0000	0.0	0.00
44	20211115-D1-LG-Nv3-A1-1	1.582	2903.113		661.21	2.0019	5.0	0.00
45	20211115-D1-LG-Nv3-A1-2	1.582	2858.956		650.56	2.0038	5.0	0.00
46	20211115-D1-LG-Nv3-A1-3	1.582	2932.188		666.88	2.0047	5.0	0.00
47	20211115-D1 LG Nv3-A1-4	1.582	4432.332		1005.14	2.0089	5.0	0.00
48	20211115-D1 LG Nv3-A1-5	1.574	4372.951		992.68	2.0069	5.0	0.00
49	20211115-D1 LG Nv3-A1-6	1.574	4807.002		1090.78	2.0074	5.0	0.00

LC-MS/MS

CITEacuicola UPOCH

Dataset: C:\MassLynx\BENZOILUREAS.PRO\20211115\_LG\_Nv1-2-3\_FINAL2.qld

Printed: Thursday, November 18, 2021 09:06:06 SA Pacific Standard Time

Compound name: Teflubenzuron

	Name	RT	Area	Std. Conc	Conc.	Divisor1	Factor1	Factor2
50	20211115-D1 LG Nv3-A1-7	1.566	4378.257		989.35	2.0161	5.0	0.00
51	20211115-D1 LG Nv3-A1-8	1.566	4520.315		1023.93	2.0111	5.0	0.00
52	20211115-Bk-FM-8					0.0000	0.0	0.00
53	20211115-D1 LG Nv3-A2-1	1.566	4535.170		1025.92	2.0138	5.0	0.00
54	20211115-D1 LG Nv3-A2-2	1.566	3809.936		860.58	2.0174	5.0	0.00
55	20211115-D1-LG-Nv3-A2-3	1.582	2966.218		672.52	2.0109	5.0	0.00
56	20211115-D1-LG-Nv3-A2-4	1.582	2937.985		666.93	2.0085	5.0	0.00
57	20211115-D1 LG Nv3-A2-5	1.574	4258.146		969.32	2.0014	5.0	0.00
58	20211115-D1 LG Nv3-A2-6	1.574	4756.239		1079.06	2.0078	5.0	0.00
59	20211115-D1 LG Nv3-A2-7	1.582	4646.309		1057.27	2.0019	5.0	0.00
60	20211115-D1-LG-Nv3-A2-8	1.582	2829.167		644.99	2.0001	5.0	0.00

LC-MS/MS

**Quantify Compound Summary Report**

MassLynx V4.2 SCN943 SCN979

CITEacuicola UPOCH

Dataset: C:\MassLynx\BENZOILUREAS.PRO\20211116\_LG\_Nv1-2-3\_FINAL2.qld

Printed: Thursday, November 18, 2021 09:07:23 SA Pacific Standard Time

Method: C:\MassLynx\BENZOILUREAS.PRO\MethDB\Benzoilureas\_20211217\_LG.mdb 14 Sep 2021 10:31:50

Calibration: 18 Nov 2021 09:07:10

Compound name: Diflubenzuron

Correlation coefficient: r = 0.999607, r<sup>2</sup> = 0.999214

Calibration curve: 1643.7 \* x + 14227.1

Response type: External Std, Area

Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

	Name	RT	Area	Std. Conc	Conc.	Divisor1	Factor1	Factor2
1	20211116-D2-LG-Nv1-A1-1	1.023	180895.063		253.03	2.0037	5.0	0.00
2	20211116-D2-LG-Nv1-A1-2	1.023	180860.500		252.76	2.0054	5.0	0.00
3	20211116-D2-LG-Nv1-A1-3	1.023	184943.500		258.54	2.0086	5.0	0.00
4	20211116-D2-LG-Nv1-A1-4	1.023	174761.766		242.93	2.0102	5.0	0.00
5	20211116-D2-LG-Nv1-A1-5	1.023	174154.859		241.97	2.0105	5.0	0.00
6	20211116-D2-LG-Nv1-A1-6	1.023	200186.625		281.43	2.0100	5.0	0.00
7	20211116-D2-LG-Nv1-A1-7	1.023	169672.328		235.47	2.0081	5.0	0.00
8	20211116-D2-LG-Nv1-A1-8	1.023	184570.922		257.85	2.0096	5.0	0.00
9	20211116-Bk-FM-4				0.0000		0.0	0.00
10	20211116-D2-LG-Nv1-A2-1	1.023	185165.766		259.77	2.0017	5.0	0.00
11	20211116-D2-LG-Nv1-A2-2	1.023	194375.391		273.90	2.0007	5.0	0.00
12	20211116-D2-LG-Nv1-A2-3	1.023	190509.844		267.97	2.0011	5.0	0.00
13	20211116-D2-LG-Nv1-A2-4	1.023	186766.734		262.07	2.0027	5.0	0.00
14	20211116-D2-LG-Nv1-A2-5	1.023	187903.453		263.42	2.0056	5.0	0.00
15	20211116-D2-LG-Nv1-A2-6	1.023	186516.938		260.88	2.0089	5.0	0.00
16	20211116-D2-LG-Nv1-A2-7	1.023	173006.188		239.88	2.0135	5.0	0.00
17	20211116-D2-LG-Nv1-A2-8	1.023	196831.453		276.20	2.0111	5.0	0.00
18	20211116-Bk-FM-5	1.023	477.013			0.0000	0.0	0.00
19	20211116-D2-LG-Nv2-A1-1	1.023	738953.313		1101.23	2.0019	5.0	0.00
20	20211116-D2-LG-Nv2-A1-2	1.023	758061.563		1129.25	2.0037	5.0	0.00
21	20211116-D2-LG-Nv2-A1-3	1.023	770918.688		1145.97	2.0086	5.0	0.00
22	20211116-D2-LG-Nv2-A1-4	1.023	784978.188		1166.50	2.0099	5.0	0.00
23	20211116-D2-LG-Nv2-A1-5	1.023	750926.125		1112.97	2.0135	5.0	0.00
24	20211116-D2-LG-Nv2-A1-6	1.023	810933.625		1201.30	2.0174	5.0	0.00
25	20211116-D2-LG-Nv2-A1-7	1.023	731639.813		1080.24	2.0202	5.0	0.00
26	20211116-D2-LG-Nv2-A1-8	1.015	763155.563		1135.45	2.0064	5.0	0.00
27	20211116-Bk-FM-6	1.023	524.785			0.0000	0.0	0.00
28	20211116-D2-LG-Nv2-A2-1	1.023	796286.125		1189.42	2.0001	5.0	0.00
29	20211116-D2-LG-Nv2-A2-2	1.023	773596.000		1146.03	2.0156	5.0	0.00
30	20211116-D2-LG-Nv2-A2-3	1.023	716604.875		1060.49	2.0147	5.0	0.00
31	20211116-D2-LG-Nv2-A2-4	1.023	716710.000		1062.23	2.0117	5.0	0.00
32	20211116-D2-LG-Nv2-A2-5	1.023	736522.375		1096.55	2.0037	5.0	0.00
33	20211116-D2-LG-Nv2-A2-6	1.023	717617.500		1067.26	2.0048	5.0	0.00
34	20211116-D2-LG-Nv2-A2-7	1.023	701705.250		1042.29	2.0064	5.0	0.00
35	20211116-D2-LG-Nv2-A2-8	1.023	784536.938		1167.75	2.0066	5.0	0.00
36	20211116-Bk-FM-7	1.023	545.839			0.0000	0.0	0.00
37	20211116-D2-LG-Nv3-A1-1	1.023	1236077.000		1858.19	2.0002	5.0	0.00
38	20211116-D2-LG-Nv3-A1-2	1.023	1097408.750		1646.48	2.0012	5.0	0.00
39	20211116-D2-LG-Nv3-A1-3	1.023	1212781.125		1819.76	2.0035	5.0	0.00
40	20211116-D2-LG-Nv3-A1-4	1.023	1158676.875		1740.05	2.0007	5.0	0.00
41	20211116-D2-LG-Nv3-A1-5	1.023	1180630.375		1766.19	2.0089	5.0	0.00
42	20211116-D2-LG-Nv3-A1-6	1.023	1153414.000		1729.54	2.0036	5.0	0.00
43	20211116-D2-LG-Nv3-A1-7	1.023	1212116.125		1811.34	2.0117	5.0	0.00
44	20211116-D2-LG-Nv3-A1-8	1.023	1205975.750		1800.36	2.0136	5.0	0.00
45	20211116-Bk-FM-8	1.023	608.683			0.0000	0.0	0.00

LC-MS/MS

**Quantify Compound Summary Report**

**MassLynx V4.2 SCN943 SCN979**

CITEacuicola UPOCH

Dataset: C:\MassLynx\BENZOILUREAS.PRO\20211116\_LG\_Nv1-2-3\_FINAL2.qld

Printed: Thursday, November 18, 2021 09:07:23 SA Pacific Standard Time

**Compound name: Diflubenzuron**

	Name	RT	Area	Std. Conc	Conc.	Divisor1	Factor1	Factor2
46	20211116-D2-LG-Nv3-A2-1	1.023	1294481.250		1945.46	2.0018	5.0	0.00
47	20211116-D2-LG-Nv3-A2-2	1.023	1211348.875		1808.56	2.0135	5.0	0.00
48	20211116-D2-LG-Nv3-A2-3	1.023	1323724.500		1982.17	2.0096	5.0	0.00
49	20211116-D2-LG-Nv3-A2-4	1.023	1188833.125		1771.82	2.0166	5.0	0.00
50	20211116-D2-LG-Nv3-A2-5	1.023	1252526.250		1880.01	2.0036	5.0	0.00
51	20211116-D2-LG-Nv3-A2-6	1.023	1179468.125		1767.16	2.0058	5.0	0.00
52	20211116-D2-LG-Nv3-A2-7	1.023	1157125.625		1737.52	2.0009	5.0	0.00
53	20211116-D2-LG-Nv3-A2-8	1.023	1223647.375		1832.69	2.0074	5.0	0.00
54	20211116-Bk-FM-9	1.023	536.411			2.0056	0.0	0.00
55	20211116-D2-LG-ST-1-	1.023	174527.188	100.0	97.52	1.0000	1.0	1.00
56	20211116-D2-LG-ST-2-	1.023	352943.750	200.0	206.07	1.0000	1.0	1.00
57	20211116-D2-LG-ST-3-	1.023	514468.250	300.0	304.34	1.0000	1.0	1.00
58	20211116-D2-LG-ST-4-	1.023	665211.938	400.0	396.05	1.0000	1.0	1.00
59	20211116-D2-LG-ST-5-	1.023	979974.188	600.0	587.54	1.0000	1.0	1.00
60	20211116-D2-LG-ST-6-	1.023	1343123.750	800.0	808.48	1.0000	1.0	1.00

LC-MS/MS

Quantify Compound Summary Report MassLynx V4.2 SCN943 SCN979

CITEacuicola UPOCH

Dataset: C:\MassLynx\BENZOILUREAS.PRO\20211116\_LG\_Nv1-2-3\_FINAL2.qld

Printed: Thursday, November 18, 2021 09:07:23 SA Pacific Standard Time

Compound name: Teflubenzuron

Correlation coefficient:  $r = 0.999323$ ,  $r^2 = 0.998647$

Calibration curve:  $10.993 * x + -7.12136$

Response type: External Std, Area

Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

	Name	RT	Area	Std. Conc	Conc.	Divisor1	Factor1	Factor2
1	20211116-D2-LG-Nv1-A1-1	1.574	207.148		48.64	2.0037	5.0	0.00
2	20211116-D2-LG-Nv1-A1-2	1.574	240.291		56.11	2.0054	5.0	0.00
3	20211116-D2-LG-Nv1-A1-3	1.582	229.320		53.54	2.0086	5.0	0.00
4	20211116-D2-LG-Nv1-A1-4	1.582	240.276		55.98	2.0102	5.0	0.00
5	20211116-D2-LG-Nv1-A1-5	1.574	233.603		54.46	2.0105	5.0	0.00
6	20211116-D2-LG-Nv1-A1-6	1.574	256.529		59.66	2.0100	5.0	0.00
7	20211116-D2-LG-Nv1-A1-7	1.582	193.266		45.39	2.0081	5.0	0.00
8	20211116-D2-LG-Nv1-A1-8	1.582	178.861		42.09	2.0096	5.0	0.00
9	20211116-Bk-FM-4				0.0000		0.0	0.00
10	20211116-D2-LG-Nv1-A2-1	1.574	252.287		58.94	2.0017	5.0	0.00
11	20211116-D2-LG-Nv1-A2-2	1.582	181.002		42.77	2.0007	5.0	0.00
12	20211116-D2-LG-Nv1-A2-3	1.582	204.129		48.02	2.0011	5.0	0.00
13	20211116-D2-LG-Nv1-A2-4	1.574	241.783		56.53	2.0027	5.0	0.00
14	20211116-D2-LG-Nv1-A2-5	1.574	225.348		52.72	2.0056	5.0	0.00
15	20211116-D2-LG-Nv1-A2-6	1.574	256.152		59.61	2.0089	5.0	0.00
16	20211116-D2-LG-Nv1-A2-7	1.582	224.784		52.39	2.0135	5.0	0.00
17	20211116-D2-LG-Nv1-A2-8	1.574	172.442		40.61	2.0111	5.0	0.00
18	20211116-Bk-FM-5				0.0000		0.0	0.00
19	20211116-D2-LG-Nv2-A1-1	1.574	2446.903		557.56	2.0019	5.0	0.00
20	20211116-D2-LG-Nv2-A1-2	1.582	2428.410		552.86	2.0037	5.0	0.00
21	20211116-D2-LG-Nv2-A1-3	1.574	2472.576		561.51	2.0086	5.0	0.00
22	20211116-D2-LG-Nv2-A1-4	1.574	2555.619		579.94	2.0099	5.0	0.00
23	20211116-D2-LG-Nv2-A1-5	1.574	2555.264		578.82	2.0135	5.0	0.00
24	20211116-D2-LG-Nv2-A1-6	1.582	3005.602		679.24	2.0174	5.0	0.00
25	20211116-D2-LG-Nv2-A1-7	1.574	2278.303		514.55	2.0202	5.0	0.00
26	20211116-D2-LG-Nv2-A1-8	1.574	2303.529		523.81	2.0064	5.0	0.00
27	20211116-Bk-FM-6				0.0000		0.0	0.00
28	20211116-D2-LG-Nv2-A2-1	1.582	2800.887		638.56	2.0001	5.0	0.00
29	20211116-D2-LG-Nv2-A2-2	1.574	2889.188		653.57	2.0156	5.0	0.00
30	20211116-D2-LG-Nv2-A2-3	1.582	2703.054		611.84	2.0147	5.0	0.00
31	20211116-D2-LG-Nv2-A2-4	1.574	2563.358		581.17	2.0117	5.0	0.00
32	20211116-D2-LG-Nv2-A2-5	1.574	2749.000		625.63	2.0037	5.0	0.00
33	20211116-D2-LG-Nv2-A2-6	1.574	2921.919		664.52	2.0048	5.0	0.00
34	20211116-D2-LG-Nv2-A2-7	1.574	2483.558		564.62	2.0064	5.0	0.00
35	20211116-D2-LG-Nv2-A2-8	1.582	2500.618		568.43	2.0066	5.0	0.00
36	20211116-Bk-FM-7				0.0000		0.0	0.00
37	20211116-D2-LG-Nv3-A1-1	1.574	4302.412		979.96	2.0002	5.0	0.00
38	20211116-D2-LG-Nv3-A1-2	1.582	4397.419		1001.07	2.0012	5.0	0.00
39	20211116-D2-LG-Nv3-A1-3	1.574	4613.752		1049.03	2.0035	5.0	0.00
40	20211116-D2-LG-Nv3-A1-4	1.582	4427.164		1008.08	2.0007	5.0	0.00
41	20211116-D2-LG-Nv3-A1-5	1.574	4098.376		929.52	2.0089	5.0	0.00
42	20211116-D2-LG-Nv3-A1-6	1.574	4807.002		1092.85	2.0036	5.0	0.00
43	20211116-D2-LG-Nv3-A1-7	1.574	4431.572		1003.56	2.0117	5.0	0.00
44	20211116-D2-LG-Nv3-A1-8	1.574	4247.748		961.10	2.0136	5.0	0.00
45	20211116-Bk-FM-8				0.0000		0.0	0.00
46	20211116-D2-LG-Nv3-A2-1	1.574	4649.225		1057.98	2.0018	5.0	0.00
47	20211116-D2-LG-Nv3-A2-2	1.574	4525.437		1023.87	2.0135	5.0	0.00
48	20211116-D2-LG-Nv3-A2-3	1.574	4537.815		1028.66	2.0096	5.0	0.00
49	20211116-D2-LG-Nv3-A2-4	1.574	4382.988		990.17	2.0166	5.0	0.00

LC-MS/MS

CITEacuicola UPCH

Dataset: C:\MassLynx\BENZOILUREAS.PRO\20211116\_LG\_Nv1-2-3\_FINAL2.qld

Printed: Thursday, November 18, 2021 09:07:23 SA Pacific Standard Time

Compound name: Teflubenzuron

	Name	RT	Area	Std. Conc	Conc.	Divisor1	Factor1	Factor2
50	20211116-D2-LG-Nv3-A2-5	1.574	4196.617		954.29	2.0036	5.0	0.00
51	20211116-D2-LG-Nv3-A2-6	1.574	5337.708		1211.99	2.0058	5.0	0.00
52	20211116-D2-LG-Nv3-A2-7	1.582	4562.732		1038.80	2.0009	5.0	0.00
53	20211116-D2-LG-Nv3-A2-8	1.574	5587.948		1267.73	2.0074	5.0	0.00
54	20211116-Bk-FM-9					2.0056	0.0	0.00
55	20211116-D2-LG-ST-1-	1.582	98.893	10.0	9.64	1.0000	1.0	1.00
56	20211116-D2-LG-ST-2-	1.582	218.179	20.0	20.49	1.0000	1.0	1.00
57	20211116-D2-LG-ST-3-	1.582	568.602	50.0	52.37	1.0000	1.0	1.00
58	20211116-D2-LG-ST-4-	1.582	1084.029	100.0	99.26	1.0000	1.0	1.00
59	20211116-D2-LG-ST-5-	1.582	2082.768	200.0	190.11	1.0000	1.0	1.00
60	20211116-D2-LG-ST-6-	1.582	4479.346	400.0	408.12	1.0000	1.0	1.00

LC-MS/MS

Quantify Compound Summary Report MassLynx V4.2 SCN943 SCN979

CITEacucicola UPCH

Dataset: C:\MassLynx\BENZOILUREAS.PRO\20211117\_LG\_Nv1-2-3\_FINAL2.qld

Printed: Thursday, November 18, 2021 09:08:56 SA Pacific Standard Time

Method: C:\MassLynx\BENZOILUREAS.PRO\MethDB\Benzoilureas\_20211217\_LG.mdb 14 Sep 2021 10:44:06

Calibration: 18 Nov 2021 09:08:37

Compound name: Diflubenzuron

Correlation coefficient:  $r = 0.998814$ ,  $r^2 = 0.997630$

Calibration curve:  $1722.73 * x + 22046.1$

Response type: External Std, Area

Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

	Name	RT	Area	Std. Conc	Conc.	Divisor1	Factor1	Factor2
1	20211117-D3-LG-STD-1	1.015	185426.781	100.0	94.84	1.0000	1.0	1.00
2	20211117-D3-LG-STD-2	1.015	381069.688	200.0	208.40	1.0000	1.0	1.00
3	20211117-D3-LG-STD-3	1.015	540830.000	300.0	301.14	1.0000	1.0	1.00
4	20211117-D3-LG-STD-4	1.015	739303.938	400.0	416.35	1.0000	1.0	1.00
5	20211117-D3-LG-STD-5	1.015	1017785.063	600.0	578.00	1.0000	1.0	1.00
6	20211117-D3-LG-STD-6	1.015	1402407.500	800.0	801.27	1.0000	1.0	1.00
7	20211117-Bk-FM-3	1.015	691.460			0.0000	0.0	0.00
8	20211117-D3-LG-Nv1-A1-1	1.015	184757.875		235.02	2.0094	5.0	0.00
9	20211117-D3-LG-Nv1-A1-2	1.015	185317.203		235.37	2.0133	5.0	0.00
10	20211117-D3-LG-Nv1-A1-3	1.023	195007.484		250.07	2.0074	5.0	0.00
11	20211117-D3-LG-Nv1-A1-4	1.015	184189.922		235.17	2.0011	5.0	0.00
12	20211117-D3-LG-Nv1-A1-5	1.015	184839.172		234.26	2.0169	5.0	0.00
13	20211117-D3-LG-Nv1-A1-6	1.015	185498.984		236.82	2.0032	5.0	0.00
14	20211117-D3-LG-Nv1-A1-7	1.015	212335.453		274.87	2.0093	5.0	0.00
15	20211117-D3-LG-Nv1-A1-8	1.015	179469.422		228.30	2.0013	5.0	0.00
16	20211117-Bk-FM-4	1.023	613.473			0.0000	0.0	0.00
17	20211117-D3-LG-Nv1-A2-1	1.015	210175.875		272.77	2.0018	5.0	0.00
18	20211117-D3-LG-Nv1-A2-2	1.015	195718.859		250.72	2.0105	5.0	0.00
19	20211117-D3-LG-Nv1-A2-3	1.015	186482.266		237.05	2.0133	5.0	0.00
20	20211117-D3-LG-Nv1-A2-4	1.015	199434.672		256.22	2.0094	5.0	0.00
21	20211117-D3-LG-Nv1-A2-5	1.015	201336.391		259.73	2.0035	5.0	0.00
22	20211117-D3-LG-Nv1-A2-6	1.015	183113.438		233.09	2.0056	5.0	0.00
23	20211117-D3-LG-Nv1-A2-7	1.015	202532.531		260.79	2.0087	5.0	0.00
24	20211117-D3-LG-Nv1-A2-8	1.015	182966.188		233.51	2.0001	5.0	0.00
25	20211117-Bk-FM-5	1.023	582.824			0.0000	0.0	0.00
26	20211117-D3-LG-Nv2-A1-1	1.015	798597.375		1123.33	2.0064	5.0	0.00
27	20211117-D3-LG-Nv2-A1-2	1.015	743682.125		1041.81	2.0104	5.0	0.00
28	20211117-D3-LG-Nv2-A1-3	1.015	762188.625		1068.74	2.0100	5.0	0.00
29	20211117-D3-LG-Nv2-A1-4	1.015	751687.750		1048.31	2.0201	5.0	0.00
30	20211117-D3-LG-Nv2-A1-5	1.015	759643.125		1068.47	2.0036	5.0	0.00
31	20211117-D3-LG-Nv2-A1-6	1.015	826408.375		1162.98	2.0074	5.0	0.00
32	20211117-D3-LG-Nv2-A1-7	1.015	773397.125		1089.91	2.0008	5.0	0.00
33	20211117-D3-LG-Nv2-A1-8	1.015	724942.500		1019.02	2.0020	5.0	0.00
34	20211117-Bk-FM-6	1.023	562.648			0.0000	0.0	0.00
35	20211117-D3-LG-Nv2-A2-1	1.015	775408.313		1091.14	2.0039	5.0	0.00
36	20211117-D3-LG-Nv2-A2-2	1.015	797656.688		1122.92	2.0047	5.0	0.00
37	20211117-D3-LG-Nv2-A2-3	1.015	788953.938		1108.44	2.0081	5.0	0.00
38	20211117-D3-LG-Nv2-A2-4	1.015	728974.875		1025.01	2.0017	5.0	0.00
39	20211117-D3-LG-Nv2-A2-5	1.015	713161.500		990.02	2.0261	5.0	0.00
40	20211117-D3-LG-Nv2-A2-6	1.015	733147.438		1026.55	2.0105	5.0	0.00
41	20211117-D3-LG-Nv2-A2-7	1.015	795601.375		1116.93	2.0101	5.0	0.00
42	20211117-D3-LG-Nv2-A2-8	1.015	721186.188		1014.08	2.0010	5.0	0.00
43	20211117-Bk-FM-7	1.015	564.180			0.0000	0.0	0.00
44	20211117-D3-LG-Nv3-A1-1	1.015	1186250.125		1684.84	2.0055	5.0	0.00
45	20211117-D3-LG-Nv3-A1-2	1.015	1202142.250		1708.61	2.0046	5.0	0.00

LC-MS/MS

CITEacuicola UPCH

Dataset: C:\MassLynx\BENZOILUREAS.PRO\20211117\_LG\_Nv1-2-3\_FINAL2.qld

Printed: Thursday, November 18, 2021 09:08:56 SA Pacific Standard Time

Compound name: Diflubenzuron

	Name	RT	Area	Std. Conc	Conc.	Divisor1	Factor1	Factor2
46	20211117-D3-LG-Nv3-A1-3	1.015	1288538.000		1831.14	2.0074	5.0	0.00
47	20211117-D3-LG-Nv3-A1-4	1.015	1262199.125		1796.37	2.0037	5.0	0.00
48	20211117-D3-LG-Nv3-A1-5	1.015	1117538.375		1588.33	2.0018	5.0	0.00
49	20211117-D3-LG-Nv3-A1-6	1.015	1217867.000		1727.07	2.0096	5.0	0.00
50	20211117-D3-LG-Nv3-A1-7	1.015	1257400.500		1783.81	2.0100	5.0	0.00
51	20211117-D3-LG-Nv3-A1-8	1.015	1264088.000		1794.90	2.0084	5.0	0.00
52	20211117-Bk-FM-8	1.023	653.597			0.0000	0.0	0.00
53	20211117-D3-LG-Nv3-A2-1	1.015	1279063.875		1822.62	2.0017	5.0	0.00
54	20211117-D3-LG-Nv3-A2-2	1.015	1219914.500		1734.95	2.0039	5.0	0.00
55	20211117-D3-LG-Nv3-A2-3	1.015	1258676.500		1790.55	2.0045	5.0	0.00
56	20211117-D3-LG-Nv3-A2-4	1.015	1261152.125		1789.76	2.0094	5.0	0.00
57	20211117-D3-LG-Nv3-A2-5	1.015	1166429.125		1654.43	2.0076	5.0	0.00
58	20211117-D3-LG-Nv3-A2-6	1.015	1161417.625		1642.27	2.0136	5.0	0.00
59	20211117-D3-LG-Nv3-A2-7	1.015	1209691.000		1714.32	2.0107	5.0	0.00
60	20211117-D3-LG-Nv3-A2-8	1.015	1305174.625		1851.23	2.0117	5.0	0.00

LC-MS/MS

Quantify Compound Summary Report MassLynx V4.2 SCN943 SCN979

CITEacuicola UPOCH

Dataset: C:\MassLynx\BENZOILUREAS.PRO\20211117\_LG\_Nv1-2-3\_FINAL2.qld

Printed: Thursday, November 18, 2021 09:08:56 SA Pacific Standard Time

Compound name: Teflubenzuron

Correlation coefficient:  $r = 0.995542$ ,  $r^2 = 0.991103$

Calibration curve:  $10.1448 * x + 4.82775$

Response type: External Std, Area

Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

	Name	RT	Area	Std. Conc	Conc.	Divisor1	Factor1	Factor2
1	20211117-D3-LG-STD-1	1.566	98.630	10.0	9.25	1.0000	1.0	1.00
2	20211117-D3-LG-STD-2	1.574	211.010	20.0	20.32	1.0000	1.0	1.00
3	20211117-D3-LG-STD-3	1.566	543.660	50.0	53.11	1.0000	1.0	1.00
4	20211117-D3-LG-STD-4	1.566	936.930	100.0	91.88	1.0000	1.0	1.00
5	20211117-D3-LG-STD-5	1.566	2295.453	200.0	225.79	1.0000	1.0	1.00
6	20211117-D3-LG-STD-6	1.566	3856.195	400.0	379.64	1.0000	1.0	1.00
7	20211117-Bk-FM-3					0.0000	0.0	0.00
8	20211117-D3-LG-Nv1-A1-1	1.566	190.391		45.51	2.0094	5.0	0.00
9	20211117-D3-LG-Nv1-A1-2	1.566	238.520		57.21	2.0133	5.0	0.00
10	20211117-D3-LG-Nv1-A1-3	1.566	204.535		49.03	2.0074	5.0	0.00
11	20211117-D3-LG-Nv1-A1-4	1.566	177.394		42.50	2.0011	5.0	0.00
12	20211117-D3-LG-Nv1-A1-5	1.566	192.101		45.76	2.0169	5.0	0.00
13	20211117-D3-LG-Nv1-A1-6	1.566	213.375		51.31	2.0032	5.0	0.00
14	20211117-D3-LG-Nv1-A1-7	1.566	195.347		46.73	2.0093	5.0	0.00
15	20211117-D3-LG-Nv1-A1-8	1.566	238.460		57.54	2.0013	5.0	0.00
16	20211117-Bk-FM-4	1.589	2.201			0.0000	0.0	0.00
17	20211117-D3-LG-Nv1-A2-1	1.566	227.624		54.85	2.0018	5.0	0.00
18	20211117-D3-LG-Nv1-A2-2	1.566	227.863		54.68	2.0105	5.0	0.00
19	20211117-D3-LG-Nv1-A2-3	1.566	196.851		47.01	2.0133	5.0	0.00
20	20211117-D3-LG-Nv1-A2-4	1.566	197.515		47.26	2.0094	5.0	0.00
21	20211117-D3-LG-Nv1-A2-5	1.566	232.816		56.09	2.0035	5.0	0.00
22	20211117-D3-LG-Nv1-A2-6	1.566	211.956		50.90	2.0056	5.0	0.00
23	20211117-D3-LG-Nv1-A2-7	1.566	196.239		46.97	2.0087	5.0	0.00
24	20211117-D3-LG-Nv1-A2-8	1.566	190.931		45.86	2.0001	5.0	0.00
25	20211117-Bk-FM-5	1.543	2.164			0.0000	0.0	0.00
26	20211117-D3-LG-Nv2-A1-1	1.566	2715.462		665.86	2.0064	5.0	0.00
27	20211117-D3-LG-Nv2-A1-2	1.566	2583.997		632.30	2.0104	5.0	0.00
28	20211117-D3-LG-Nv2-A1-3	1.566	2363.420		578.34	2.0100	5.0	0.00
29	20211117-D3-LG-Nv2-A1-4	1.566	2355.103		573.42	2.0201	5.0	0.00
30	20211117-D3-LG-Nv2-A1-5	1.566	2427.393		595.93	2.0036	5.0	0.00
31	20211117-D3-LG-Nv2-A1-6	1.566	2744.151		672.57	2.0074	5.0	0.00
32	20211117-D3-LG-Nv2-A1-7	1.566	2470.251		607.32	2.0008	5.0	0.00
33	20211117-D3-LG-Nv2-A1-8	1.566	2471.771		607.33	2.0020	5.0	0.00
34	20211117-Bk-FM-6					0.0000	0.0	0.00
35	20211117-D3-LG-Nv2-A2-1	1.566	2649.166		650.38	2.0039	5.0	0.00
36	20211117-D3-LG-Nv2-A2-2	1.566	2477.900		608.02	2.0047	5.0	0.00
37	20211117-D3-LG-Nv2-A2-3	1.566	2455.139		601.40	2.0081	5.0	0.00
38	20211117-D3-LG-Nv2-A2-4	1.566	2524.041		620.29	2.0017	5.0	0.00
39	20211117-D3-LG-Nv2-A2-5	1.566	2631.375		638.93	2.0261	5.0	0.00
40	20211117-D3-LG-Nv2-A2-6	1.566	2441.791		597.41	2.0105	5.0	0.00
41	20211117-D3-LG-Nv2-A2-7	1.566	2509.619		614.16	2.0101	5.0	0.00
42	20211117-D3-LG-Nv2-A2-8	1.566	2670.223		656.51	2.0010	5.0	0.00
43	20211117-Bk-FM-7	1.597	2.688			0.0000	0.0	0.00
44	20211117-D3-LG-Nv3-A1-1	1.566	4141.508		1016.62	2.0055	5.0	0.00
45	20211117-D3-LG-Nv3-A1-2	1.566	3879.985		952.77	2.0046	5.0	0.00
46	20211117-D3-LG-Nv3-A1-3	1.566	3390.769		831.33	2.0074	5.0	0.00
47	20211117-D3-LG-Nv3-A1-4	1.566	4144.369		1018.23	2.0037	5.0	0.00
48	20211117-D3-LG-Nv3-A1-5	1.566	3994.728		982.36	2.0018	5.0	0.00
49	20211117-D3-LG-Nv3-A1-6	1.566	4196.404		1028.01	2.0096	5.0	0.00

LC-MS/MS

CITEacuicola UPCH

Dataset: C:\MassLynx\BENZOILUREAS.PRO\20211117\_LG\_Nv1-2-3\_FINAL2.qld

Printed: Thursday, November 18, 2021 09:08:56 SA Pacific Standard Time

Compound name: Teflubenzuron

	Name	RT	Area	Std. Conc	Conc.	Divisor1	Factor1	Factor2
50	20211117-D3-LG-Nv3-A1-7	1.566	4378.257		1072.39	2.0100	5.0	0.00
51	20211117-D3-LG-Nv3-A1-8	1.566	4520.315		1108.11	2.0084	5.0	0.00
52	20211117-Bk-FM-8					0.0000	0.0	0.00
53	20211117-D3-LG-Nv3-A2-1	1.566	4535.170		1115.48	2.0017	5.0	0.00
54	20211117-D3-LG-Nv3-A2-2	1.566	3786.165		930.03	2.0039	5.0	0.00
55	20211117-D3-LG-Nv3-A2-3	1.566	4162.352		1022.25	2.0045	5.0	0.00
56	20211117-D3-LG-Nv3-A2-4	1.566	4103.661		1005.36	2.0094	5.0	0.00
57	20211117-D3-LG-Nv3-A2-5	1.566	4436.638		1088.01	2.0076	5.0	0.00
58	20211117-D3-LG-Nv3-A2-6	1.566	4503.920		1101.23	2.0136	5.0	0.00
59	20211117-D3-LG-Nv3-A2-7	1.566	4349.574		1064.99	2.0107	5.0	0.00
60	20211117-D3-LG-Nv3-A2-8	1.566	4093.060		1001.61	2.0117	5.0	0.00

LC-MS/MS

## d) Robustez

- Para trucha arcoiris

Quantify Overview Report				MassLynx V4.2 SCN943 SCN979	Page 1 of 1
CITEacuicola UPCH					
Dataset: C:\MassLynx\BENZOILUREAS.PRO\20211116_Robustez_E1_E4_E5_CC2.qld					
Printed: Wednesday, November 17, 2021 08:55:00 SA Pacific Standard Time					
<b>Method: C:\MassLynx\BENZOILUREAS.PRO\MethDB\Benzoilureas_20211110.mdb 17 Nov 2021 08:43:43</b>					
<b>Calibration: 17 Nov 2021 08:49:39</b>					
	Diflubenzuron	Teflubenzuron	Emamectin Benzoate		
NF1-BNZ-Ensayo 1-1	106.40	127.80	19.78		
NF1-BNZ-Ensayo 1-2	100.99	112.40	18.10		
NF1-BNZ-Ensayo 1-3	97.03	114.15	18.07		
20211116-BK-FM -4					
NF1-BNZ-Ensayo 4-1	105.44	123.04	19.93		
NF1-BNZ-Ensayo 4-2	101.35	113.06	18.61		
NF1-BNZ-Ensayo 4-3	100.50	114.59	18.44		
20211116-BK-FM -5					
NF1-BNZ-Ensayo 5-1	105.19	122.74	18.95		
NF1-BNZ-Ensayo 5-2	101.69	120.32	18.53		
NF1-BNZ-Ensayo 5-3	102.81	118.46	18.53		
20211116-BK-FM -6					

Quantify Overview Report				MassLynx V4.2 SCN943 SCN979	Page 1 of 1
CITEacuicola UPCH					
Dataset: C:\MassLynx\BENZOILUREAS.PRO\20211118_Robustez_E1_E2_E3_E6_CC2.qld					
Printed: Friday, November 19, 2021 08:39:34 SA Pacific Standard Time					
<b>Method: C:\MassLynx\BENZOILUREAS.PRO\MethDB\Benzoilureas_20211118_HSST3.mdb 18 Nov 2021 16:55:17</b>					
<b>Calibration: 18 Nov 2021 17:00:17</b>					
	Diflubenzuron	Teflubenzuron	Emamectin Benzoate		
NF1-BNZ- Ensayo 1-1	117.276	150.693	19.356		
NF1-BNZ- Ensayo 1-2	95.159	140.236	18.469		
NF1-BNZ- Ensayo 1-3	95.160	129.354	18.302		
NF1-BNZ- Ensayo 1-4	102.434	125.934	17.712		
20211118 -BK-FM -4					
NF1-BNZ- Ensayo 2-1	110.587	127.210	19.820		
NF1-BNZ- Ensayo 2-2	99.400	142.348	18.973		
NF1-BNZ- Ensayo 2-3	102.225	119.530	19.207		
NF1-BNZ- Ensayo 2-4	100.640	113.475	17.964		
20211118 -BK-FM -5					
NF1-BNZ- Ensayo 3-1	123.209	127.840	18.934		
NF1-BNZ- Ensayo 3-2	104.295	145.668	19.034		
NF1-BNZ- Ensayo 3-3	107.339	121.334	18.909		
NF1-BNZ- Ensayo 3-4	110.275	127.075	18.051		
20211118 -BK-FM -6					
NF1-BNZ- Ensayo 6-1	113.198	121.936	18.957		
NF1-BNZ- Ensayo 6-2	102.805	141.233	18.860		
NF1-BNZ- Ensayo 6-3	98.215	126.189	18.337		
NF1-BNZ- Ensayo 6-4	101.639	120.143	18.517		
20211118 -BK-FM -7					

- Para Langostino

Quantify Overview Report MassLynx V4.2 SCN943 SCN979 <span style="float: right;">Page 1 of 1</span>			
CITEacuicola UPCH			
Dataset: C:\MassLynx\BENZOILUREAS.PRO\ROBUSTES_C18_LG.qld			
Printed: Friday, November 19, 2021 08:55:16 SA Pacific Standard Time			
Method: C:\MassLynx\BENZOILUREAS.PRO\MethDB\Benzoilureas_20211217_LG.mdb 18 Nov 2021 10:55:17			
Calibration: 18 Nov 2021 10:57:53			
	Diflubenzuron	Teflubenzuron	Emamectin Benzoate
NF2-BNZ-LG-Ensayo1-BK			
NF2-BNZ-LG-Ensayo 1 - 1	1146.778	523.060	124.721
NF2-BNZ-LG-Ensayo 1 - 2	1088.372	501.855	140.704
NF2-BNZ-LG-Ensayo 1 - 3	1082.093	536.401	128.270
NF2-BNZ-LG-Ensayo 1 - 4	1055.317	542.244	134.469
20211117 -BNZ-Bk-FM-3			
NF2-BNZ-LG-Ensayo4-BK			
NF2-BNZ-LG-Ensayo 4 - 1	1089.340	511.640	123.175
NF2-BNZ-LG-Ensayo 4 - 2	1112.016	512.301	119.703
NF2-BNZ-LG-Ensayo 4 - 3	1078.481	489.816	119.564
NF2-BNZ-LG-Ensayo 4 - 4	1088.928	451.195	117.903
20211117 -BNZ-Bk-FM-4			
NF2-BNZ-LG-Ensayo5-BK			
NF2-BNZ-LG-Ensayo 5 - 1	961.680	472.199	109.685
NF2-BNZ-LG-Ensayo 5 - 2	997.628	479.527	119.006
NF2-BNZ-LG-Ensayo 5 - 3	1017.341	526.771	114.644
NF2-BNZ-LG-Ensayo 5 - 4	1099.766	470.186	112.390
20211117 -BNZ-Bk-FM-5			

Quantify Overview Report MassLynx V4.2 SCN943 SCN979 <span style="float: right;">Page 1 of 1</span>			
CITEacuicola UPCH			
Dataset: C:\MassLynx\BENZOILUREAS.PRO\ROBUSTES_HSST3_LG.qld			
Printed: Friday, November 19, 2021 08:56:39 SA Pacific Standard Time			
Method: C:\MassLynx\BENZOILUREAS.PRO\MethDB\Benzoilureas_20211118_HSST3-.mdb 19 Nov 2021 10:02:23			
Calibration: 19 Nov 2021 10:02:23			
	Diflubenzuron	Teflubenzuron	Emamectin Benzoate
NF2-BNZ-LG-Ensayo 2 - 1--	1119.329	545.657	139.587
NF2-BNZ-LG-Ensayo 2 - 2	1001.506	273.167	75.320
NF2-BNZ-LG-Ensayo 2 - 3	1038.285	458.461	111.384
NF2-BNZ-LG-Ensayo 2 - 4	1090.687	532.532	139.129
20211118 -BNZ-Bk-FM-3			
NF2-BNZ-LG-Ensayo3-BK			
NF2-BNZ-LG-Ensayo 3 - 1	954.631	204.996	93.465
NF2-BNZ-LG-Ensayo 3 - 2	1046.778	426.236	113.083
NF2-BNZ-LG-Ensayo 3 - 3	1149.960	562.359	142.359
NF2-BNZ-LG-Ensayo 3 - 4	1124.610	612.578	160.277
20211118 -BNZ-Bk-FM-4			
NF2-BNZ-LG-Ensayo6-BK			
NF2 BNZ-LG-Ensayo 6 - 1--	1121.399	555.424	139.845
NF2 BNZ-LG-Ensayo 6 - 2	1071.209	566.287	139.762
NF2-BNZ-LG-Ensayo 6 - 3	1052.691	383.793	108.006
NF2-BNZ-LG-Ensayo 6 - 4	1015.530	428.644	105.834
20211118 -BNZ-Bk-FM-5--			