



INFORME FINAL

Evaluación de la capacidad de mitílidos de bioacumular productos químicos y farmacéuticos de uso en la acuicultura

SUBPESCA / Junio 2015



INFORME FINAL

Evaluación de la capacidad de mitílicos de bioacumular productos químicos y farmacéuticos de uso en la acuicultura

SUBSECRETARÍA DE PESCA Y ACUICULTURA / Junio 2015

REQUIRENTE

SUBSECRETARÍA DE PESCA Y ACUICULTURA

Subsecretario de Pesca y Acuicultura
Raúl Súnico Galdames

EJECUTOR

INSTITUTO DE FOMENTO PESQUERO, IFOP

Director Ejecutivo
Leonardo Núñez Montaner

Jefe División Investigación en Acuicultura
F. Leonardo Guzmán Méndez

JEFE DE PROYECTO

Luis Norambuena Subiabre

AUTOR

Luis Norambuena Subiabre



RESUMEN EJECUTIVO

El presente documento constituye el Informe Final del proyecto “Evaluación de la capacidad de mitílicos de bioacumular productos químicos y farmacéuticos de uso en acuicultura”, ejecutado por el Instituto de Fomento Pesquero, a través de su Departamento de Salud Hidrobiológica, perteneciente a la División de Investigación en Acuicultura.

El presente proyecto de investigación tuvo por objetivo determinar la capacidad potencial de mitílicos de bioacumular en tejidos, productos farmacológicos de uso en la salmonicultura, específicamente antiparasitarios (Cipermetrina, Deltametrina, Azametifos y Diflubenzurón), la eventual generación de residuos en los mitílicos, como producto final de consumo humano y finalmente, el potencial impacto de estos tratamientos, sobre la industria mitilicultora.

La metodología inicialmente consideró establecer y validar metodologías analíticas para la detección y cuantificación de los analitos anteriormente señalados, en matriz de carne de chorito (*M. chilensis*).

Posteriormente, se realizaron estudios para determinar las curvas de depleción en choritos, de los antiparasitarios mencionados, bajo condiciones controladas, utilizando las metodologías analíticas desarrolladas y validadas previamente. Estas curvas de depleción se realizaron utilizando concentraciones extremas de concentración de antiparasitarios (sobre las dosis terapéuticas utilizadas en el tratamiento de salmónidos). De esta forma se evaluó la capacidad de los mitílicos de bioacumular los analitos en cuestión, y la cinética de eliminación de éstos. Para los casos de Cipermetrina, Deltametrina y Azametifos, no hubo detecciones positivas para las muestras analizadas. En el caso de Diflubenzurón, pese a que fue posible detectar el analito, el nivel alcanzado por éste en el primer día post tratamiento, fue inferior al Límite Máximo Residual (LMR) establecido para carne de salmónes. Se realizó la respectiva curva de depleción de Diflubenzurón en choritos. En forma complementaria se realizó un nuevo experimento para determinar la bioacumulación de Diflubenzurón y repetir la generación de la respectiva curva de depleción.

Si bien en los ensayos bajo condiciones controladas para Azametifos y Deltametrina, no fue posible detectar el analito en cuestión, se realizaron de igual forma, muestreos de mitílicos en condiciones de campo, en un centro de cultivo de mejillones, cercano a un centro de cultivos de salmónes, al que le fue realizado un tratamiento de baños con los antiparasitarios anteriormente señalados. En todas las muestras obtenidas antes, durante y después de finalizados los tratamientos, no fue posible detectar los analitos en cuestión.

Finalmente, se realizó una evaluación del impacto social y económico de la detección de residuos de productos terapéuticos en la industria mitilicultora.



INSTITUTO DE FOMENTO PESQUERO / DIVISIÓN INVESTIGACIÓN EN ACUICULTURA



ÍNDICE GENERAL

	Página
RESUMEN EJECUTIVO	i
ÍNDICE GENERAL	iii
ÍNDICE DE ANEXOS	vi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVO GENERAL	3
3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
4. METODOLOGÍA	4
4.1 Identificación de productos terapéuticos a evaluar	4
4.2 Revisión de literatura nacional e internacional, respecto de la posible bioacumulación de productos terapéuticos de uso en acuicultura	4
4.3 Identificación y descripción de técnicas analíticas de detección de productos terapéuticos seleccionados.....	5
4.4 Desarrollo y validación de técnicas analíticas para la detección y cuantificación de productos terapéuticos seleccionados en matrices biológicas de mitílidos	5
4.4.1 Obtención de muestras para el desarrollo de las técnicas	5
4.4.2 Preparación de la muestra.....	5
4.4.3 Determinación y cuantificación del analito	6
4.4.4 Modificaciones/confirmación de protocolos	6
4.4.5 Validación de las metodologías propuestas.....	6
4.5 Evaluación de riesgo de exposición y de detección de residuos de los productos terapéuticos seleccionados en el producto final de mitilicultura	9
4.6 Desarrollo de estudios de bioacumulación, depleción, excreción y metabolización de los productos seleccionados bajo condiciones controladas en mitílidos	10
4.7 Evaluación de estudios de bioacumulación, depleción, excreción y metabolización de los productos terapéuticos seleccionados bajo condiciones controladas.....	12
4.8 Desarrollo y ejecución de un plan de muestreo y encuesta epidemiológica que considere obtención de muestras desde centros de producción de mitílidos y bancos naturales conocidos, zonas blanco (alejada de centros de producción de salmones) y zonas cercanas a producción de salmones	13
4.9 Análisis de las muestras obtenidas mediante las técnicas de laboratorio validadas	15



4.10	Descripción de la industria miticultora.....	15
4.11	Análisis estratégico.....	16
4.12	Cuantificación Económica Social.....	17
5.	RESULTADOS.....	21
5.1	Identificación de productos terapéuticos a evaluar.....	21
5.1.1	Lista de productos antiparasitarios para control de caligidosis en salmónidos, con registro del SAG.....	21
5.1.2	Antecedentes respecto del uso de antiparasitarios en la industria.....	22
5.1.3	Lista de productos químicos y farmacéuticos con su respectiva caracterización de uso en acuicultura, que eventualmente pueden ser bioacumulados por mitílidos.....	23
5.2	Revisión de literatura nacional e internacional, respecto de la posible bioacumulación de productos terapéuticos de uso en acuicultura.....	24
5.2.1	Resumen de Bibliografía nacional e internacional revisada, respecto de la posible bioacumulación de productos terapéuticos de uso en acuicultura, por parte de mitílidos.....	24
5.2.2	Resumen de Normativa internacional asociada a la bioacumulación de productos terapéuticos de uso en acuicultura por parte de mitílidos.....	26
5.3	Identificación y descripción de técnicas analíticas de detección de productos terapéuticos seleccionados.....	27
5.3.1	Recopilación y análisis de bibliografía.....	27
5.4	Modificaciones/confirmación de protocolos.....	33
5.5	Validación de Metodologías propuestas.....	34
5.5.1	Evaluación de Especificidad.....	34
5.5.2	Evaluación de Linealidad.....	35
5.5.3	Recuperación.....	35
5.5.4	Exactitud.....	37
5.5.5	Precisión.....	37
5.5.6	Límite de Detección (LD).....	40
5.5.7	Límite de Cuantificación (LC).....	40
5.5.8	Robustez.....	41
5.6	Revalidación de Diflubenzuron.....	41
5.6.1	Evaluación de Especificidad.....	41
5.6.2	Evaluación de Linealidad.....	41
5.6.3	Recuperación.....	41
5.6.4	Precisión.....	42
5.6.5	Límite de Detección (LD).....	43
5.6.6	Límite de Cuantificación (LC).....	43



5.7	Evaluación de riesgo de exposición y de detección de residuos de los productos terapéuticos seleccionados en el producto final de mitilicultura.....	43
5.8	Desarrollo de estudios de bioacumulación, depleción, excreción y metabolización de los productos terapéuticos seleccionados bajo condiciones controladas en mitílicos	46
5.9	Evaluación de estudios de bioacumulación, excreción y metabolización de los productos terapéuticos seleccionados en condiciones controladas	46
5.9.1	Cipermetrina	46
5.9.2	Deltametrina	47
5.9.4	Azametifós.....	47
5.9.5	Diflubenzurón.....	47
5.10	Desarrollo y ejecución de un plan de muestreo y encuesta epidemiológica que considere obtención de muestras desde centros de producción de mitílicos y bancos naturales conocidos, zonas blanco (alejadas de centros de producción de salmones) y zonas cercanas a producción de salmones	61
5.11	Análisis de las muestras obtenidas mediante las técnicas de laboratorio validadas	62
5.12	Descripción de la industria mitilicultora.....	62
5.12.1	Antecedentes productivos.....	62
5.12.2	Análisis de la oferta	67
5.12.3	Análisis de la demanda.....	74
5.13	Análisis estratégico.....	78
5.13.1	Análisis del medio interno: cadena de valor.....	78
5.13.2	Análisis del medio externo	89
5.14	Cuantificación económica social.....	95
5.14.1	Análisis del problema.....	95
5.14.2	Evaluación económica.....	95
5.15	Actividades Generales.....	99
5.15.1	Documento borrador con resultados derivados del estudio para publicación científica	99
5.15.2	Taller de resultados	99
6.	CONCLUSIONES.....	100
7.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103

ANEXOS



ÍNDICE DE ANEXOS

- Anexo 1.** Protocolo de obtención de bioacumulación y/o curvas de depleción de antiparasitarios en Mitílidos (*M. chilensis*) en condiciones controladas.
- Anexo 2.** Productos Antiparasitarios para control de Caligidosis en Salmónidos. Registro del Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), actualizado al 5 de marzo de 2015.
- Anexo 3.** Publicaciones científicas revisadas de bioacumulación de productos terapéuticos de uso en acuicultura en mitílidos y de detección de antiparasitarios.
- Anexo 4.** Procedimiento de detección y cuantificación de antiparasitarios en Mitílidos.
- Anexo 5.** Resultados experimentales de validación de Azametifós.
- Anexo 6.** Resultados experimentales de validación de Diflubenzurón.
- Anexo 7.** Resultados experimentales de validación de Cipermetrina-Deltametrina.
- Anexo 8.** Resultados experimentales de validación de Diflubenzurón.
- Anexo 9.** Cromatogramas de Muestras.
- Anexo 10.** Árbol de problemas de la evaluación económica de la actividad mitilicultora.
- Anexo 11.** Memoria de cálculo de la evaluación económica de la actividad mitilicultora.
- Anexo 12.** Borrador de trabajo científico.
- Anexo 13.** Lista de participantes del taller de presentación de resultados.
- Anexo 14.** Presentación realizada en el taller de entrega de resultados.



1. INTRODUCCIÓN

La producción intensiva de mitílicos en Chile ha tenido un fuerte desarrollo las últimas dos décadas, posicionándose como el segundo mayor sector productivo de la acuicultura. El cultivo de choritos en Chile comenzó en 1961, y a partir del año 2006, el 100 % de la producción de éstos era de cultivo (Uriarte, I. 2008). La producción de moluscos bivalvos se realiza principalmente en la Región de Los Lagos, compartiendo zonas geográficas y cuerpos de agua similares con la producción de especies salmónidas. De las 288.587 toneladas de choritos cosechadas el año 2011, 288.579 toneladas fueron obtenidas en la Región de Los Lagos (SERNAPESCA, 2011).

En el proceso productivo de peces salmónidos pueden presentarse enfermedades infecciosas, parasitarias y fúngicas que requieren de tratamiento químico o farmacológico. Si bien el uso de productos terapéuticos ayuda a controlar estas enfermedades, también conlleva a la inclusión directa o indirecta de estos en la columna de agua. La incorporación directa incluye el uso de productos para uso en baño o a través del alimento medicado no ingerido por los peces, mientras que la indirecta incluye la inclusión a la columna de agua de metabolitos excretados por piel (mucus), heces y orina de los peces. En este contexto, el mayor riesgo identificado para la producción de mitílicos se encuentra en los productos terapéuticos utilizados en baños (piretroides y organofosforados). Los cuerpos de agua que contengan estos productos terapéuticos pueden llegar a zonas cercanas de producción de mitílicos.

Existe numerosa bibliografía de la liberación de fármacos al medio ambiente, como excreción fecal y urinaria, o como alimento medicado no ingerido por parte de peces de cultivo (Hormazabal *et al.*, 1996, Lalumera *et al.*, 2004, Pouliquen y Morvan, 2005, Pouliquen *et al.*, 2009). El peligro de la aplicación de altas cantidades de estas sustancias, se evidencia en sus efectos colaterales, como puede ser la modificación cuantitativa y cualitativa de la flora bacteriana en el ambiente, afectando la conservación de la biodiversidad marina (Buschmann y Fortt, 2005), incidencia en las cadenas tróficas, desarrollo de defensas antibacterianas en patógenos de peces y transferencia de resistencia bacteriana a patógenos humanos (Borja, 2002). Estudios llevados a cabo en sistemas intensivos de producción de peces, han demostrado que en ciertas ocasiones se puede detectar un impacto significativo en un radio de un kilómetro alrededor de las jaulas de cultivo, siendo éste generalmente, mayor en el fondo (Borja, 2002). Sin embargo no hay publicaciones que describan el eventual impacto que puedan generar residuos de fármacos en mitílicos de cultivo, producto de la actividad salmoniculora.

Actualmente, en Chile y a nivel mundial, existe escaso conocimiento respecto de la capacidad de mitílicos de bioacumular, mediante su capacidad filtradora, productos terapéuticos a las dosis utilizadas como terapias en la salmonicultura. Asimismo, se desconoce si mediante el proceso de bioacumulación es posible encontrar residuos de productos químicos y farmacéuticos en los ejemplares de mitílicos, sin embargo, se han realizados estudios de depleción de diversos fármacos en animales, donde éstos se medican de acuerdo a las dosis recomendada por cada fabricante y se



obtienen muestras de matrices biológicas desde la suspensión de la medicación (Rievere y Mason, 2011). Así, las curvas de depleción son estudios de farmacocinética, toda vez que se evidencia el cambio de concentraciones a través del tiempo (Riviere, 2011).

En consecuencia, el presente proyecto de investigación abordó esta problemática, determinando la capacidad potencial que tienen los mitílidos de bioacumular este tipo de residuos y su impacto sobre la inocuidad alimentaria.



2. OBJETIVO GENERAL

Determinar la capacidad potencial de mitílicos de bioacumular en tejidos, productos farmacológicos de uso en acuicultura, la generación de residuos en producto y su potencial impacto sobre la industria mitilicultora.

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar los productos terapéuticos de uso en acuicultura con potencial de ser bioacumulados por mitílicos.
2. Desarrollo y validación de técnicas analíticas para la detección y cuantificación de productos terapéuticos seleccionados en matrices biológicas de mitílicos, de al menos 4 principios activos.
3. Evaluar la capacidad de bioacumulación, excreción y/o metabolización de mitílicos frente a la exposición a productos terapéuticos de uso en la salmonicultura bajo condiciones controladas, de al menos 4 principios activos.
4. Determinar la posible bioacumulación de productos terapéuticos en mitílicos, en áreas donde se producen peces y moluscos, y donde existan bancos naturales conocidos.
5. Evaluar el impacto social y económico de la detección de residuos de productos terapéuticos en la industria mitilicultora.



4. METODOLOGÍA

La metodología utilizada en la presente iniciativa se detalla de acuerdo a los objetivos específicos establecidos:

Objetivo 1: *Identificar los productos terapéuticos de uso en acuicultura con potencial de ser bioacumulados por mitílidos.*

4.1. Identificación de productos terapéuticos a evaluar

Se realizó una revisión bibliográfica de documentos del Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) para verificar el listado de productos antiparasitarios autorizados para su uso en acuicultura.

Por otro lado, se recopiló desde el Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura (SERNAPESCA) antecedentes respecto del uso de antiparasitarios en la industria.

Con todo ello se confeccionó una lista de productos químicos y farmacéuticos con su respectiva caracterización de uso en acuicultura, que eventualmente puedan ser bioacumulados por mitílidos.

4.2. Revisión de literatura nacional e internacional, respecto de la posible bioacumulación de productos terapéuticos de uso en acuicultura, por parte de mitílidos y de la normativa de países productores respecto de lo mismo.

Se realizó una búsqueda bibliográfica utilizando motores de búsqueda en línea tales como la ISI WEB of Science, ISI Web of Knowledge, Scopus, EBSCO, SciVerse-ScienceDirect, PubMed de la National Library of Medicine National Institutes of Health de Estados Unidos de Norteamérica (EEUU), entre otros. La búsqueda se enfocó en la obtención de artículos de investigación regulares y revisiones amplias en revistas con comité editor y libros científicos que hayan contemplado la obtención de bioacumulación y curvas de depleción de fármacos en mitílidos asociados a la salmonicultura, o cualquier otro estudio que pueda estar relacionado con la bioacumulación de sustancias farmacéuticas o químicas en moluscos bivalvos.

Se realizó una extensiva búsqueda de información pública y de libre acceso en sitios oficiales de organizaciones normativas internacionales que se relacionan o han relacionado con el uso de fármacos en salmonicultura y estudios de bioacumulación y depleción en mitílidos, o en su defecto, de moluscos bivalvos. Los documentos revisados correspondieron a los generados por la European Medicine Agency (EMA) e International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products (VICH). Adicionalmente, se revisó la normativa de países que tienen importancia en la producción acuicultora mundial, en especial salmónidos, como por ejemplo, Noruega, Reino Unido y Canadá.



Objetivo 2: *Desarrollo y validación de técnicas analíticas para la detección y cuantificación de productos terapéuticos seleccionados en matrices biológicas de mitílidos, de al menos 4 principios activos.*

4.3. Identificación y descripción de técnicas analíticas de detección de productos terapéuticos seleccionados

Se realizó una búsqueda bibliográfica utilizando motores de búsqueda en línea tales como la ISI Web of Science, ISI Web of Knowledge, Scopus, EBSCO, SciVerse-ScienceDirect, PubMed de la National Library of Medicine National Institutes of Health de Estados Unidos de Norteamérica (EEUU) entre otros. La búsqueda se enfocó en la obtención de artículos de investigación regulares y revisiones amplias en revistas con comité editor y libros científicos que hayan contemplado la detección y/o cuantificación de los compuestos cipermetrina, deltametrina, azametifós y diflubenzurón de diversas matrices, con especial énfasis en mitílidos, utilizando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Las metodologías fueron analizadas, comparadas y optimizadas, para ser adaptadas para la determinación de la capacidad potencial de mitílidos de bioacumular productos farmacológicos de uso en salmicultura en sus tejidos.

Luego se procedió a la elaboración de los protocolos preliminares de trabajo y a la adquisición de insumos específicos para generar los procesos extractivos y analíticos para cada uno de los compuestos problema.

4.4. Desarrollo y validación de técnicas analíticas para la detección y cuantificación de productos terapéuticos seleccionados en matrices biológicas de mitílidos

4.4.1 Obtención de muestras para el desarrollo de las técnicas

Se obtuvieron muestras de *Mytilus chilensis* "blanco" (sin residuos de analitos de interés) desde el cultivo de choritos de Justo García Campos en el sector de Hueihue, sitio alejado de centros de producción de peces salmónidos. Se utilizaron las partes blandas de los mitílidos, a los que se le agregaron concentraciones conocidas de las sustancias a probar (fortificados). Con estas muestras fortificadas se procedió a la etapa inicial de implementación de técnicas analíticas.

4.4.2 Preparación de la muestra

Para la determinación de los analitos a nivel traza (ppb) en una matriz compleja, como lo representan las partes blandas de los mitílidos, se procedió en general de la siguiente manera:

- Disgregación de la matriz
- Disolución de sustancias



- Separación del analito de la matriz
- Determinación de la concentración del analito

4.4.3 Determinación y cuantificación del analito

Una vez obtenido el extracto, libre de gran cantidad de sustancias químicas contaminantes que entrega la matriz, se realizó una separación mediante HPLC, utilizando las columnas, fases móviles y detectores adecuados para cada analito en particular.

4.4.4 Modificaciones/confirmación de protocolos

Luego de establecidos e implementados en el laboratorio de IFOP en Puerto Montt los protocolos preliminares, estos fueron evaluados para la detección de los analitos Cipermetrina, Deltametrina, Diflubenzuron y Azametifos.

4.4.5 Validación de las metodologías propuestas

Especificidad

La especificidad, es la capacidad de evaluar inequívocamente el analito en la presencia de componentes que se puede esperar que estén presentes en la muestra.

Se determinó la especificidad para los analitos Diflubenzuron, Azametifos, Cipermetrina y Deltametrina, para lo cual se prepararon 3 curvas de calibración, de 5 puntos dentro del rango de interés, las cuales se efectuaron 3 días diferentes. Se determinó su tiempo de retención y conocieron las desviaciones respecto del valor central. Posteriormente se sometieron al proceso analítico al menos 10 muestras de choritos consideradas como "blanco" (sin los analitos de interés), para demostrar que la metodología validada no presenta interferentes de importancia en los tiempos de retención de los analitos estudiados.

Linealidad

La linealidad de un procedimiento analítico es su habilidad (dentro de un determinado rango) para obtener resultados que son directamente proporcionales a la concentración de analito en la muestra.

Se logró determinar el parámetro de linealidad para los analitos Diflubenzuron, Azametifos, Cipermetrina y Deltametrina. Utilizando los datos de las curvas preparadas en el punto anterior, se calculó la ecuación de la curva obtenida, con lo que se demostró linealidad utilizando el coeficiente de correlación (r^2) y se confeccionó un gráfico de errores residuales para identificar un posible comportamiento no lineal de la curva de calibración.



Recuperación (% recuperación)

La recuperación es el porcentaje de la concentración real de un analito que es recuperado cuando una muestra real o fortificada es sometida a un proceso analítico.

Cuando no existe material de referencia disponible, la recuperación se determina mediante análisis de choritos blanco fortificados en tres niveles de concentraciones conocidas de los analitos de interés. Se fortificaron 6 muestras blanco por cada nivel. Se analizaron las muestras y se calcularon las concentraciones de cada una. Esto se repitió dos veces más, en días diferentes.

La recuperación de cada muestra se calculó, mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ recuperación} = 100 \times \text{concentración medida} / \text{concentración enriquecida}$$

Se determinó la recuperación media de todos los días (la que será utilizada para el cálculo de concentración de muestras problema), el coeficiente de variación y la desviación estándar, con la que se confeccionó una carta de recuperación tipo Shewhart a ser utilizada como método de control interno de resultados analíticos.

Se logró determinar el parámetro de recuperación (%), para los analitos Diflubenzuron, Azametifos, Cipermetrina y Deltametrina.

Exactitud

La exactitud o veracidad es el grado de concordancia entre el valor medio obtenido de una gran serie de resultados y un valor de referencia aceptado.

Dada la inexistencia de material de referencia disponible para residuos de antiparasitarios en mitílidos, este procedimiento no aplica.

Precisión

La precisión de un procedimiento analítico expresa el grado de dispersión entre una serie de medidas obtenidas de múltiples muestras provenientes de una misma muestra homogénea, utilizando dicho procedimiento.

La precisión se mide en tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad.

Repetibilidad

La repetibilidad se expresa como la precisión bajo las mismas condiciones de operación en un corto período de tiempo. También es denominada precisión intraensayo.

Para el cálculo de repetibilidad se preparan un conjunto de muestras de choritos blancos idénticas, enriquecidas con los analitos en estudio y con 3 niveles de concentración dentro del rango de interés. De cada nivel se analizaron 6 muestras idénticas. Se calculó la concentración detectada en



cada muestra. Se determinó la concentración media, desviación estándar y el coeficiente de variación de las muestras enriquecidas.

Este procedimiento se efectuó en tres fechas distintas, con el propósito de conocer el comportamiento de la precisión por repetibilidad en el tiempo.

La precisión en condiciones de repetibilidad se expresa como coeficiente de de variación porcentual (% CV).

Se logró determinar el parámetro de repetibilidad para los analitos Diflubenzuron, Azametifos, Cipermetrina y Deltametrina.

Precisión intermedia

La precisión intermedia expresa las variaciones dentro de los laboratorios al realizar ensayos diferentes días, de diferentes analitos, diferentes equipos, etc. También es denominada reproducibilidad intralaboratorio.

Para el cálculo de precisión intermedia, se utilizan los resultados del estudio de repetibilidad en el tiempo. Se calculó la concentración detectada en cada muestra, la desviación estándar y el coeficiente de variación de las muestras enriquecidas.

La precisión intermedia se expresa como coeficiente de variación porcentual (%CV).

Se logró determinar el parámetro de precisión intermedia para los analitos Diflubenzuron, Azametifos, Cipermetrina y Deltametrina.

Reproducibilidad

No se puede realizar para este caso, debido a que es necesario participar en estudios colaborativos, que generalmente son organizados por los organismos reguladores u otras agencias dedicadas al desarrollo de métodos.

Límite de Detección (LD)

El límite de detección de un procedimiento analítico es la cantidad mínima de analito en una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada con la significancia estadística requerida.

Para obtener el área del límite de detección, se calcula la desviación estándar de las áreas obtenidas del fortificado más bajo realizado por tres días diferentes (6 fortificados cada vez). El valor obtenido se multiplicó por 3,3 y se interpolaron en la curva de calibración estándar, realizando todos los cálculos de acuerdo al procedimiento para obtener la fracción de masa del analito en la matriz (incluido el factor de recuperación).

Se establece el LD como el nivel más bajo ensayado que esté sobre el LD calculado.



Se determinó el LD para Diflubenzuron, Azametifos, Cipermetrina y Deltametrina.

Límite de Cuantificación (LC)

El LC de un procedimiento analítico es la cantidad mínima de analito en una muestra que puede ser cuantificada, con una adecuada significancia estadística.

Para obtener el área del LC, se calculó la desviación estándar de las áreas obtenidas del fortificado más bajo realizado en tres días diferentes (mismos utilizados para el cálculo de LD en el punto anterior). En este caso el valor se multiplicó por 10 y se interpolaron en la curva de calibración estándar, realizando todos los cálculos de acuerdo al procedimiento para obtener la fracción de masa del analito en la matriz (incluido el factor de recuperación).

Se establece como LC, el nivel más bajo ensayado que esté sobre el LC calculado.

Se determinó el LC para Diflubenzuron, Azametifos, Cipermetrina y Deltametrina.

Robustez

La robustez es la susceptibilidad de un método analítico a los cambios de las condiciones experimentales, que pueden expresarse en forma de lista de los materiales de la muestra, los analitos, condiciones ambientales, etc.

Durante el desarrollo del presente proyecto, no se realizó un cálculo de robustez propiamente tal, sino que se utilizó el coeficiente de variación total de la recuperación (al ser realizada en tres días diferentes, con reactivos de extracción y componentes de la fase móvil preparados diariamente) para dar una indicación de la robustez de los métodos. No hay criterio de aceptación de la robustez, ya que los criterios de aceptación se establecieron para la repetibilidad y precisión intermedia.

Objetivo 3: *Evaluar la capacidad de bioacumulación, excreción y/o metabolización de mitílicos frente a la exposición a productos terapéuticos de uso en la salmonicultura bajo condiciones controladas, de al menos 4 principios activos.*

4.5. Evaluación de riesgo de exposición y de detección de residuos de los productos terapéuticos seleccionados en el producto final de mitilicultura

Para dar cumplimiento a esta parte del objetivo 3, se revisaron las guías VICH GL6 (VICH GL6, 2000) y VICH GL38 (VICH GL38, 2004). Ambas guías están orientadas a poder evaluar el impacto ambiental generado por los productos utilizados en la actividad de la medicina veterinaria, sea esta orientada en el ámbito de la producción de animales terrestres como la producción de animales en agua dulce y mar.



4.6. Desarrollo de estudios de bioacumulación, depleción, excreción y metabolización de los productos terapéuticos seleccionados bajo condiciones controladas en mitílicos

Se realizó un estudio para obtener curvas de depleción de Cipermetrina, Deltametrina, Azametifos y Diflubenzuron de *M. chilensis* en condiciones controladas. El protocolo de estudio de depleción en mitílicos de los diferentes fármacos se desarrolló para cada fármaco en particular.

El esquema básico del estudio para los fármacos administrados por baño (Cipermetrina, Deltametrina y Azametifos), fue el siguiente:

- Se utilizaron estanques de 300 litros con agua de mar.
- Los procedimientos de limpieza, tipo de agua, taza de cambio de agua, fotoperiodo, etc., están especificados en los protocolos específicos. A cada estanque se agregaron linternas de cultivo con 300 ejemplares de *M. chilensis* adultos.
- Los mitílicos se alimentaron con cultivos de microalgas de *Isochrysis galbana*, *Nannochloropsis sp.* y *Spirulina máxima* producidos en el propio centro. Cada día se alimentó en cada uno de los estanques de mantención de choritos con aproximadamente 2,2 L de microalgas a concentración aproximada de $1,5 \times 10^6$ cél/mL. Esto para llevar a concentración los estanques en 100.000 cél/mL. La proporción de especies de microalgas en las raciones dependía de las disponibilidades diarias de cada una de las especies en el módulo de cultivo de microalgas. La alimentación se realizó dos veces al día (10:00 y 15:00 hrs.).
- En cada una de las raciones, se cortó el flujo de ingreso de agua de mar a los estanques, de manera de aprovechar al máximo las microalgas adicionadas.
- Los mitílicos se dejaron aclimatar por aproximadamente 14 días.
- Se prepararon 3 estanques de 100 litros aproximadamente con agua de mar, se les agregó el fármaco a las dosis recomendadas por los proveedores para salmónidos
- Antes de someterlos al tratamiento se realizó un muestreo de 20 choritos de cada estanque (4 pooles de 5 choritos).
- Se transfirieron las linternas con los choritos restantes a los estanques con los fármacos respectivos, éstos se mantuvieron sin recirculación de agua por el tiempo necesario de tratamiento, para cada fármaco en particular.
- Luego de cumplidos los tiempos de tratamiento específicos, los choritos se transfirieron a sus estanques originales, con recirculación de agua.
- Para cada estanque se obtuvieron 10 pooles de 5 mitílicos cada uno, en 4 ocasiones diferentes. El primero 1 hora después de circulación de agua normal. Los siguientes a los 5, 10 y 15 días luego de tratados los choritos.
- Luego de muestreados, los choritos fueron almacenados en bolsas plásticas debidamente rotuladas en cooler con gel pack, estas fueron transportadas rápidamente al Laboratorio de Química Analítica de IFOP en Puerto Montt.



El esquema básico del estudio de Diflubenzuron, fue el siguiente:

- Se distribuyeron 3 grupos de 20 peces y 300 choritos cada uno, en estanques de 300 litros. Se trabajó con Salmón del Atlántico (*Salmo salar*) y choritos, en los grupos experimentales designados como Diflubenzuron 1, 2 y 3.
- Peso promedio de peces: 120 gramos +/- 50 g.
- Tamaño de choritos: Se utilizaron choritos de 4-6 cm.
- Estado fisiológico: Se utilizaron peces sanos y libres de enfermedades concomitantes.
- Densidades poblacionales: los peces se mantuvieron a densidades comerciales (8 kilos de peso vivo/m³) a una salinidad de 30 ± 2‰.
- Criterio(s) de inclusión/exclusión: Se incluyeron aquellos animales sanos y que estén dentro los pesos vivos establecidos.
- Aclimatación de los animales: La aclimatación de los peces y choritos fue de 7 días antes del inicio del estudio, sin realizar otros manejos sanitarios y alimentándose con una fórmula comercial no medicada, a una tasa de alimentación de 1.4%
- Adicionalmente los choritos fueron alimentados con una suspensión de microalgas.
- Antes de iniciar el tratamiento de los peces con Diflubenzuron, se tomó una muestra de 20 choritos de cada estanque, los que fueron envasados en bolsas rotuladas como T0DF1 (Estanque Diflubenzuron 1), T0DF2 y T0DF3.
- A las 24 hrs de finalizado el tratamiento se tomó una muestra de 50 choritos de cada estanque, los que fueron envasados en bolsas rotuladas como T1DF1 (Estanque Diflubenzuron 1), T1DF2 y T1DF3.
- A los 2 días del tratamiento se tomó una muestra de 50 choritos de cada estanque, los que fueron envasados en bolsas rotuladas como T2DF1 (Estanque Diflubenzuron 1), T2DF2 y T2DF3.
- A los 5 días del tratamiento se tomó una muestra de 50 choritos de cada estanque, los que fueron envasados en bolsas rotuladas como T3DF1 (Estanque Diflubenzuron 1), T3DF2 y T3DF3.
- A los 7 días del tratamiento se tomó una muestra de 50 choritos de cada estanque, los que fueron envasados en bolsas rotuladas como T4DF1 (Estanque Diflubenzuron 1), T4DF2 y T4DF3.
- Luego de tomadas las muestras fueron enviadas de inmediato al Laboratorio de IFOP- Puerto Montt en cooler con gel-pack.

El esquema en detalle del estudio se puede observar en los protocolos de obtención de bioacumulación y/o curvas de depleción de antiparasitarios en mitílidos (*M. Chilensis*) en condiciones controladas (anexo 1).



4.7. Evaluación de estudios de bioacumulación, excreción y metabolización de los productos terapéuticos seleccionados en condiciones controladas

En el Laboratorio de Química Analítica de IFOP en Puerto Montt se realizaron los análisis de Cipermetrina, Deltametrina, Azametifos y Diflubenzurón en las muestras de partes blandas de mitílicos obtenidas, utilizando las metodologías previamente montadas y validadas. La finalidad de los ensayos, fue observar la posible bioacumulación de los analitos en cuestión, y confeccionar las curvas de depleción y tiempos de vida media de éstos

Con este esquema fue posible evaluar la capacidad de *M. chilensis* de bioacumular los antiparasitarios anteriormente mencionados en condiciones extremas de concentración (eventualmente, mayores a las que podría estar expuesto en sitios cercanos a centros de producción). La bioacumulación sólo fue posible de observar en Diflubenzurón, ya que para los antiparasitarios administrados por baño (Cipermetrina, Deltametrina y Azametifos) en las muestras obtenidas en el primer muestreo, se obtuvo como resultado “no detectado”. Con los resultados de la curva de depleción fue posible calcular el tiempo de vida media de eliminación ($T_{1/2}$) de Diflubenzurón.

Debido a los resultados obtenidos con Diflubenzurón, se decidió realizar en forma adicional, un nuevo estudio de bioacumulación y depleción de este principio activo en *Mitilus chilensis*, considerando muestreos adicionales durante la administración del alimento medicado. El esquema básico del estudio fue el siguiente:

- Se distribuyeron 3 grupos de 60 peces y 600 choritos cada uno, en estanques de 800 litros. Se trabajó con Trucha Arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) y choritos, en los grupos experimentales designados como Diflubenzuron 1, 2 y 3.
- Peso promedio de peces: 150 gramos +/- 50 g.
- Tamaño de choritos: Se utilizaron choritos de 4-6 cm.
- Estado fisiológico: Se utilizaron peces sanos y libres de enfermedades concomitantes.
- Densidades poblacionales: los peces se mantuvieron a densidades comerciales (11,3 kilos de peso vivo/m³) a una salinidad de 30 ± 2 ‰
- Criterio(s) de inclusión/exclusión: Se incluyeron aquellos animales sanos y que estén dentro los pesos vivos establecidos.
- Aclimatación de los animales: La aclimatación de los peces y choritos fue de 7 días antes del inicio del estudio, sin realizar otros manejos sanitarios y alimentándose con una fórmula comercial no medicada a una taza de 1.2% p/v.
- Antes de iniciar el tratamiento de los peces con Diflubenzuron, se tomó una muestra de 20 choritos de cada estanque, los que fueron envasados en bolsas rotuladas como T0DFB1 (Estanque 1), T0DFB2 (Estanque 2) y T0DFB3 (Estanque 3).



- El día 4 de tratamiento se tomó una muestra de 50 choritos de cada estanque. Se envasaron en bolsas rotuladas como T1DFB1 (Estanque1), T1DFB2 (Estanque 2) y T1DFB3 (Estanque 3).
- El día 7 de tratamiento se tomó una muestra de 50 choritos de cada estanque. Se envasaron en bolsas rotuladas como T2DFB1 (Estanque1), T2DFB2 (Estanque 2) y T2DFB3 (Estanque3).
- El día 11 de tratamiento se tomó una muestra de 50 choritos de cada estanque. Se envasaron en bolsas rotuladas como T3DFB1 (Estanque 1), T3DFB2 (Estanque 2) y T3DFB3 (Estanque 3).
- El día 14 de tratamiento se tomó una muestra de 50 choritos de cada estanque. Se envasaron en bolsas rotuladas como T4DFB1 (Estanque 1), T4DFB2 (Estanque 2) y T4DFB3 (Estanque 3).
- A las 24 hrs de finalizado el tratamiento se tomó una muestra de 50 choritos de cada estanque. Se envasaron en bolsas rotuladas como T5DFB1 (Estanque 1), T5DFB2 (Estanque 2) y T5DFB3 Estanque 3).
- A los 2 días de finalizado el tratamiento se tomó una muestra de 50 choritos de cada estanque. Serán envasaron en bolsas rotuladas como T6DFB1 (Estanque 1), T6DFB2 (Estanque 2) y T6DFB3 (Estanque 3).
- A los 3 días de finalizado el tratamiento se tomó una muestra de 50 choritos de cada estanque. Se envasaron en bolsas rotuladas como T7DFB1 (Estanque 1), T7DFB2 (Estanque 2) y T7DFB3 (Estanque 3).
- A los 7 días de finalizado el tratamiento se tomó una muestra de 50 choritos de cada estanque. Se envasaron en bolsas rotuladas como T8DFB1 (Estanque 1), T8DFB2 (Estanque 2) y T8DFB3 (Estanque 3).
- Luego de tomadas las muestras estas, se enviaron de inmediato al Laboratorio de IFOP- Puerto Montt en cooler con gel-pack.

Objetivo 4: *Determinar la posible bioacumulación de productos terapéuticos en mitílicos, en áreas donde se producen peces y moluscos, y donde existan bancos naturales conocidos.*

4.8 Desarrollo y ejecución de un plan de muestreo y encuesta epidemiológica que considere obtención de muestras desde centros de producción de mitílicos y bancos naturales conocidos, zonas blanco (alejada de centros de producción de salmones) y zonas cercanas a producción de salmones

De acuerdo a los resultados obtenidos de los estudios del objetivo 3, no hubo detección para los fármacos aplicados por baño, a pesar de las altas concentraciones dosificadas en condiciones controladas y cerradas.



Por otro lado, en el caso de Diflubenzurón, la concentración obtenida el primer día de muestreo de la curva de depleción fue inferior al Límite Máximo Residual (LMR) del antiparasitario, definido para producto final de carne de salmón, que es la concentración de equivalencia considerada para mantener la inocuidad alimentaria de los mejillones. A pesar de lo anteriormente señalado, se consensuó con la Subsecretaría de Pesca la realización de un plan de muestreo de dos principios activos diferentes, que fueron finalmente Azametifós y Deltametrina, en el centro de cultivo de mitílidos Cataluña ubicado en la Bahía Hueihue, cuyas coordenadas son S 41°54'14.0"; W 073°29'48.4", muy cercano al centro Hueihue de la empresa Marine Harvest.

El esquema básico del estudio para los fármacos administrados por baño (Deltametrina y Azametifos), fue el siguiente:

Se tomaron 10 pooles de 5 mitílidos cada uno, de la línea de cuelgas más cercana al centro de cultivo de salmones Hueihue (Fig 1), en tres tiempos diferentes. El muestreo se realizó al momento que estaba subiendo la marea, es decir cuando la corriente del agua se dirigía desde el centro de salmones hacia el centro de mitílidos. Los tiempos de muestreo fueron antes, durante y después de la ventana de tratamiento con los antiparasitarios en cuestión. En la Fig 2 se pueden observar las corrientes predominantes de la Bahía Hueihue. Las muestras debidamente rotuladas, fueron enviadas inmediatamente al Laboratorio de Química Analítica de IFOP-Puerto Montt, donde fueron congeladas a -20°C hasta su posterior análisis.



Fig. 1. Centro de cultivo de mitílidos Cataluña y centro de cultivo de salmones Hueihue de la empresa Marine Harvest.

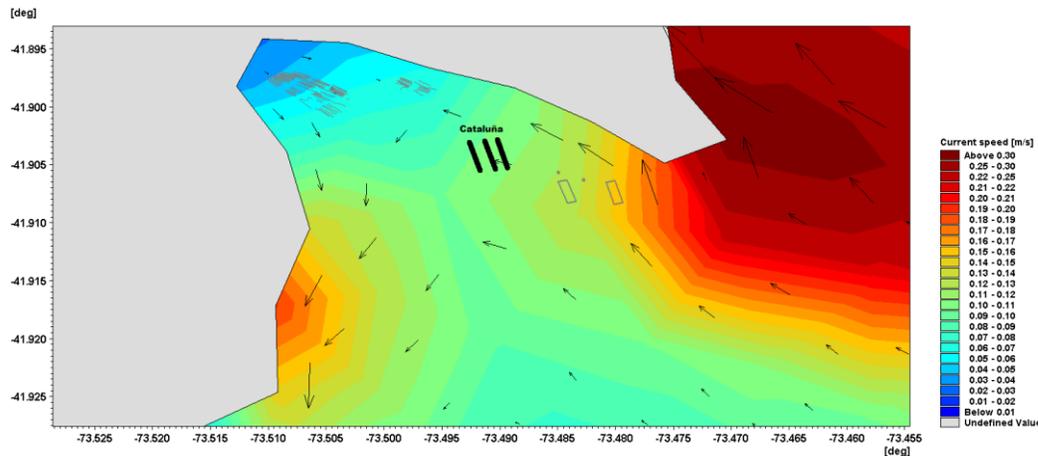


Fig. 2. Bahía Hueihue con corrientes predominantes, los dos rectángulos representan la ubicación del centro Hueihue de Marine Harvest.

4.9 Análisis de las muestras obtenidas mediante las técnicas de laboratorio validadas.

En el Laboratorio de Química Analítica de IFOP en Puerto Montt se realizaron los análisis de Deltametrina y Azametifos, en las muestras de partes blandas de mitílidos obtenidas, utilizando las metodologías previamente montadas y validadas. La finalidad de los ensayos, fue observar la posible bioacumulación de los analitos en cuestión en mejillones situados en zonas cercanas a centros de cultivo de salmones que realicen tratamientos con antiparasitarios.

Objetivo 5: *Evaluar el impacto social y económico de la detección de residuos de productos terapéuticos en la industria mitilicultora.*

4.10 Descripción de la industria mitilicultora

Por medio de la revisión de antecedentes y entrevista con actores relevantes del sector se realizó una descripción de la industria mitilicultora, la cual abarcó aspectos de importancia como:

- Antecedentes generales de la industria
- Antecedentes productivos
- Análisis de mercado
 - Análisis de la oferta
 - Análisis de la demanda

4.11 Análisis estratégico

- Análisis del medio interno: Análisis de la cadena de valor

El examen sistemático de los modos que tiene un negocio para lograr una ventaja competitiva duradera, no se puede realizar a nivel individual y como un todo. Es necesario reconocer las actividades de la unidad de negocios separándolas en etapas estratégicamente relevantes. Estas tareas incluyen desarrollo del producto, producción, distribución, marketing, ventas servicios y muchas formas de apoyo que se necesitan para lograr fluidez de operación en un negocio.

El foco de análisis de la cadena de valor es la unidad estratégica de negocios. El principio subyacente es que todas las tareas desempeñadas por una unidad de negocios pueden ser clasificadas en 9 categorías distintas. 5 de ellas en actividades primarias y 4 en actividades secundarias (Hax&Majluf, 1994) (**Figura 3**).



Figura 3. Estructura de la cadena de valor sugerida por Porter (Hax&Majluf, 1994).

A partir de este análisis se detallaron los factores y relaciones que están presentes en el modelo de análisis del medio interno, para posteriormente elaborar un perfil sistemático para la evaluación de la condición actual y futura, el cual llevó a concluir sobre los puntos críticos del negocio.

- Análisis del medio externo: Modelo de las 5 fuerzas

La definición de la posición competitiva de un negocio requiere de la evaluación de la industria en la que está inserta. El marco de referencia más influyente y el más ampliamente empleado es el modelo de las 5 fuerzas propuesto por M. Porter, quien postula que hay 5 fuerzas que conforman la estructura de la industria y dan cuenta de las relaciones que se establecen entre estos componentes:



- Intensidad de la rivalidad entre competidores.
- Amenaza de nuevos participantes.
- Amenaza de sustitutos.
- Poder de negociación de los compradores.
- Poder de negociación de los proveedores.

La **Figura 4**, ilustra que la estructura genérica de una industria está representada por los principales actores (competidores, compradores, proveedores, sustitutos y nuevos participantes), su interrelación (las 5 fuerzas) y los factores que hay detrás de esas fuerzas.

Como resultado de este análisis se detallaron cada uno de los factores y relaciones que están presentes en el modelo de análisis del medio externo, para posteriormente elaborar un perfil sistemático para la evaluación de la condición actual y futura (5 años), concluyendo a partir de éste los puntos críticos del sector.

4.12 Cuantificación Económica Social

Para evaluar el impacto social y económico de la detección de residuos de productos terapéuticos en la industria mitilicultora, se recopiló información a través de fuentes primarias y secundarias y se desarrollaron los siguientes componentes.

- Análisis del problema.

Una de las metodologías más usadas, especialmente en proyectos, programas y/o iniciativas evaluados por el Ministerio de Desarrollo Social, es el “Árbol de problemas”, ya que es un modelo explicativo y simplificado de la realidad.

Sus principales componentes son:

- Identificación del problema central (tronco del árbol)
- Identificación de los efectos del problema (ramas del árbol)
- Identificación de las causas del problema (raíces del árbol)

Dado que se elabora mediante aproximaciones sucesivas de causas y efectos, en torno a un problema definido, el trabajo se realizará a través de un panel de expertos y actores relevantes de la industria que utilizarán como información base los resultados obtenidos en los 4 objetivos específicos precedentes.

Dadas sus características, los principales beneficios de la metodología son:

- Es un procedimiento flexible y sencillo.
- Su eficiencia y efectividad depende de los participantes.
- Genera un consenso de opiniones en el proceso.
- Requiere una aplicación realista.

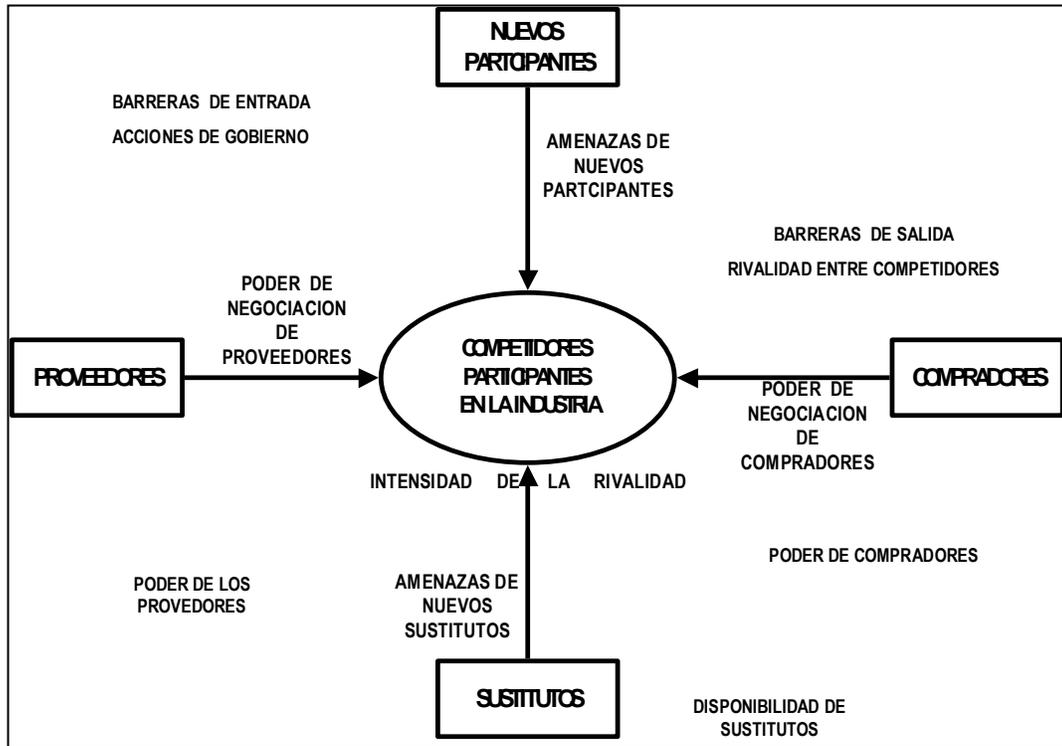


Figura 4. Elementos de la estructura de la industria: modelo de las 5 fuerzas de Porter (Hax&Majluf, 1993).

- Diagnóstico de la situación

El análisis de los efectos determinados en el Árbol de Problemas permitió definir un escenario de la situación post evaluación del potencial de bioacumulación, el cual incluyó los siguientes aspectos que sirvieron de insumo para la evaluación económica social.

- Área de estudio y de influencia
 - Población objetivo
 - Análisis de la demanda
 - Análisis de la oferta
- Evaluación económico social

La evaluación social se realiza para determinar la conveniencia para el país de ejecutar o no un proyecto. Esto conlleva que las decisiones de inversiones deben trascender la conveniencia institucional o sectorial, en función del bienestar del país.



El enfoque utilizado para esta evaluación será de “Costo/Beneficio”, dado que es posible identificar, medir y valorar los costos y beneficios del proyecto, programa o iniciativa. De esta forma se recopiló información a través de fuentes primarias y secundarias que permitió establecer los siguientes indicadores (Según metodología del Ministerio de Desarrollo Social):

- Precios sociales
- Tasa social de descuento
- Beneficios sociales
- Costos sociales

Para este tipo de enfoque los indicadores a utilizar, según las características del proyecto a evaluar, pueden ser:

- VAN social
- VAE social
- TIR social

Valor Actual Neto (VAN)

Si r es el costo de capital del inversionista y recibe n flujos al final de cada periodo F_1, F_2, F_n , el valor actual neto de esos flujos será:

$$VAN = -I_0 + \sum_{t=1}^n \frac{F_t}{(1+r)^t}$$

Donde:

- F_t = Flujo neto al final del periodo t
- F_t = $B_t - C_t$
- B_t = Beneficios o ingresos al final del periodo t
- C_t = Costos o gastos al final del periodo t
- I_0 = Inversión inicial
- r = costo de capital (tasa de descuento)
- n = número de periodos

Valor Actual Neto (VAE)

Convierte el VAN de un proyecto en un flujo constante de “beneficios netos anuales” para el horizonte de evaluación del proyecto. Se utiliza en caso de querer comparar iniciativas con distinta vida útil y repetibles.

$$VAE = VAN \cdot \frac{r \cdot (1+r)^n}{(1+r)^n - 1}$$



Tasa Interna de Retorno (TIR)

La TIR mide la rentabilidad de un proyecto o activo. Representa la rentabilidad media intrínseca del proyecto.

En esencia se define como aquella tasa a la cual se hace cero el valor actual neto.

$$VAN = -I + \sum_{t=1}^n \frac{F_t}{(1 + TIR)^t} = 0$$



5. RESULTADOS

Objetivo 1: *Identificar los productos terapéuticos de uso en acuicultura con potencial de ser bioacumulados por mitílidos.*

5.1. Identificación de productos terapéuticos a evaluar

5.1.1 Lista de productos antiparasitarios para control de caligidosis en salmónidos, con registro del SAG (Anexo 2):

- Deltametrina:
 - Deltafav, Farmacología en Acuicultura Veterinaria (FAV) S.A. Solución externa por inmersión. Dosis terapéutica: 3 ug/L por 40 minutos.
 - AMX, Pharmaq AS Chile Ltda. Solución externa por inmersión. Dosis terapéutica: 2 ug/L por 30-40 minutos.

- Cipermetrina:
 - Betamax, Novartis Chile S.A. Solución externa por inmersión. Dosis terapéutica: 15 ug/L por 30 minutos.

- Diflubenzurón:
 - Calishot, Farmacología en Acuicultura Veterinaria (FAV) S.A. Polvo uso oral en el alimento. Dosis terapéutica: 6 mg/Kg peso por 14 días.

- Benzoato de Emamectina:
 - Slice, Intervet Chile Ltda. Polvo uso oral en el alimento. Dosis terapéutica: 50 ug/Kg peso por 7 días.
 - Calbiofarm, Farmacología en Acuicultura Veterinaria (FAV) S.A. Polvo uso oral en el alimento. Dosis terapéutica: 50 ug/Kg peso por 7 días.
 - No registra nombre, Diagnostec Comercial S.A. Polvo de uso oral en el alimento. Dosis terapéutica 50 ug/Kg pero por 7 días.
 - No registra nombre, Intervet Chile Ltda. Polvo uso oral en el alimento. Dosis terapéutica: 50 ug/Kg peso por 7 días.
 - Quinafish, Centrovvet Ltda. Polvo uso oral en el alimento. Dosis terapéutica: 50 ug/Kg peso por 7 días.

- Azametifos:
 - Byelice, Azametifos 50%, Bayer. Polvo para suspensión externa. Dosis terapéutica: 100 ug/L por 30-60 minutos.
 - CalFree, Azametifos 50%, Farmacología en Acuicultura Veterinaria (FAV) S.A. Polvo para suspensión externa. Dosis terapéutica: 100 ug/L por 30 minutos.



5.1.2. Antecedentes respecto del uso de antiparasitarios en la industria.

Se efectuaron las gestiones para obtener información oficial por parte de Sernapesca respecto del uso de antiparasitarios en la industria salmonicultora entre los años 2011 y 2012. De esta información se desprende lo siguiente:

Utilización de Antiparasitarios años 2011-2012

Emamectina:	2011:	49 Kg
	R. 8:	1 Kg
	R.10:	17Kg
	R.11:	31Kg
	2012:	116Kg
	R.10:	57Kg
R.11:	58Kg	
Cipermetrina:	2011:	342Kg
	R.10:	159Kg
	R.11:	183Kg.
	2012:	678Kg
	R.10:	172Kg
	R.11:	506Kg
Deltametrina:	2011:	40Kg
	R.10:	21Kg
	R.11:	19Kg
	2012:	197Kg
	R.10:	58Kg
	R.11:	139Kg
Diflubenzurón:	2011:	2815Kg
	R.10:	1320Kg
	R.11:	1495Kg
	2012:	2167Kg
	R.10:	638Kg
	R.11:	1528Kg



De los datos entregados, se desprende que Emamectina se está utilizando de manera marginal, siendo el antiparasitario oral de mayor uso Diflubenzurón. De los piretroides, el de mayor utilización fue Cipermetrina, 89,5% (2011) y 77,5% (2012).

El aumento de piretroides utilizados el año 2012 con respecto al 2011 se debe a un aumento de la utilización de estos compuestos en la Región de Aysén, lo que se explica al aumento de centros en dicha región (por consecuencia, un aumento en la biomasa) y a un aumento de temperatura de éstos centros (Sernapesca, 2012).

De los dos productos comerciales de Deltametrina registrados por el SAG, el de mayor utilización es Deltametrina 1% de Farmacología en Acuicultura Veterinaria (FAV) S.A.

Nuevamente se efectuaron las gestiones para obtener información oficial actualizada por parte de Sernapesca respecto del uso de antiparasitarios en la industria salmonicultora en la Región de Los Lagos el año 2013. De esta información se desprende lo siguiente:

Cipermetrina: 238 Kg
Deltametrina: 62 Kg
Azametifos: 1455 Kg
Diflubenzuron: 2848 Kg

Claramente la utilización de Azametifos desplazó completamente a los piretroides como elección en las terapias aplicadas por baños. La utilización de Diflubenzurón como terapia aplicada en forma oral el año 2013 aumentó más de dos veces con respecto al año 2011 y más de 4 veces con respecto al año 2012. La información del año 2014 aún no se encuentra disponible. No se consideró el consumo de Emamectina el año 2013, ya que como se argumentó anteriormente, su utilización no es significativa.

5.1.3. Lista de productos químicos y farmacéuticos con su respectiva caracterización de uso en acuicultura, que eventualmente pueden ser bioacumulados por mitílicos.

La elaboración de esta lista, se restringe a antiparasitarios utilizados para el tratamiento de caligidosis.

Antiparasitarios aplicados en baño:

Deltametrina: Los dos productos comerciales autorizados en Chile tienen la misma concentración 1%. La dosis y duración de tratamiento ya están señaladas en 5.1.1. Deltametrina es efectivo para el tratamiento adulto y preadulto del caligus (no juveniles). El período de resguardo va entre 10 a 20 grados día. Producto autorizado para su uso en salmónidos en Noruega y Reino Unido. En los peces la vía de ingreso de Deltametrina es por las branquias, debido a la corta duración del tratamiento y a su baja concentración, el antiparasitario logra bajas concentraciones en el pez.



Cipermetrina: Betamax es Cipermetrina 5% (80cis/20trans). La dosis y duración de tratamiento ya están señaladas en 5.1.1. Cipermetrina es efectivo para el tratamiento de todos los estadios de *Caligus rogercresseyi*. El período de resguardo es de 30 grados día. Producto autorizado para su uso en salmónidos en Reino Unido e Irlanda.

Azametifos: Está a una concentración de 50%. La dosis y duración de tratamiento ya están señaladas en 5.1.1. Azametifos es efectivo para el tratamiento de estadios adulto de *Caligus rogercresseyi*. El período de resguardo es de 10-20 grados día. Producto autorizado para su uso en salmónidos en Reino Unido e Irlanda.

Antiparasitarios aplicados en alimento:

Diflubenzurón: Se produce a una concentración de 80% (Calishot). La dosis y duración de tratamiento ya están señaladas en 5.1.1. Diflubenzurón es efectivo para el tratamiento y control de etapas juveniles de *Caligus rogercresseyi*. El período de resguardo es de 300 grados día. Producto autorizado para su uso en salmónidos en Noruega.

Emamectina: Los 5 productos comerciales son benzoato de emamectina al 0.2%. La dosis y duración de tratamiento ya están señaladas en 5.1.1. Emamectina es efectivo contra todas las etapas de desarrollo de *Caligus*. El período de resguardo es de 60 días antes de la cosecha. Producto autorizado para su uso en salmónidos en Noruega, Canadá, Reino Unido e Irlanda.

5.2. Revisión de literatura nacional e internacional, respecto de la posible bioacumulación de productos terapéuticos de uso en acuicultura, por parte de mitílidos y de la normativa de países productores respecto de lo mismo.

5.2.1 Resumen de Bibliografía nacional e internacional revisada, respecto de la posible bioacumulación de productos terapéuticos de uso en acuicultura, por parte de mitílidos.

Solamente se encontró un trabajo que aborda la bioacumulación de Cipermetrina en mitílidos asociados a la salmonicultura (Gowland *et al*, 2002), por lo que se incluyó en la búsqueda algunos trabajos de bioacumulación de otras sustancias orgánicas en mitílidos. El listado de trabajos revisados se detalla en **anexo 3**.

Katagi el 2010 realiza una revisión bibliográfica de bioconcentración, bioacumulación y metabolismo de pesticidas en organismos acuáticos. En este trabajo se señala que bioconcentración es un término que se utiliza para describir el proceso por los cuales los pesticidas ingresan al organismo directamente desde el agua, a través de las branquias o tejidos epiteliales. Bioacumulación incluye el efecto del ingreso vía alimento o a través de los sedimentos. Cuando los niveles de pesticidas, acumulados en el organismo, se concentran a través de dos o más niveles tróficos de la cadena



alimenticia, el proceso se denomina biomagnificación. En general Katagi señala que la liposolubilidad y el tamaño molecular afectan la tendencia a bioacumular. Indica que hay una buena correlación del factor de bioconcentración (BCF) y el coeficiente de partición de n-octanol/agua (K_{ow}) en varias combinaciones de compuestos químicos y peces. Entre las condiciones fisiológicas de los organismos acuáticos, el contenido lipídico de éstos es la más importante para la determinación de la bioconcentración. El contenido lipídico de los mitílidos es entre 0,6 y 3,9% en base a peso seco. De los lípidos extraídos de los mitílidos entre el 57-79% son fosfolípidos (PL) y entre 10-25% son triacilglicéridos (TAG). Se ha encontrado que la variación estacional es poca para los PL (ya que son componentes de las membranas biológicas) y mayores en los TAG (que son utilizados para el almacenamiento de energía). Los pesticidas generalmente están distribuidos en la masa visceral, incluyendo las glándulas digestivas y las gónadas.

La tasa de bioconcentración de un químico en un organismo está gobernada principalmente por la absorción y eliminación de éste, pero de igual modo afecta la transformación metabólica del compuesto. Los pesticidas hidrofóbicos como pentaclorofenol, DDT y DDE, son rápidamente eliminados en los moluscos, y se eliminan en menos de 1 día. Los pesticidas organoclorados tienen BCF en moluscos de 4-6, en cambio los piretroides tienen BCF de 2-4, lo que puede deberse a metabolización de éstos últimos. Independiente del tipo de químico que se trate, se ha encontrado una correlación entre $\log K_{ow}$ y BCF (Katagi, 2010).

Es importante señalar que para medir BAF (factor de bioacumulación) hay que considerar una serie de factores adicionales, como lo son los niveles de exposición del analito en el agua, presencia de partículas de sedimento y hábitos alimenticios de los organismos. Cabe señalar que al igual que BCF, BAF tiene una correlación con el $\log K_{ow}$ del analito en cuestión (Katagi, 2010).

El metabolismo es muy importante en la bioconcentración, bioacumulación y detoxificación de los analitos del organismo en cuestión. Hay muchas enzimas que juegan un importante rol en la detoxificación de los pesticidas de los organismos. Dentro de éstas se encuentran las oxidasas, se ha reportado la presencia de actividad de FAD monooxigenasa (FMO) y P450 en *Mytilus edulis*, incluso en esta última se ha reportado variación estacional de su actividad en glándulas digestivas (Katagi, 2010).

El año 2002 se publicó un estudio de absorción y efectos de tratamientos de cipermetrina en *Mytilus edulis* (Gowland *et al.*, 2002). Se utilizaron 5 tanques de 60 litros con agua de mar, a una temperatura de 12°C. A cada estanque se agregaron 12 mitílidos, los que se dejan aclimatar por 3 días. Luego se transfieren los mitílidos a vasos de vidrio de 1 litro que contenían agua de mar, a los que se agregó 100 ul de etanol (vaso 1), 100 ul de agua (vaso 2), 100 ul de Cipermetrina (vaso 3: concentración final de 1000 ug/L), 100 ul de Cipermetrina diluida 1/10 con etanol (vaso 4: concentración final de 100 ug/L) y 100 ul de Cipermetrina diluida 1/100 con etanol (vaso 5: concentración final de 10 ug/L). Luego de 1 hora de exposición los mitílidos son devueltos a sus estanques originales. La rutina de exposición se repitió diariamente, por un total de 16 días, luego de lo cual de cada uno de los 3 tanques tratados, se seleccionan tres mitílidos al azar, los cuales se congelaron a -70°C, para posteriormente determinar la presencia de cipermetrina en las partes



blandas de estos mediante cromatografía de gases. En este trabajo se demuestra que se bioacumula cipermetrina en las partes blandas de *M. edulis*. Sin embargo se señala que esta bioacumulación difícilmente se producirá en la naturaleza, ya que las concentraciones utilizadas son muy superiores a los estándares de calidad ambientales determinados por SEPA, que son de 16 ng/L. En este trabajo no se calcula el factor de Bioconcentración, ni curvas de depleción de Cipermetrina, pero si determinan que la proporción de isómeros cis con respecto a los isómeros trans es mayor en los mitílicos, en comparación al producto comercial utilizado, lo que sugeriría que en *Mytilus* habría una mayor metabolización de isómeros trans.

Hay estudios en mitílicos de presencia de 4-nonylfenol (Ricciardi *et al.*, 2008), tributilestaño (Chen *et al.*, 2011), benzoantraceno (Yakan *et al.*, 2011), PAHs y PCBs (Nesto *et al.*, 2007; Fang *et al.*, 2010; Skarphedinsdottir *et al.*, 2010), ciclopentanopireno y benzofluorantreno (PHAs) (Fabri *et al.*, 2006), metales (Nesto *et al.*, 2007), DDT (Skarphedinsdottir *et al.*, 2010), clordanos (Skarphedinsdottir *et al.*, 2010) y filtros UV lipofílicos (Bachelot *et al.*, 2012). Algunos de estos estudios fueron en condiciones controladas (Ricciardi *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2011; Yakan *et al.*, 2010) y de campo con mitílicos recolectados en su hábitat natural (Skarphedinsdottir *et al.*, 2010; Fang *et al.*, 2010; Nesto *et al.*, 2007) o se mantuvieron mitílicos (provenientes de una zona sin contaminación) por 30 días en las zonas en estudio (Fabri *et al.*, 2006).

En la totalidad de los trabajos revisados, los analitos fueron cuantificados en las partes blandas de los mitílicos. Siempre se utilizaron pooles de mitílicos, que varían de 3 a 10 individuos por pool. El tamaño de los mitílicos utilizados varía entre 3,5 a 8 cm. de largo. En los estudios de campo, se midió la concentración de analito en los mitílicos para ver la contaminación de zonas geográficas específicas (Skarphedinsdottir *et al.*, 2010; Fang *et al.*, 2010; Nesto *et al.*, 2007; Fabri *et al.*, 2006), mientras que en los estudios de condiciones controladas, se estudió la concentración alcanzada por los mitílicos a diferentes concentraciones y tiempos de exposición (Ricciardi *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2011; Yakan *et al.*, 2010).

Se ha sugerido que en lugares cercanos a jaulas de cultivo de salmónidos, sus desechos son la principal fuente de materia orgánica, la que se diluye en la columna de agua y está potencialmente disponible para los filtradores (Mazzola y Sará, 2001).

5.2.2 Resumen de Normativa internacional asociada a la bioacumulación de productos terapéuticos de uso en acuicultura por parte de mitílicos.

No se encontraron documentos acerca de la existencia de normativa internacional asociada a la bioacumulación de productos terapéuticos de uso en acuicultura por parte de mitílicos o a moluscos bivalvos.



Objetivo 2: Desarrollo y validación de técnicas analíticas para la detección y cuantificación de productos terapéuticos seleccionados en matrices biológicas de mitílidos, de al menos 4 principios activos.

5.3. Identificación y descripción de técnicas analíticas de detección de productos terapéuticos seleccionados.

5.3.1 Recopilación y análisis de bibliografía

5.3.1.1 Bibliografía

Con la revisión bibliográfica realizada, se seleccionaron los trabajos científicos de interés, que sirvieron de base para la generación de los protocolos preliminares elaborados, y para la posterior implementación de las técnicas de laboratorio. Las citas de todos los trabajos revisados se pueden observar en el **anexo 3**.

5.3.1.2 Tipo de muestra a utilizar

Para la detección de antiparasitarios, como así también otros analitos, en mitílidos se realiza en las partes blandas de éstos. Por otra parte, las recomendaciones entregadas por VICH (2011) y EMEA (1995), dicen que las muestras a analizar deben corresponder al producto que será consumido por la población humana, el que en este caso son precisamente las partes blandas de los mitílidos.

5.3.1.3 Extracción de los analitos:

De la bibliografía revisada se desprende lo siguiente:

5.3.1.3.1 Cipermetrina:

La Cipermetrina es un derivado sintético de las piretrinas (Rawn *et al.*, 2010; Zuccari y Vassilieff, 1997). Este compuesto es muy hidrofóbico. La extracción de Cipermetrina en diversas matrices ha sido realizada utilizando variados solventes, buffers o ácidos tales como:

- Acetonitrilo (Zuccari y Vassilieff, 1997)
- Hexano (Nisharaj *et al.*, 2012)
- Ácido acético y acetato de sodio (Faqir Muhammad *et al.*, 2013)

Posteriormente a la extracción se realiza en algunos casos una limpieza de la muestra (“clean-up”) en columna de sílica (Zuccari y Vassilieff, 1997), micro extracción en fase sólida (Faqir Muhammad *et al.*, 2013), mientras en otros casos no se realiza “clean-up” (Nisharaj *et al.*, 2012).

Hay trabajos en que como extracción se utiliza una metodología denominada DLLME (Dispersive Liquid-Liquid Microextraction) (Boonchiangma *et al.*, 2012), es una metodología que fue publicada el 2006, que utiliza solventes en muy bajas concentraciones y con un altos porcentajes de



recuperación y enriquecimiento. El problema es que se utiliza en muestras acuosas (agua, jugos por ejemplo), debido a lo cual no será considerada.

En otros trabajos se realiza la extracción utilizando la metodología denominada Quechers para su posterior detección por cromatografía de gases (GC) (Brondi *et al.*, 2009; Ji-Yeon Park *et al.*, 2011; Rawn *et al.*, 2010; Roscoe *et al.*, 2008). Esta metodología de extracción, desde su aparición el año 2003, ha ganado popularidad en la detección de diferentes analitos en una amplia variedad de matrices, debido a que es una preparación simple, rápida, de buena recuperación y utiliza relativamente poca cantidad de solventes.

Pese a que en los trabajos revisados la extracción Quechers para cipermetrina se realiza acoplado a detección por GC, se optó por probar esta extracción para luego ser detectada por HPLC. Esta metodología de extracción involucra básicamente dos pasos:

- micro extracción líquida
- clean-up en fase sólida.

En la bibliografía revisada, para la extracción de Cipermetrina de diversas matrices, todas utilizaron como solvente de extracción Acetonitrilo (Brondi *et al.*, 2009; Ji-Yeon Park *et al.*, 2011; Rawn *et al.*, 2010; Roscoe *et al.*, 2008), ya que este solvente tiene las mejores características de extracción de un amplio rango de analitos (dentro de ellos Cipermetrina). Algunos agregan sulfato de magnesio anhidro y acetato de sodio (Ji-Yeon Park *et al.*, 2011; Rawn *et al.*, 2010; Roscoe *et al.*, 2008), otros en vez de acetato de sodio agregan cloruro de sodio (Brondi *et al.*, 2009). Los trabajos donde utilizan acetato de sodio, utilizan Acetonitrilo con 1% de ácido acético, esto lo realizan para prevenir la degradación de ciertos analitos sensibles al pH, lo que no sería el caso ya que Brondi *et al.* (2009) utilizan cloruro de sodio en vez de acetato sin problemas, razón por la cual se decide probar con extracción con Acetonitrilo, sulfato de magnesio y cloruro de sodio.

Como clean-up algunos realizan el proceso de extracción en fase sólida dispersiva utilizando sulfato de magnesio anhidro y PSA (Ji-Yeon Park *et al.*, 2011), mientras otros agregan además C-18 (Brondi *et al.*, 2009; Rawn *et al.*, 2010; Roscoe *et al.*, 2008), como la mayoría utiliza, en adición al sulfato de magnesio y PSA, C-18, que remueve componentes grasos de cadenas largas, esteroides y otros interferentes no polares, se decide probar con esta metodología como clean-up. Adicionalmente se probará realizando la extracción en fase sólida utilizando cartuchos oasis HLB.

5.3.1.3.2 Deltametrina:

La Deltametrina es un derivado sintético de las piretrinas (Rawn *et al.*, 2010; Zuccari y Vassilief, 1997). Este compuesto es muy hidrofóbico. La extracción de Deltametrina en diversas matrices ha sido realizada utilizando variados solventes tales como:

- Acetonitrilo (Kyu Bong Kim *et al.*, 2006; Yan Ding *et al.*, 2004; Zuccari y Vassilieff, 1997)
- Diclorometano (López-López *et al.*, 2001).



Posteriormente a la extracción se realiza en algunos casos una limpieza de la muestra (“clean-up”) en columna de sílica (Zuccari y Vassilieff, 1997), columna de Florisil (López-López *et al.*, 2001), o sin “clean-up” (Kyu Bong Kim *et al.*, 2006; Yan Ding *et al.*, 2004).

Hay trabajos que utilizan DLLME (Boonchiangma *et al.*, 2012), que como ya fue mencionado anteriormente es útil en muestras acuosas por lo que no va a ser considerada.

Existen una serie de trabajos donde la extracción la realizan con Quechers, para su posterior detección por GC (Rawn *et al.*, 2010; Roscoe *et al.*, 2008) o HPLC (Carneiro *et al.*, 2013; Zanella *et al.*, 2013). Las características de esta metodología ya fueron comentadas anteriormente. Como ya mencionamos esta metodología de extracción involucra básicamente dos pasos:

- micro extracción líquida
- clean-up en fase sólida

En la bibliografía revisada, para la extracción de deltametrina, todas utilizaron como solvente de extracción Acetonitrilo con 1% de ácido acético, sulfato de magnesio y acetato de sodio (Carneiro *et al.*, 2013; Rawn *et al.*, 2010; Roscoe *et al.*, 2008; Zanella *et al.*, 2013), como ya fue mencionado el acetato de sodio y el ácido acético, lo utilizan para prevenir la degradación de analitos sensibles al pH, como deltametrina es muy similar a cipermetrina, se decide probar la misma extracción que para cipermetrina, es decir Acetonitrilo, sulfato de magnesio anhidro y cloruro de sodio.

Como clean-up realizan el proceso de extracción en fase sólida dispersiva utilizando sulfato de magnesio (Carneiro *et al.*, 2013), sulfato de magnesio con PSA (Zanella *et al.*, 2013) o sulfato de magnesio con PSA y C-18 (Rawn *et al.*, 2010; Roscoe *et al.*, 2008). Se decide utilizar como clean-up sulfato de magnesio anhidro, PSA y C-18. Adicionalmente se probará realizando la extracción en fase sólida utilizando cartuchos oasis HLB

5.3.1.3.3 Azametifos

Azametifós, es un insecticida organofosforado. La extracción de azametifos de muestras sólidas ha sido realizada con solventes como acetato de etilo (Pfenning *et al.*, 1999; Rawn *et al.*, 2009) y acetonitrilo (Zanella *et al.*, 2013). En un trabajo se realiza la extracción utilizando la técnica MSPD (Matriz Solid-Phase Dispersion), que utilizan liofilizador y por su complejidad no consideraremos su utilización (Carro *et al.*, 2012).

Posteriormente a la extracción inicial y luego de varias particiones con gran cantidad de solventes, se realiza una limpieza final de la muestra utilizando extracción en fase sólida con columnas C-18 (Pfenning *et al.*, 1999; Rawn *et al.*, 2009).

En el trabajo presentado por Zanella *et al.* (2013), se realiza la extracción de 96 pesticidas (entre ellos azametifos y deltametrina) de frutas utilizando una metodología Quechers. La metodología Quechers ha ganado popularidad, desde su aparición el año 2003, en la detección de diversos



analitos, desde una amplia variedad de matrices, debido a que es simple, rápida, de buena recuperación y utiliza relativamente poca cantidad de solventes.

Se optó por probar la extracción de azametifos en mitílidos, basado en la metodología Quechers. En el trabajo de Zanella (2013) la extracción se realiza con Acetonitrilo (con 1% de ácido acético), sulfato de magnesio anhidro y acetato de sodio, lo que se debe a que seguramente dónde realizan la extracción de una gran cantidad de pesticidas, puede que algunos de éstos sean sensibles a variaciones de pH. Se decidió probar la extracción con Acetonitrilo, sulfato de magnesio y cloruro de sodio.

Como clean-up Zanella (2013) utiliza el proceso de extracción en fase sólida dispersiva utilizando sulfato de magnesio anhidro y PSA. Este trabajo fue realizado en muestras de fruta, la matriz de mitílidos puede ser un poco más sucia, razón por la cual se decidió probar utilizando sulfato de magnesio anhidro, PSA y C-18. Adicionalmente se probará realizando la extracción en fase sólida utilizando cartuchos oasis HLB.

5.3.1.3.4. Diflubenzurón

Diflubenzurón es una benzoilurea, compuesto hidrofóbico. La extracción de diflubenzurón de diversas matrices ha sido realizada utilizando variados solventes tales como:

- Acetona (T. Tomšej and J. Hajsšlová, 1995)
- Metanol (Luvizotto-Santos et al., 2009; Mayer-Helm, et al., 2008)
- Etilacetato (Balinova, 1998; Martínez-Galera et al., 2001; Miliadis et al., 1999)
- Acetonitrilo (Rodríguez et al., 1999)
- Diclorometano (Dommarco et al., 1998)

Posteriormente a la extracción en algunos casos se realiza una limpieza de la muestra ("clean-up") utilizando cromatografía de permeación en gel (GPC) (Balinova, 1998; T. Tomšej and J. Hajsšlová, 1995), extracción en fase sólida (De la Colina et al., 1994; Luvizotto-Santos et al., 2009; Martínez-Galera et al., 2001; Miliadis et al., 1999; Rodríguez et al., 1999).

Hay una serie de trabajos en que se realiza la extracción utilizando la metodología denominada Quechers (Chen et al., 2011; Gilbert-López et al., 2010; Lesueur et al., 2008; Sung Woo Lee et al., 2011; Tfouni et al., 2013). Esta metodología de extracción, desde su aparición el año 2003, ha ganado popularidad en la detección de diferentes analitos en una amplia variedad de matrices, debido a que es una preparación simple, rápida, de buena recuperación y utiliza relativamente poca cantidad de solventes.

Se optó por utilizar una extracción basada en la metodología Quechers. Esta metodología de extracción involucra básicamente dos pasos:



- micro extracción líquida
- clean-up en fase sólida.

En la bibliografía revisada, para la extracción de diflubenzurón de diversas matrices, todas utilizaron como solvente de extracción Acetonitrilo (Chen *et al.*, 2011; Gilbert-López *et al.*, 2010; Lesueur *et al.*, 2008; Sung Woo Lee *et al.*, 2011; Tfouni *et al.*, 2013), ya que este solvente tiene las mejores características de extracción de un amplio rango de analitos (dentro de ellos diflubenzurón). Algunos agregan sulfato de magnesio anhidro y cloruro de sodio (Gilbert-López *et al.*, 2010; Tfouni *et al.*, 2013) otros agregan además sales de citrato de sodio (Lesueur *et al.*, 2008; Sung Woo Lee *et al.*, 2011) y otro sulfato de magnesio y acetato de sodio anhidro (Chen *et al.*, 2011). En general las sales de citrato y el acetato de magnesio tienen como función prevenir la degradación de ciertos analitos sensibles al pH, lo que no sería este el caso ya que hay trabajos dónde no se utilizan, razón por la cual se decide probar con extracción con Acetonitrilo, sulfato de magnesio y cloruro de sodio.

Como clean-up unos realizan extracción en fase sólida en columna con C18 (Tfouni *et al.*, 2013), aminopropil (Chen *et al.*, 2011), o con proceso de extracción en fase sólida dispersiva (como el método original Quechers) utilizando sulfato de magnesio anhidro, PSA y GCB (Sung Woo Lee *et al.*, 2011) y además C-18 (Gilbert-López *et al.*, 2010). GCB se utiliza principalmente para remover pigmentos, lo que no es el caso de muestras de mitílidos, debido a lo cual se decide probar con sulfato de magnesio anhidro, PSA y C-18. Adicionalmente se probará haciendo un clean-up con cartuchos de fase sólida similar al utilizado por Tfouni *et al.*, (2013), pero utilizando columnas de extracción Oasis HLB.

5.3.1.4 Condiciones cromatográficas de los analitos:

5.3.1.4.1 Cipermetrina

Para la separación de cipermetrina mediante HPLC se han efectuado numerosos trabajos en fase reversa utilizando diversas columnas cromatográficas, en su gran mayoría son C-18 (Armenta *et al.*, 2005; Boonchiangma *et al.*, 2012; Chalányová *et al.*, 2010; Jianhua Cheng *et al.*, 2009; Faqir Muhammad *et al.*, 2013; Zuccari y Vassilieff, 1997). Las fases móviles mayormente utilizadas son mezclas de Acetonitrilo/Agua (Armenta *et al.*, 2005; Boonchiangma *et al.*, 2012; Jianhua Cheng *et al.*, 2009; Zuccari y Vassilieff, 1997), Metanol/Agua (Chalányová *et al.*, 2010; Faqir Muhammad *et al.*, 2013).

La detección se realiza utilizando detectores UV-vis (Armenta *et al.*, 2005; Boonchiangma *et al.*, 2012; Chalányová *et al.*, 2010; Jianhua Cheng *et al.*, 2009; Faqir Muhammad *et al.*, 2013; Zuccari y Vassilieff, 1997) a longitudes de onda de 210 a 278 y de masas (Carneiro *et al.*, 2013).

Se optó por utilizar una columna C-18 Accucore XL de Thermo Scientific de 150 x 4.6 mm, 4 um, al ser una columna de centro sólido de una alta resolución, superior a las columnas C-18 tradicionales. Como fases móviles se probarán mezclas de metanol/acetonitrilo/agua, para obtener la mejor cromatografía posible. Para la detección se utilizará un detector de arreglo de diodos, con longitud



de onda de monitoreo a establecer entre los 200 y 280 nm, intentando obtener una máxima intensidad de la señal, con el menor ruido de fondo posible.

5.3.1.4.2 Deltametrina

Para la separación de deltametrina mediante HPLC se observan numerosos trabajos en fase reversa utilizando diversas columnas cromatográficas, en su gran mayoría son C-18 (Boonchiangma *et al.*, 2012; Jianhua Cheng *et al.*, 2009; Kyu Bong Kim *et al.*, 2006; Tsochatzis *et al.*, 2010; Qing Xiang Zhou *et al.*, 2008; Xi Yu *et al.*, 2012; Faqir Muhammad *et al.*, 2013; Zuccari y Vassilieff, 1997) y Ciano (Yan Ding *et al.*, 2004) Las fases móviles mayormente utilizadas son mezclas de Acetonitrilo/Agua (Boonchiangma *et al.*, 2012; Jianhua Cheng *et al.*, 2009; Tsochatzis *et al.*, 2010; Yan Ding *et al.*, 2004; Xi Yu *et al.*, 2012; Zuccari y Vassilieff, 1997), Acetonitrilo/Ácido sulfúrico 1% (Kyu Bong Kim *et al.*, 2006) y Acetonitrilo/Metanol/Agua (Qing Xiang Zhou *et al.*, 2008).

La detección se realiza utilizando detectores UV-vis (Boonchiangma *et al.*, 2012; Jianhua Cheng *et al.*, 2009; Kyu Bong Kim *et al.*, 2006; Qing Xiang Zhou *et al.*, 2008; Yan Ding *et al.*, 2004; Xi Yu *et al.*, 2012; Zuccari y Vassilieff, 1997), DAD (Tsochatzis *et al.*, 2010), a longitudes de onda de 210 a 266, de masas (Zanella *et al.*, 2013) y de fluorescencia, luego de fotoirradiación en línea (López-López *et al.*, 2001)

Se optó por utilizar una columna C-18 Accucore XL de Thermo Scientific de 150 x 4.6 mm, 4 um, al ser una columna de centro sólido de una alta resolución, superior a las columnas C-18 tradicionales. Como fases móviles se probarán mezclas de metanol/acetonitrilo/agua, para obtener la mejor cromatografía posible. Para la detección se utilizará un detector de arreglo de diodos, con longitud de onda de monitoreo a establecer entre los 200 y 280 nm, intentando obtener una máxima intensidad de la señal, con el menor ruido de fondo posible.

5.3.1.4.3 Azametifós

Para la separación de azametifos principalmente se ha utilizado HPLC en fase reversa, utilizando columnas C-18 (Aulakh *et al.*, 2005; Pfenning *et al.*, 1999; Rawn *et al.*, 2009; Zanella *et al.*, 2013). Las fases móviles utilizadas son mezclas de Acetonitrilo/Agua (Aulakh *et al.*, 2005; Pfenning *et al.*, 1999).

La detección se realiza utilizando detectores de fluorescencia (Pfenning *et al.*, 1999), Uv-vis (Aulakh *et al.*, 2005), de masas (Carro *et al.*, 2013; Rawn *et al.*, 2009; Zanella *et al.*, 2013)

Se optó por utilizar una columna C-18 Accucore XL de Thermo Scientific de 150 x 4.6 mm, 4 um, al ser una columna de centro sólido de una alta resolución, superior a las columnas C-18 tradicionales. Como fases móviles se probarán mezclas de metanol/acetonitrilo/agua, para obtener la mejor cromatografía posible. Para la detección se utilizará un detector de fluorescencia, con longitudes de onda de excitación y emisión de 230 nm y 345 nm, respectivamente, tal como aparece en el trabajo



de Pfenning *et al.* (1999), la elección de este detector se debe a la mayor sensibilidad y especificidad que tiene con respecto al detector UV-vis.

5.3.1.4.4 Diflubenzurón

Para la separación de diflubenzurón principalmente se ha utilizado HPLC en fase reversa, mediante diversas columnas cromatográficas, en su gran mayoría son C-8 (T. Tomšej and J. Hajsšlová, 1995) y C-18 (Luvizotto-Santos *et al.*, 2009; Martínez-Galera *et al.*, 2001; Miliadis *et al.*, 1999; Saraji and Tansazan, 2009; Tfouni *et al.*, 2013; Zhou Q *et al.*, 2013). Las fases móviles mayormente utilizadas son mezclas de Metanol/Agua (Balnova, 1998; Martínez-Galera *et al.*, 2001; Miliadis *et al.*, 1999; T. Tomšej and J. Hajsšlová, 1995; Jiaheng Zhang *et al.*, 2012), Metanol/Agua/Ácido Trifluoroacético (Luvizotto-Santos *et al.*, 2009) y Acetonitrilo/Agua (De la Colina *et al.*, 1994; Ferrer *et al.*, 1997; Tfouni *et al.*, 2013), Metanol/Buffer fosfato (Saraji and Tansazan, 2009; Zhou Q *et al.*, 2013), Acetonitrilo/Metanol/Buffer fosfato (Rodríguez *et al.*, 1999), Acetonitrilo/agua/ácido orto fosfórico (Dommarco *et al.*, 1998).

La detección se realiza utilizando detectores UV-vis a 240-254 nm (Balnova, 1998; Dommarco *et al.*, 1998; Jiaheng Zhang *et al.*, 2012; Zhou Q *et al.*, 2013), de arreglo de diodos a 237-280 nm (De la Colina *et al.*, 1994; Ferrer *et al.*, 1997; Luvizotto-Santos *et al.*, 2009; Miliadis *et al.*, 1999; Rodríguez *et al.*, 1999; Saraji and Tansazan, 2009; Tfouni *et al.*, 2013; T. Tomšej and J. Hajsšlová, 1995), de fluorescencia con foto irradiación en línea (Gil García *et al.*, 2006; Martínez-Galera *et al.*, 2001), de masas (Bedendo *et al.*, 2012; Ferrer *et al.*, 1997; Carro *et al.*, 2012; Guoqiang Chen *et al.*, 2011; Gilbert-López *et al.*, 2010; Lesueur *et al.*, 2008; Mayer-Helm, *et al.*, 2008; Sung Woo Lee *et al.*, 2011).

Se optó por utilizar una columna C-18 Accucore XL de Thermo Scientific de 150 x 4.6 mm, 4 um, al ser una columna de centro sólido de una alta resolución, superior a las columnas C-18 tradicionales. Como fases móviles se probarán mezclas de metanol/acetonitrilo/agua con y sin TFA, para obtener la mejor cromatografía posible. Para la detección se utilizará un detector de arreglo de diodos, con longitud de onda de monitoreo a establecer entre los 200 y 280 nm, intentando obtener una máxima intensidad de la señal, con el menor ruido de fondo posible.

5.4. Modificaciones/confirmación de protocolos

Durante la implementación de los métodos analíticos para Cipermetrina, Deltametrina, Azametifós y Diflubenzurón, se realizaron algunas modificaciones a los protocolos originales.

Las modificaciones para las técnicas de Azametifós y Diflubenzurón fueron menores, sin embargo para las técnicas de Cipermetrina y Deltametrina fueron mayores, debido a que los cromatogramas de los extractos aparecían muy sucios, lo que es debido principalmente a que la matriz en estudio es muy sucia, y a que la longitud de onda máxima de detección de los analitos se encuentra entre 200 y



210 nm, longitudes a las que se observa una gran cantidad de contaminantes. El protocolo final de los procedimientos, se puede observar en el **Anexo 4**.

5.5. Validación de las metodologías propuestas

5.5.1 Evaluación de Especificidad

Azametifos:

Para el caso de Azametifos, se demostró la especificidad determinando un tiempo de retención de 5,7 minutos, con una desviación estándar de 0,1 minutos. Al realizar el ensayo con 10 muestras blanco, se demuestra la ausencia de interferentes de importancia en los tiempos de retención de Azametifos en choritos (**Anexo 5**).

Diflubenzuron:

Para el caso de Diflubenzuron, se demostró la especificidad determinando un tiempo de retención de 7,6 minutos, con una desviación estándar de 0,1 minutos. Al realizar el ensayo con 10 muestras blanco, se demuestra la ausencia de interferentes de importancia en los tiempos de retención de Diflubenzuron en choritos. (**Anexo 6**).

Cipermetrina:

Para el caso de Cipermetrina, la especificidad es más compleja que para los otros analitos estudiados, ya que en las condiciones cromatográficas realizadas, presenta cuatro isómeros, con los siguientes tiempos de retención y desviaciones estándar:

- Isómero 1: 19,2 minutos (Desviación estándar: 0.2 minutos)
- Isómero 2: 19,5 minutos (Desviación estándar: 0.2 minutos)
- Isómero 3: 20,6 minutos (Desviación estándar: 0.2 minutos)
- Isómero 4: 21,3 minutos (Desviación estándar: 0.2 minutos)

Al realizar el ensayo de 10 muestras blanco, se demuestra la ausencia de interferentes de importancia en los tiempos de retención de los isómeros de Cipermetrina en Choritos (**Anexo 7**).

Deltametrina:

Para el caso de Deltametrina, se demostró la especificidad determinando un tiempo de retención de 22,1 minutos, con una desviación estándar de 0,3 minutos. Al realizar el ensayo con 10 muestras blanco, se demuestra la ausencia de interferentes de importancia en los tiempos de retención de Deltametrina en choritos. (**Anexo 7**).



5.5.2 Evaluación de Linealidad

Azametifos:

Para el caso de Azametifos, se demostró linealidad entre 20 y 400 ng/ml con un r^2 de 0,997 y gráfico de residuales. Los resultados pueden verse en detalle en el informe de validación de Azametifos en mitílicos (**Anexo 5**).

Diflubenzuron:

Para el caso de Diflubenzuron, se demostró linealidad entre 192 y 3840 ng/ml, con un r^2 de 0,999 y gráfico de residuales. Los resultados pueden verse en detalle en el informe de validación de Diflubenzuron en mitílicos (**Anexo 6**).

Cipermetrina:

Se demostró linealidad de Cipermetrina entre 52 y 520 ng/ml, con un r^2 de 0.995 y gráfico de residuales. Los resultados pueden observarse en detalle en el informe de validación de Cipermetrina-Deltametrina en mitílicos (**Anexo 7**).

Deltametrina:

Se demostró linealidad de Deltametrina entre 30 y 300 ng/ml, con un r^2 de 0.992 y gráfico de residuales. Los resultados pueden observarse en detalle en el informe de validación de Cipermetrina-Deltametrina en mitílicos (**Anexo 7**).

5.5.3 Recuperación (% recuperación):

Azametifos:

Se estudió la Recuperación en tres días con fracciones de masa de 100, 200 y 400 ng/g, realizando 6 réplicas cada día, los resultados se detallan en la tabla N°1:

Tabla 1.
Recuperación de Azametifos

Recuperación promedio	CV%	Límite para el intervalo de alerta +/- (2DS)	Límite para el intervalo de acción +/- (3DS)
81.4%	8.2%	68.1% - 94.7%	61.4% - 101.4%

Los resultados en detalle se pueden observar en el informe de validación de Azametifos en mitílicos (Anexo 5).



Diflubenzuron:

Se estudió la Recuperación en tres días con fracciones de masa de 1000, 2000 y 4000 ng/g, realizando 6 réplicas cada día, los resultados se detallan en la tabla 2:

Tabla 2.
Recuperación de Diflubenzuron

Recuperación promedio	CV%	Límite para el intervalo de alerta +/- (2DS)	Límite para el intervalo de acción (3DS)
104.9%	4.0%	96.5% - 113.3%	92.3% - 117.6%

Los resultados en detalle se pueden observar en el informe de validación de Diflubenzuron en mitílidos (**Anexo 6**).

Cipermetrina:

Se estudió la Recuperación en tres días con fracciones de masa de 104, 208 y 416 ng/g, realizando 6 réplicas cada día, los resultados se detallan en la tabla N° 3:

Tabla 3.
Recuperación de Cipermetrina.

Recuperación promedio	CV%	Límite para el intervalo de alerta +/- (2DS)	Límite para el intervalo de acción (3DS)
45,1%	8.9%	53.1% - 37.0%	57.2% - 33.0%

Los resultados en detalle se pueden observar en el informe de validación de Cipermetrina-Deltametrina en mitílidos (**Anexo 7**).

Deltametrina:

Se estudió la Recuperación en tres días con fracciones de masa de 60, 120 y 240 ng/g, realizando 6 réplicas cada día, los resultados se detallan en la tabla N° 4:

Tabla 4.
Recuperación de Deltametrina.

Recuperación promedio	CV%	Límite para el intervalo de alerta +/- (2DS)	Límite para el intervalo de acción (3DS)
56,3%	5.7%	67.7% - 44.8%	73.5% - 39.1%

Los resultados en detalle se pueden observar en el informe de validación de Cipermetrina-Deltametrina en mitílidos (**Anexo 7**).



5.5.4 Exactitud

Por lo expuesto en 4.4.5, este procedimiento no aplica.

5.5.5 Precisión

Repetibilidad

Azametifos

Se estudió la repetibilidad en tres días con fracciones de masa de 100, 200 y 400 ng/g, realizando 6 réplicas en cada nivel de cada día, los resultados se detallan en la tabla N° 5:

Tabla 5.

Repetibilidad descrita para el analito Azametifos expresada como coeficiente de variación porcentual (CV%).

Día	CV% Día	CV% 100 ng/g	CV% 200 ng/g	CV% 400 ng/g
1	8.8%	7.6%	7.1%	7.8%
2	6.4%	8.3%	1.6%	2.3%
3	7.7%	9.5%	2.9%	3.9%

Los resultados en detalle se pueden observar en el informe de validación de Azametifos en mitílidos (**Anexo 5**).

Diflubenzuron

Se estudió la repetibilidad en tres días con fracciones de masa de 1000, 2000 y 4000 ng/g, realizando 6 réplicas en cada nivel de cada día, los resultados se detallan en la tabla N° 6:

Tabla 6.

Repetibilidad descrita para el analito Diflubenzuron expresada como coeficiente de variación porcentual (CV%).

Día	CV% Día	CV% 1000 ng/g	CV% 2000 ng/g	CV% 4000 ng/g
1	4.9%	4.2%	2.3%	2.4%
2	3.9%	2.2%	1.5%	0.9%
3	2.8%	2.2%	1.3%	1.6%

Los resultados en detalle se pueden observar en el informe de validación de Azametifos en mitílidos (**Anexo 6**).



Cipermetrina

Se estudió la repetibilidad en tres días con fracciones de masa de 104, 208 y 416 ng/g, realizando 6 réplicas en cada nivel de cada día, los resultados se detallan en la tabla N° 7:

Tabla 7.

Repetibilidad descrita para el analito Cipermetrina expresada como coeficiente de variación porcentual (CV%).

Día	CV% Día	CV% 104 ng/g	CV% 208 ng/g	CV% 416 ng/g
1	9.8%	7.1%	10.5%	7.8%
2	9.3%	8.9%	7.6%	4.4%
3	8.6%	4.2%	7.1%	7.6%

Los resultados en detalle se pueden observar en el informe de validación de Cipermetrina-Deltametrina en mitílicos (**Anexo 7**).

Deltametrina

Se estudió la repetibilidad en tres días con fracciones de masa de 60, 120 y 240 ng/g, realizando 6 réplicas en cada nivel de cada día, los resultados se detallan en la tabla N° 8:

Tabla 8.

Repetibilidad descrita para el analito Deltametrina expresada como coeficiente de variación porcentual (CV%).

Día	CV% Día	CV% 60 ng/g	CV% 120 ng/g	CV% 240 ng/g
1	10.1%	4.4%	1.8%	4.3%
2	11.1%	3.6%	2.2%	7.3%
3	9.3%	4.8%	4.0%	4.2%

Los resultados en detalle se pueden observar en el informe de validación de Cipermetrina-Deltametrina en mitílicos (**Anexo 7**).

Precisión intermedia

Azametifos

Se estudió la precisión intermedia en tres días con fracciones de masa de 100, 200 y 400 ng/g, realizando 6 réplicas en cada nivel cada día, los resultados se detallan en la tabla N° 9.

Tabla 9.

Precisión intermedia de Azametifos expresada como coeficiente de variación porcentual (CV%).

CV% Total	CV% 100 ng/g	CV% 200 ng/g	CV% 400 ng/g
8.2 %	8.5%	5.8%	6.3%



Los resultados en detalle se pueden observar en el informe de validación de Azametifos en mitílicos (**Anexo 5**).

Diflubenzuron

Se estudió la precisión intermedia en tres días con fracciones de masa de 1000, 2000 y 4000 ng/g, realizando 6 réplicas en cada nivel cada día, los resultados se detallan en la tabla N° 10.

Tabla 10.

Precisión intermedia de Diflubenzuron expresada como coeficiente de variación porcentual (CV%).

CV% Total	CV% 1000 ng/g	CV% 2000 ng/g	CV% 4000 ng/g
4.0 %	3.0%	1.9%	3.2%

Los resultados en detalle se pueden observar en el informe de validación de Diflubenzuron en mitílicos (**Anexo 6**).

Cipermetrina

Se estudió la precisión intermedia en tres días con fracciones de masa de 104, 208 y 416 ng/g, realizando 6 réplicas en cada nivel cada día, los resultados se detallan en la tabla N° 11.

Tabla 11.

Precisión intermedia de Cipermetrina expresada como coeficiente de variación porcentual (CV%).

CV% Total	CV% 104 ng/g	CV% 208 ng/g	CV% 416 ng/g
8.9 %	7.2%	9.1%	7.2%

Los resultados en detalle se pueden observar en el informe de validación de Cipermetrina-Deltametrina en mitílicos (**Anexo 7**).

Deltametrina

Se estudió la precisión intermedia en tres días con fracciones de masa de 60, 120 y 240 ng/g, realizando 6 réplicas en cada nivel cada día, los resultados se detallan en la tabla N° 12.

Tabla 12.

Precisión intermedia de Deltametrina expresada como coeficiente de variación porcentual (CV%).

CV% Total	CV% 60 ng/g	CV% 120 ng/g	CV% 240 ng/g
10.2 %	4.5%	4.5%	5.2%

Los resultados en detalle se pueden observar en el informe de validación de Cipermetrina-Deltametrina en mitílicos (**Anexo 7**).



5.5.6 Límite de detección (LD)

Azametifos

El LD establecido para Azametifos es de 50 ng/g, que es la fracción de masa más baja ensayada, que está sobre el LD calculado. Los resultados en detalle, se pueden observar en el **anexo 5**.

Diflubenzuron

El LD establecido para Diflubenzuron es de 480 ng/g, que es la fracción de masa más baja ensayada, que está sobre el LD calculado. Los resultados en detalle, se pueden observar en el **anexo 6**.

Cipermetrina

El LD para Cipermetrina es de 21.3 ng/g. Los resultados en detalle, se pueden observar en el informe de validación de Cipermetrina-Deltametrina en mitílicos (**Anexo 7**).

Deltametrina

El LD para Deltametrina es de 20 ng/g. Los resultados en detalle, se pueden observar en el informe de validación de Cipermetrina-Deltametrina en mitílicos (**Anexo 7**).

5.5.7 Límite de cuantificación (LC)

Azametifos

El LC establecido para Azametifos es de 100 ng/g, que es la fracción de masa más baja ensayada, que está sobre el LC calculado. Los resultados en detalle, se pueden observar en el anexo 5.

Diflubenzuron

El LC establecido para Diflubenzuron es de 480 ng/g, que es la fracción de masa más baja ensayada, que está sobre el LC calculado. Los resultados en detalle, se pueden observar en el anexo 6.

Cipermetrina

El LC establecido para Cipermetrina es de 73.4 ng/g. Los resultados en detalle, se pueden observar en el informe de validación de Cipermetrina-Deltametrina en mitílicos (Anexo 7).



Deltametrina

El LC establecido para Deltametrina es de 60 ng/g. Los resultados en detalle, se pueden observar en el informe de validación de Cipermetrina-Deltametrina en mitílidos (Anexo 7).

5.5.8 Robustez

Tal como se mencionó anteriormente, durante el desarrollo del presente proyecto, no se realizó un cálculo de robustez propiamente tal, sino que se utilizó el coeficiente de variación total de la recuperación (al ser realizada en tres días diferentes, con reactivos de extracción y componentes de fase móvil preparados diariamente) para dar una indicación de la robustez de los métodos. Estos resultados están señalados previamente en el presente informe.

5.6. Revalidación de Diflubenzuron

Tal como se mencionó anteriormente, debido a que los niveles de Diflubenzurón obtenidos en los ensayos en condiciones controladas, fueron inferiores a 1000 ppb, fue necesario revalidar la técnica a niveles inferiores.

5.6.1 Evaluación de Especificidad

Esta evaluación no fue necesario realizarla nuevamente.

5.6.2 Evaluación de Linealidad

Se demostró linealidad entre 25 y 500 ng/ml, con un r^2 de 0,999 y gráfico de residuales. Los resultados pueden verse en detalle en informe de resultados experimentales de revalidación de Diflubenzuron en mitílidos (**Anexo 8**).

5.6.3 Recuperación (% recuperación):

Se estudió la Recuperación en tres días con fracciones de masa de 100, 200 y 400 ng/g, realizando 6 réplicas cada día, los resultados se detallan en la tabla 13:

Tabla 13.
Recuperación de Diflubenzuron

Recuperación promedio	CV%	Límite para el intervalo de alerta +/- (2DS)	Límite para el intervalo de acción (3DS)
101,1%	5.3%	90.3% - 111.9%	85.0% - 117.3%



Los resultados pueden verse en detalle en el informe de revalidación de Diflubenzuron en mitílidos (**Anexo 8**).

5.6.4 Precisión

Repetibilidad

Se estudió la repetibilidad en tres días con fracciones de masa de 100, 200 y 400 ng/g, realizando 6 réplicas en cada nivel de cada día, los resultados se detallan en la tabla N° 14:

Tabla 14.

Repetibilidad descrita para el analito Diflubenzuron expresada como coeficiente de variación porcentual (CV%).

Día	CV% Día	CV% 100 ng/g	CV% 200 ng/g	CV% 400 ng/g
1	4.5%	6.8%	1.9%	1.8%
2	4.3%	4.4%	2.2%	1.1%
3	3.9%	3.2%	2.2%	3.8%

Los resultados pueden verse en detalle en el informe de revalidación de Diflubenzuron en mitílidos (**Anexo 8**).

Precisión intermedia

Se estudió la precisión intermedia en tres días con fracciones de masa de 100, 200 y 400 ng/g, realizando 6 réplicas en cada nivel cada día, los resultados se detallan en la tabla N° 15.

Tabla 15.

Precisión intermedia de Diflubenzuron expresada como coeficiente de variación porcentual (CV%).

CV% Total	CV% 100 ng/g	CV% 200 ng/g	CV% 400 ng/g
5.3 %	7.9%	4.2%	2.5%

Los resultados en detalle se pueden observar en el informe de revalidación de Diflubenzuron en mitílidos (**Anexo 8**).



5.6.5 Límite de detección (LD)

El LD establecido para Diflubenzuron es de 100 ng/g, que es la fracción de masa más baja ensayada, que está sobre el LD calculado. Los resultados en detalle, se pueden observar en el **anexo 8**.

5.6.6 Límite de cuantificación (LC)

El LC establecido para Diflubenzuron es de 100 ng/g, que es la fracción de masa más baja ensayada, que está sobre el LC calculado. Los resultados en detalle, se pueden observar en el **anexo 8**.

Objetivo 3: *Evaluar la capacidad de bioacumulación, excreción y/o metabolización de mitílicos frente a la exposición a productos terapéuticos de uso en la salmonicultura bajo condiciones controladas, de al menos 4 principios activos.*

5.7. Evaluación de riesgo de exposición y de detección de residuos de los productos terapéuticos seleccionados en el producto final de mitilicultura

La guía VICH GL6 entrega la primera fase del proceso (Fase I), el cual consiste en evaluar la potencial exposición del medio ambiente al producto veterinario a utilizar. La Fase I hace uso del árbol de decisiones. La metodología para utilizar este árbol es a través de preguntas que permite llevar un proceso ordenado hasta llegar a una pregunta final que admita concluir que el producto veterinario califica para la Fase siguiente (**Figura 5**).

En la **Figura 5** se muestra el proceso previo mediante el cual se evalúa la factibilidad de que el producto farmacológico pueda ser investigado como un posible agente contaminante del medio acuícola. Para efecto del presente proyecto, este proceso se utilizó para evaluar la factibilidad de que los antiparasitarios estudiados, puedan ser encontrados en concentraciones que puedan afectar las características de inocuidad alimentaria en los choritos.

La guía VICH GL38 detalla la segunda parte de este proceso (Fase II) de evaluación. Se debe tener en cuenta que este documento es solo una guía, por lo que la ejecución del proceso no debe ser rígida, sino que debe hacer y tener una información mínima necesaria. Cada caso tiene que ser considerado por sus propios méritos, y si en una circunstancia particular existiese un enfoque alternativo, por ejemplo, que se considere que el uso de datos publicados en la literatura es más apropiado, la investigación puede desviarse hacia ese camino.

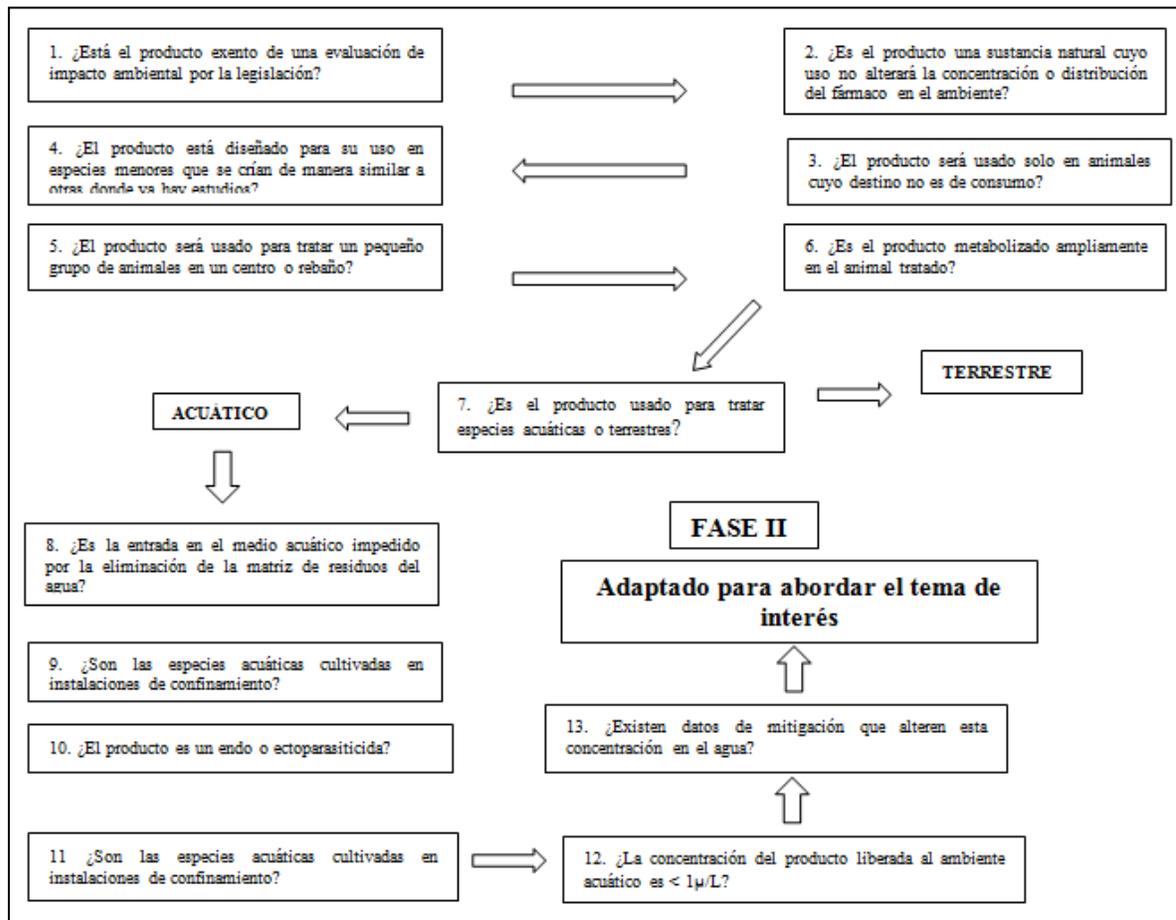


Figura 5. Árbol de decisión para la evaluar el posible impacto ambiental de un producto veterinario en el ámbito acuícola.

El campo de la ecotoxicología es una ciencia compleja y existen deficiencias en los datos y en conocimiento. A pesar de esto, las recomendaciones se basan en la objetividad, por lo que la máxima cantidad de información debe ser extraída de cada estudio para lograr un entendimiento de la posibilidad de que un producto veterinario pueda afectar al medio ambiente.

Al analizar la presencia de Cipermetrina, Deltametrina y Azametifós luego de una hora de realizado el tratamiento con baño de estos antiparasitarios, dio como resultados “no detectado”. Esto puede deberse a que el tiempo de exposición y la concentración terapéutica de los antiparasitarios, de acuerdo a lo señalado previamente por el estudio, es muy baja para ser detectada en estas condiciones en mitílidos:



- Cipermetrina: 15 ug/L por 30 minutos.
- Deltametrina: 3 ug/L por 40 minutos.
- Azametifos: 100 ug/L por 60 minutos.

Al contestar la pregunta 12 del árbol de decisión (**Figura 5**), pese a que las concentraciones de los antiparasitarios utilizados son mayores a 1 ug/L, especialmente en el caso de azametifos, tomando en cuenta los resultados analíticos obtenidos, se determina que el riesgo de encontrar residuos de éstos antiparasitarios es mínimo, ya que al tratar los choritos con una concentración muy superior a la que podrían estar expuestos los choritos, como se justifica más adelante, no es posible detectar residuos de éstos.

Cabe señalar, que pese a que está descrita la acumulación de Cipermetrina en mitílidos (Gowland *et al.*, 2002), ésta se realiza a concentraciones mayores y con un tiempo de exposición mayores a las utilizadas en los tratamientos en salmones. Ellos concluyen que difícilmente, esta bioacumulación puede producirse en la naturaleza.

En el año 2004 se publicó un trabajo (Medina *et al.*, 2004) analizando el efecto de cipermetrina en comunidades de plancton marino utilizando mesocosmos. Ellos encuentran que inmediatamente aplicada cipermetrina a la columna de agua, reduce la densidad y biodiversidad del plancton. La cual luego de un tiempo se recupera en su densidad, no así en su biodiversidad. Sin embargo concluyen que en un ambiente abierto, el pesticida se disipa rápidamente, por lo que las comunidades de zooplancton no se verían afectadas.

Posteriormente el año 2005 (Willis *et al.*, 2005) se demostró en un estudio realizado en un lago escocés, que el tratamiento con cipermetrina no produce efectos en la comunidad de zooplancton. En un estudio reciente realizado por el Departamento de Salud Hidrobiológica del IFOP (Instituto de Fomento Pesquero, 2014), en relación a un estudio en terreno para detectar concentraciones del principio activo azametifós en agua, se realizaron tomas de muestras a dos profundidades en transectos de 10 metros hasta 50 metros a favor de la corriente. Los resultados del muestreo indican que, a distancias iguales o mayores de 40 metros el analito no fue detectado. En el marco del mismo estudio se generó un modelo de dispersión de partículas, que señalaría que a distancias mayores de 100 metros no se detectaría principio activo.

En el caso de diflubenzurón, pese a que es posible detectar residuos del antiparasitario en los choritos, la concentración de éste el primer día de muestreo es inferior al LMR determinado para salmones por el Sernapesca (FAR-MP1, 2013) y el Ministerio de Salud (Resolución 551 exenta, 19 de Agosto 2014) que es de 1000 ppb (ug/Kg).

A lo anteriormente expuesto hay que agregar que en un estudio realizado sobre el efecto de benzoato de emamectina en el ambiente marino (Telfer *et al.*, 2006), que aunque se utiliza a concentraciones menores que el Diflubenzurón (120 veces menos), al medir la concentración del antiparasitario una semana post-tratamiento en choritos colgados a 2 profundidades (5 y 15 metros) a distancias de 10, 25 y 50 metros de las jaulas a favor y en contra de la corriente, sólo fue posible



detectar emamectina en muestras pero bajo el límite de cuantificación, que es 1 ppb (valor 100 veces menos que nuestro LD y LC de Diflubenzurón). Al repetir la experiencia 1 mes post-tratamiento, solo fue posible detectarlo en los choritos ubicados a 10 metros a favor de la corriente, también bajo el límite de detección.

Debido a lo anteriormente expuesto es improbable encontrar concentraciones de Diflubenzurón superiores al LMR de 1000 ppb luego de un tratamiento de peces con este antiparasitario.

5.8. Desarrollo de estudios de bioacumulación, depleción, excreción y metabolización de los productos terapéuticos seleccionados bajo condiciones controladas en mitílidos

Los protocolos de estudio para obtener las curvas de depleción de cipermetrina, deltametrina, azametifós y Diflubenzurón *M. chilensis* fueron realizados de acuerdo a lo indicado en el punto 4.6.

5.9. Evaluación de estudios de bioacumulación, excreción y metabolización de los productos terapéuticos seleccionados en condiciones controladas

En el Laboratorio de Química Analítica de IFOP en Puerto Montt se realizaron los análisis de Cipermetrina, Deltametrina, Azametifos y Diflubenzuron en las muestras de partes blandas de mitílidos obtenidas, con los siguientes resultados:

5.9.1 Cipermetrina:

Tal como se mencionó anteriormente, en el primer muestreo (1 hora post-tratamiento), no fue posible detectar el analito, por lo que se concluye que si en las condiciones de la experiencia (concentración utilizada y tiempo de exposición de los choritos) que es una concentración de cipermetrina extremadamente superior a la que podrían verse enfrentados los mitílidos en la realidad, en este último caso, la probabilidad de detectar el antiparasitario es mínima.

Hay que tener en cuenta que la metodología utilizada y validada tiene un límite de detección y cuantificación de 21 y 73 ppb, respectivamente. El LMR para Cipermetrina en salmones es de 50 ppb para el mercado chileno y la comunidad europea, y de 30 ppb para el mercado japonés. Por ende, si los choritos hubieran tenido 30 ppb (mercado más exigente), no lo habríamos podido cuantificar, pero si detectar. Debido a los resultados obtenidos, no fue posible realizar una curva de depleción.

Los cromatogramas de los resultados de las muestras se pueden observar en el **anexo 9**.



5.9.2 Deltametrina:

Al igual que el caso anterior, en el primer muestreo (1 hora post-tratamiento), no fue posible detectar el analito. Las conclusiones son similares al caso anterior.

En este caso la metodología utilizada y validada tiene un límite de detección y cuantificación de 20 y 60 ppb, respectivamente. El LMR para Cipermetrina en salmones es de 30 ppb para el mercado chileno y japonés, y de 10 ppb para la comunidad europea. Por ende, sólo podríamos detectar la concentración para cumplir con los mercados menos exigentes. En consecuencia no fue posible realizar una curva de depleción.

Los cromatogramas de los resultados de las muestras se pueden observar en el anexo 9.

5.9.3 Azametifós:

Al analizar las muestras obtenidas del primer tiempo de muestreo, no se detectó la presencia del analito, por lo que se concluye, al igual que para los piretroides, que la probabilidad de detectar la presencia de azametifós en la naturaleza es mínima. Del mismo modo, al igual que para los piretroides, no fue posible la realización de una curva de depleción.

Los cromatogramas de los resultados de las muestras se pueden observar en el anexo 9.

5.9.4 Diflubenzurón:

En el caso de Diflubenzurón, único antiparasitario estudiado administrado por vía oral, sí fue posible detectar el analito en las partes blandas de los choritos. En otras palabras, hubo bioacumulación de Diflubenzurón en los ejemplares de choritos.

Sin embargo, las concentraciones obtenidas en el primer muestreo fueron inferiores a 1000 ppb, debido a lo cual hubo que realizar el estudio realizando una curva de calibración de solución estándar con concentraciones más bajas, y fortificados de 114 ppb. Los resultados de recuperación fueron similares a los obtenidos en la validación original, por lo que se calcularon las muestras con esta curva de calibración, como límite de detección y cuantificación se determinó el valor de 114 ppb. Los cromatogramas de los resultados de las muestras se pueden observar en el anexo 9.

Curva de depleción de Diflubenzurón

Para la confección de la curva de depleción de Diflubenzurón, se siguió el criterio de la Comunidad Europea (EMEA, 1995) que considera que deben utilizarse todos los datos obtenidos, incluyendo los que estén bajo el límite de detección (LD) y cuantificación (LC). Como los datos bajo el límite de detección y cuantificación no son numéricos ("menor a"), el valor que se le asigna es la mitad del



límite respectivo. Cuando en un tiempo de muestreo, la mayoría de los valores son menores al LC y LD, el punto se elimina.

En el Laboratorio se realizó la determinación de Diflubenzurón en la matriz partes blandas del chorito con la metodología anteriormente validada utilizando un sistema de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD). El límite de detección y cuantificación de Diflubenzurón fue de 480 ng/g, pero debido a que las muestras presentaron concentraciones inferiores, éstas fueron analizadas con fortificados a 114 ng/g y utilizando una curva de calibración de concentración más baja, por lo que se determinó como límite de detección y cuantificación 114 ng/g. Por ende, en los casos en que se obtuvo un valor inferior, se le asignó el valor de 57ppb. Los resultados de concentración de Diflubenzurón en partes blandas de choritos de los 3 estanques y el logaritmo natural (Ln) de estas, se pueden ver en las **Tablas 16, 17 y 18**. Los cromatogramas se pueden observar en el **Anexo 9**.

Se realizó una curva de depleción combinada del logaritmo natural (Ln) de la concentración de Diflubenzurón en las partes blandas de los choritos vs días post-tratamiento de los tres estanques (**Figura 6**). Se confeccionó una curva de normalidad de frecuencia de residuos estándar acumulada de la curva (**Figura 7**), y se realizó un test de Shapiro-Wilk de normalidad. Para que se acepte la normalidad de los residuos, y por ende la curva de calibración, el test debe dar una significancia mayor a 0.05.

Tabla 16.
Resultados Diflubenzurón, estanque 1.

Nº Muestra	Días post dosis	DFB ug/Kg	Ln
T1 1-1	1	259,0	5,556835275
T1 1-2	1	182,8	5,208562066
T1 1-3	1	205,2	5,323889652
T1 1-4	1	326,5	5,788545009
T1 1-5	1	303,5	5,715485057
T1 1-6	1	283,8	5,648169258
T1 1-7	1	252,2	5,530346625
T1 1-8	1	414,1	6,026201372
T1 1-9	1	357,1	5,878033277
T1 1-10	1	477,9	6,169366467



Tabla 17.
Resultados Diflubenzurón, estanque 2.

Nº Muestra	Días post dosis	DFB ug/Kg	Ln
T1 2-1	1	478,9	6,171555399
T1 2-2	1	461,8	6,135196635
T1 2-3	1	424,9	6,051902666
T1 2-4	1	770,1	6,646474761
T1 2-5	1	445,8	6,099831702
T1 2-6	1	430,8	6,065652412
T1 2-7	1	694,9	6,543778651
T1 2-8	1	512,8	6,239848457
T1 2-9	1	593,3	6,385740054
T1 2-10	1	564,2	6,335478398
T2 2-1	2	147,9	4,996859593
T2 2-2	2	114,0	4,736198448
T2 2-3	2	57,0	4,043051268
T2 2-4	2	160,2	5,076132606
T2 2-5	2	157,1	5,056664758
T2 2-6	2	166,0	5,111921025
T2 2-7	2	123,2	4,813584938
T2 2-8	2	159,7	5,073137039
T2 2-9	2	167,9	5,123259065
T2 2-10	2	147,8	4,996033009
T3 2-1	5	119,3	4,781700232
T3 2-2	5	57,0	4,043051268
T3 2-3	5	147,8	4,99571208
T3 2-4	5	57,0	4,043051268
T3 2-5	5	131,8	4,881335717
T3 2-6	5	57,0	4,043051268
T3 2-7	5	126,4	4,839667286
T3 2-8	5	57,0	4,043051268
T3 2-9	5	131,4	4,878466527
T3 2-10	5	57,0	4,043051268



Tabla 18.
Resultados Diflubenzurón, estanque 3.

Nº Muestra	Días post dosis	DFB ug/Kg	Ln
T1 3-1	1	275,1	5,616975796
T1 3-2	1	232,7	5,449696549
T1 3-3	1	254,5	5,539486543
T1 3-4	1	249,2	5,518361627
T1 3-5	1	217,6	5,382594512
T1 3-6	1	299,3	5,701486681
T1 3-7	1	315,1	5,753015033
T1 3-8	1	246,9	5,508868183
T1 3-9	1	314,0	5,749277079
T1 3-10	1	283,7	5,6478805
T2 3-1	2	57,0	4,043051268
T2 3-2	2	197,8	5,287252648
T2 3-3	2	167,2	5,119293041
T2 3-4	2	200,1	5,298841344
T2 3-5	2	162,9	5,093064736
T2 3-6	2	189,4	5,243712
T2 3-7	2	158,8	5,067486079
T2 3-8	2	162,1	5,088349096
T2 3-9	2	219,4	5,391101417
T2 3-10	2	260,2	5,561328464
T3 3-1	5	172,6	5,15121261
T3 3-2	5	207,4	5,334693629
T3 3-3	5	129,2	4,861675896
T3 3-4	5	150,1	5,01130401
T3 3-5	5	57,0	4,043051268
T3 3-6	5	157,0	5,056161615
T3 3-7	5	143,0	4,963127037
T3 3-8	5	57,0	4,043051268
T3 3-9	5	161,6	5,085028871
T3 3-10	5	148,4	4,999867161
T4 3-1	9	139,8	4,940374309
T4 3-2	9	57,0	4,043051268
T4 3-3	9	115,6	4,750299843
T4 3-4	9	121,7	4,801509795
T4 3-5	9	147,8	4,995942004
T4 3-6	9	129,3	4,862094233
T4 3-7	9	137,0	4,920274681
T4 3-8	9	121,5	4,799902262
T4 3-9	9	57,0	4,043051268
T4 3-10	9	131,2	4,87650263



En el estanque1, s3lo fue posible utilizar los valores del primer d3a de muestreo. Del estanque 2 se pudo utilizar los 3 primeros muestreos. Por 3ltimo, en el estanque 3 se utilizaron los valores de los cuatro muestreos.

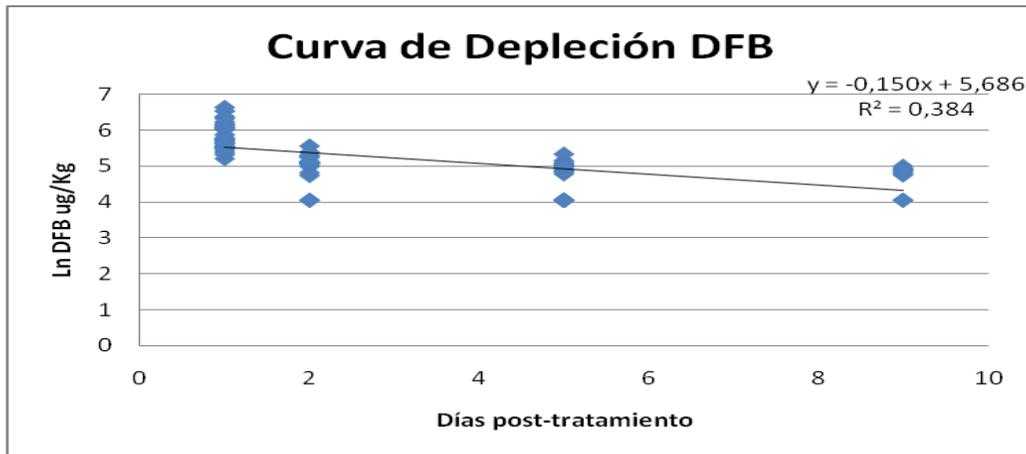


Figura 6. Curva de Depleci3n de Diflubenzur3n. Gráfico de logaritmo natural (Ln) de concentraci3n de Diflubenzur3n (ug/Kg) en partes blandas de chorito vs d3as post-tratamiento.

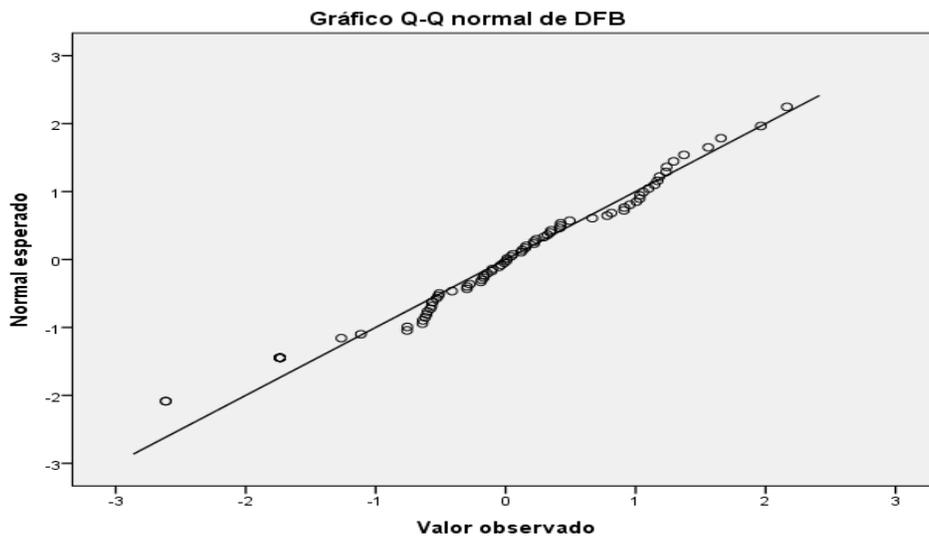


Figura 7. Distribuci3n de frecuencia acumulada de residuos est3ndar de la curva de depleci3n



Al realizar la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk a los residuos estándar de la curva de depleción, se obtiene lo siguiente:

Pruebas de normalidad

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
DFB	,099	80	,053	,973	80	,085

Se demuestra que no hay una desviación de la normalidad (significancia de 0.085), por lo que se puede utilizar esta curva para los posteriores cálculos.

El tiempo de vida media ($T_{1/2}$) se calcula dividiendo 0,693 por la pendiente de la curva de depleción. El valor de $T_{1/2}$ calculado es de 4.6 días.

Para calcular el período de resguardo hay que confeccionar las curvas con un límite de confianza de 95 o 99% superior. En consecuencia, se calcula el Ln de la concentración del LMR (en ug/Kg), luego se debe interpolar en las curvas confeccionadas y ver el tiempo necesario para llegar a dicho valor. Para Diflubenzurón no existe LMR para choritos, sin embargo como hemos señalado en el presente informe, el LMR para salmones es de 1000 ug/Kg. En el primer día de muestreo (1 día post-tratamiento) no se obtienen valores superiores al LMR, por lo que pese a que se pudo realizar una curva de depleción no se puede calcular el período de resguardo, o se podría señalar que éste es de 0 días.

Hay que hacer notar que el r^2 de la curva de depleción no es cercano a 1, por ende la correlación de Ln de concentración de Diflubenzurón vs el tiempo post-tratamiento es baja, lo que puede deberse a que las concentraciones iniciales (día 1 post-tratamiento) es muy baja, lo que trae consigo que de las tres jaulas, solamente en una se pudo medir los cuatro tiempos de muestreo (estanque 3), en un estanque pudo medirse 3 tiempos de muestreo (estanque 3), y en el estanque 1, se pudo medir 1 tiempo de muestreo solamente. Para obtener una mejor curva de depleción habría que hacer muestreos más seguidos e intentar comenzar con una concentración mayor del analito en el chorito. Hay que destacar que las concentraciones obtenidas desde un comienzo son bajas, en ningún momento se logran concentraciones que puedan afectar su inocuidad alimentaria.

5.9.4.1 Evaluación de Bioacumulación y Depleción de Diflubenzurón en Mejillones

Como se ha mencionado anteriormente, se realizó nuevamente el ensayo de Diflubenzurón en condiciones controladas, con la salvedad que se incluyen muestreos durante la medicación, tal como se describió en la sección metodológica. Este ensayo se realizó utilizando como peces Trucha arcoiris, con una densidad de peces (12.3 Kg/m³) mayor a la primera ocasión (8 Kg/m³). Debido a esto se entregó una mayor cantidad de alimento medicado (específicamente más principio activo Diflubenzurón). Otra diferencia significativa con el primer experimento, es que como alimentación de los mejillones no se les agregó suspensión de microalgas, es decir, solamente se alimentaron de los



desechos de los peces y restos de alimentos. En este caso se realizaron mediciones durante la medicación de los peces para analizar el comportamiento de incorporación del antiparasitario en el chorito.

Bioacumulación y depleción de Diflubenzurón (segundo estudio)

En el Laboratorio se realizó la determinación de Diflubenzurón en las partes blandas del chorito. En este caso los cálculos se realizaron con la metodología revalidada, con LD y LC de 100 ng/g. Los resultados de concentración de Diflubenzurón en partes blandas de choritos de los 3 estanques y el logaritmo natural (Ln) de estas, se pueden ver en las **Tablas 19, 20 y 21**. Los cromatogramas se pueden observar en el **Anexo 9**.

Tabla 19.
Resultados Diflubenzurón, estanque 1

Rótulo de Muestra	Día tratamiento	conc obtenida ng/g	Ln
T1 1-1	4	492,8	6,20
T1 1-2	4	481,9	6,18
T1 1-3	4	438,8	6,08
T1 1-4	4	407,4	6,01
T1 1-5	4	296,3	5,69
T1 1-6	4	458,6	6,13
T1 1-7	4	416,8	6,03
T1 1-8	4	414,3	6,03
T1 1-9	4	300,8	5,71
T1 1-10	4	475,6	6,16
T2 1-1	7	680,0	6,52
T2 1-2	7	894,0	6,80
T2 1-3	7	994,2	6,90
T2 1-4	7	794,6	6,68
T2 1-5	7	969,3	6,88
T2 1-6	7	915,9	6,82
T2 1-7	7	917,4	6,82
T2 1-8	7	637,3	6,46
T2 1-9	7	895,2	6,80
T2 1-10	7	1014,4	6,92
T3 1-1	11	709,7	6,56
T3 1-2	11	803,5	6,69
T3 1-3	11	1034,9	6,94
T3 1-4	11	697,6	6,55
T3 1-5	11	657,0	6,49
T3 1-6	11	653,7	6,48
T3 1-7	11	580,1	6,36
T3 1-8	11	611,6	6,42
T3 1-9	11	572,1	6,35
T3 1-10	11	475,5	6,16
T4 1-1	14	512,2	6,24
T4 1-2	14	634,8	6,45



T4 1-3	14	677,2	6,52
T4 1-4	14	630,8	6,45
T4 1-5	14	708,1	6,56
T4 1-6	14	738,1	6,60
T4 1-7	14	844,7	6,74
T4 1-8	14	680,6	6,52
T4 1-9	14	631,5	6,45
T4 1-10	14	535,4	6,28
T5 1-1	15	1013,8	6,92
T5 1-2	15	901,4	6,80
T5 1-3	15	1099,1	7,00
T5 1-4	15	1118,9	7,02
T5 1-5	15	772,6	6,65
T5 1-6	15	1342,7	7,20
T5 1-7	15	806,2	6,69
T5 1-8	15	1035,6	6,94
T5 1-9	15	736,0	6,60
T5 1-10	15	795,8	6,68
T6 1-1	16	624,0	6,44
T6 1-2	16	595,7	6,39
T6 1-3	16	371,0	5,92
T6 1-4	16	513,5	6,24
T6 1-5	16	590,4	6,38
T6 1-6	16	580,4	6,36
T6 1-7	16	624,1	6,44
T6 1-8	16	445,4	6,10
T6 1-9	16	579,0	6,36
T6 1-10	16	560,5	6,33
T7 1-1	17	277,5	5,63
T7 1-2	17	244,7	5,50
T7 1-3	17	273,8	5,61
T7 1-4	17	279,3	5,63
T7 1-5	17	285,6	5,65
T7 1-6	17	332,9	5,81
T7 1-7	17	335,9	5,82
T7 1-8	17	279,1	5,63
T7 1-9	17	300,3	5,70
T7 1-10	17	195,2	5,27
T8 1-1	21	47,7	3,87
T8 1-2	21	65,0	4,17
T8 1-3	21	60,4	4,10
T8 1-4	21	76,6	4,34
T8 1-5	21	56,5	4,03
T8 1-6	21	63,6	4,15
T8 1-7	21	78,1	4,36
T8 1-8	21	48,2	3,88
T8 1-9	21	55,6	4,02
T8 1-10	21	133,3	4,89



Tabla 20.
Resultados Diflubenzurón, estanque 2

Rótulo de Muestra	Día tratamiento	conc obtenida ng/g	Ln
T1 2-1	4	364,8	5,90
T1 2-2	4	439,7	6,09
T1 2-3	4	390,8	5,97
T1 2-4	4	434,2	6,07
T1 2-5	4	491,1	6,20
T1 2-6	4	440,8	6,09
T1 2-7	4	557,3	6,32
T1 2-8	4	458,9	6,13
T1 2-9	4	489,9	6,19
T1 2-10	4	329,0	5,80
T2 2-1	7	440,3	6,09
T2 2-2	7	572,5	6,35
T2 2-3	7	378,1	5,94
T2 2-4	7	504,4	6,22
T2 2-5	7	512,9	6,24
T2 2-6	7	497,6	6,21
T2 2-7	7	541,2	6,29
T2 2-8	7	366,7	5,90
T2 2-9	7	393,9	5,98
T2 2-10	7	663,4	6,50
T3 2-1	11	903,7	6,81
T3 2-2	11	618,9	6,43
T3 2-3	11	673,2	6,51
T3 2-4	11	688,2	6,53
T3 2-5	11	805,2	6,69
T3 2-6	11	848,9	6,74
T3 2-7	11	573,8	6,35
T3 2-8	11	710,2	6,57
T3 2-9	11	739,0	6,61
T3 2-10	11	437,5	6,08
T4 2-1	14	741,2	6,61
T4 2-2	14	919,2	6,82
T4 2-3	14	570,7	6,35
T4 2-4	14	542,3	6,30
T4 2-5	14	627,5	6,44
T4 2-6	14	649,3	6,48
T4 2-7	14	855,9	6,75
T4 2-8	14	681,0	6,52
T4 2-9	14	504,0	6,22
T4 2-10	14	522,9	6,26
T5 2-1	15	1118,2	7,02
T5 2-2	15	664,4	6,50
T5 2-3	15	694,1	6,54
T5 2-4	15	730,9	6,59



T5 2-5	15	454,9	6,12
T5 2-6	15	1097,2	7,00
T5 2-7	15	1032,7	6,94
T5 2-8	15	735,7	6,60
T5 2-9	15	662,5	6,50
T5 2-10	15	721,4	6,58
T6 2-1	16	668,9	6,51
T6 2-2	16	455,5	6,12
T6 2-3	16	503,3	6,22
T6 2-4	16	463,9	6,14
T6 2-5	16	365,2	5,90
T6 2-6	16	624,0	6,44
T6 2-7	16	804,0	6,69
T6 2-8	16	501,7	6,22
T6 2-9	16	416,8	6,03
T6 2-10	16	482,6	6,18
T7 2-1	17	154,9	5,04
T7 2-2	17	179,2	5,19
T7 2-3	17	212,7	5,36
T7 2-4	17	201,0	5,30
T7 2-5	17	155,6	5,05
T7 2-6	17	152,9	5,03
T7 2-7	17	179,3	5,19
T7 2-8	17	199,2	5,29
T7 2-9	17	226,8	5,42
T7 2-10	17	191,6	5,26
T8 2-1	21	193,3	5,26
T8 2-2	21	120,2	4,79
T8 2-3	21	150,2	5,01
T8 2-4	21	73,8	4,30
T8 2-5	21	110,6	4,71
T8 2-6	21	154,5	5,04
T8 2-7	21	122,4	4,81
T8 2-8	21	217,0	5,38
T8 2-9	21	135,1	4,91
T8 2-10	21	121,2	4,80



Tabla 21.
Resultados Diflubenzurón, estanque 3

Rótulo de Muestra	Día tratamiento	conc obtenida ng/g	Ln
T1 3-1	4	408,2	6,01
T1 3-2	4	497,1	6,21
T1 3-3	4	425,1	6,05
T1 3-4	4	294,4	5,68
T1 3-5	4	285,6	5,65
T1 3-6	4	484,9	6,18
T1 3-7	4	411,0	6,02
T1 3-8	4	434,0	6,07
T1 3-9	4	504,2	6,22
T1 3-10	4	352,9	5,87
T2 3-1	7	590,8	6,38
T2 3-2	7	476,0	6,17
T2 3-3	7	431,5	6,07
T2 3-4	7	734,8	6,60
T2 3-5	7	646,4	6,47
T2 3-6	7	574,0	6,35
T2 3-7	7	762,8	6,64
T2 3-8	7	545,8	6,30
T2 3-9	7	576,6	6,36
T2 3-10	7	370,8	5,92
T3 3-1	11	733,4	6,60
T3 3-2	11	461,0	6,13
T3 3-3	11	575,3	6,35
T3 3-4	11	558,3	6,32
T3 3-5	11	610,6	6,41
T3 3-6	11	589,0	6,38
T3 3-7	11	483,6	6,18
T3 3-8	11	464,6	6,14
T3 3-9	11	559,5	6,33
T3 3-10	11	606,9	6,41
T4 3-1	14	342,2	5,84
T4 3-2	14	693,1	6,54
T4 3-3	14	343,7	5,84
T4 3-4	14	452,2	6,11
T4 3-5	14	472,5	6,16
T4 3-6	14	440,2	6,09
T4 3-7	14	383,1	5,95
T4 3-8	14	682,8	6,53
T4 3-9	14	315,6	5,75
T4 3-10	14	414,4	6,03
T5 3-1	15	624,9	6,44
T5 3-2	15	749,0	6,62
T5 3-3	15	526,7	6,27
T5 3-4	15	656,1	6,49
T5 3-5	15	623,8	6,44



T5 3-6	15	862,8	6,76
T5 3-7	15	500,4	6,22
T5 3-8	15	489,9	6,19
T5 3-9	15	844,4	6,74
T5 3-10	15	774,8	6,65
T6 3-1	16	349,0	5,86
T6 3-2	16	417,3	6,03
T6 3-3	16	416,4	6,03
T6 3-4	16	327,3	5,79
T6 3-5	16	420,2	6,04
T6 3-6	16	404,0	6,00
T6 3-7	16	425,9	6,05
T6 3-8	16	410,0	6,02
T6 3-9	16	353,0	5,87
T6 3-10	16	299,1	5,70
T7 3-1	17	208,0	5,34
T7 3-2	17	320,4	5,77
T7 3-3	17	314,3	5,75
T7 3-4	17	207,6	5,34
T7 3-5	17	244,7	5,50
T7 3-6	17	264,0	5,58
T7 3-7	17	394,9	5,98
T7 3-8	17	227,9	5,43
T7 3-9	17	222,2	5,40
T7 3-10	17	293,2	5,68
T8 3-1	21	27,1	3,30
T8 3-2	21	28,3	3,34
T8 3-3	21	12,9	2,56
T8 3-4	21	37,2	3,62
T8 3-5	21	48,6	3,88
T8 3-6	21	36,9	3,61
T8 3-7	21	52,6	3,96
T8 3-8	21	30,5	3,42
T8 3-9	21	79,7	4,38
T8 3-10	21	-2,4	-

Los días 1 al 14, correspondieron a los días dónde se alimentaron los peces con Diflubenzurón, el día 15 es el primer día post-tratamiento. Este último día en particular (15) puede considerarse como el primer día de depleción del fármaco, pero también puede considerarse como el último día de bioacumulación, correspondiendo con la mayor concentración. Al calcular en cada estanque, el valor promedio de Diflubenzurón de cada día, y a su vez sacando el promedio de los estanques (3 réplicas) con sus respectivas desviaciones estándares, se puede confeccionar el gráfico de bioacumulación-depleción de Diflubenzurón (Fig 8).

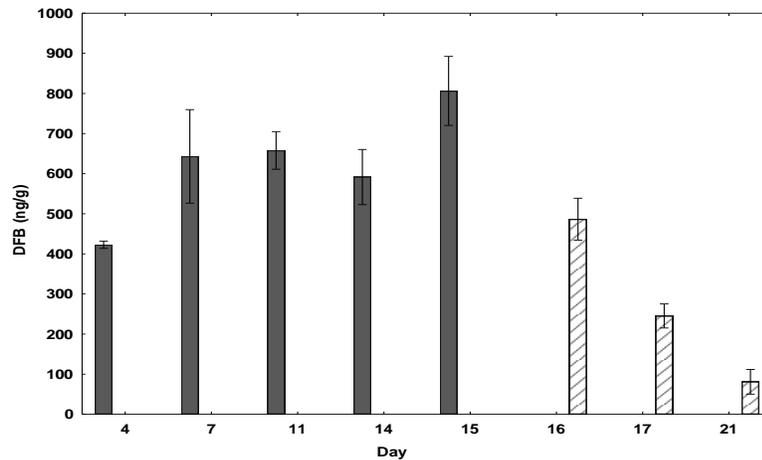


Figura 8. Bioacumulación-depleción de Diflubenzurón en *M. chilensis* Días 1 al 14, período de alimentación con alimento medicado.

Durante el período de bioacumulación (días 4, 7, 11, 14 y 15), no existen diferencias significativas de la concentración obtenida entre los días, lo que es debido a que seguramente el incremento de concentración no es lo suficientemente alto para generar estas diferencias. Sin embargo, no se logra llegar el estado estacionario, ya que exceptuando el día 14, siempre hay valores superiores en cada tiempo de muestreo.

Curva de depleción de Diflubenzurón (segundo estudio).

La curva de depleción se realizó de la misma forma que la anteriormente realizada en el primer estudio. Para la confección de la curva de depleción, se consideraron solamente los días 15, 16 y 17 (días 1, 2 y 3 post-tratamiento), ya que el día 21 (día 7 post-tratamiento) dio resultados en su mayoría bajo el límite de detección y cuantificación, por lo que fue eliminado.

Se realizó una curva de depleción combinada del logaritmo natural (Ln) de la concentración de Diflubenzurón en las partes blandas de los choritos versus días post-tratamiento de los tres estanques (**Figura 9**). Se confeccionó una curva de normalidad de frecuencia de residuos estándar acumulada de la curva (**Figura 10**), y se realizó un test de Shapiro-Wilk de normalidad. Para que se acepte la normalidad de los residuos, y por ende la curva de calibración, el test debe dar una significancia mayor a 0,05.

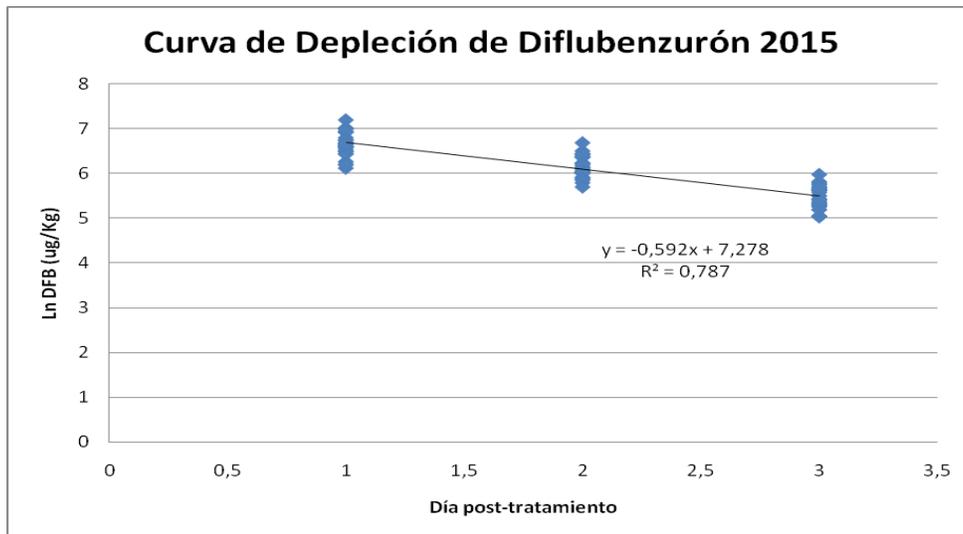


Figura 9. Curva de Depleci3n de Diflubenzur3n. Gráfico de logaritmo natural (Ln) de concentraci3n de Diflubenzur3n (ug/Kg) en partes blandas de chorito vs días post-tratamiento.

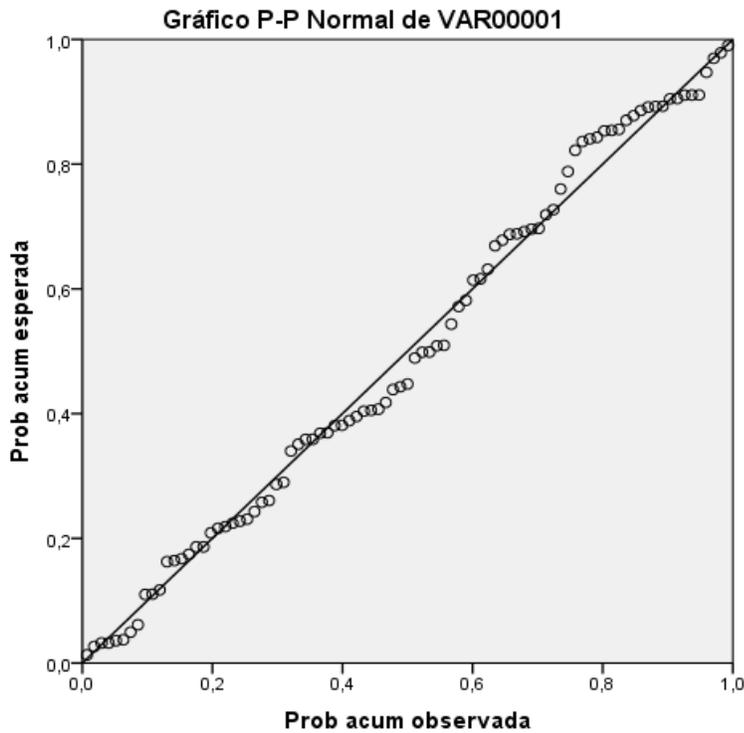


Figura 10. Distribuci3n de frecuencia acumulada de residuos estandar de la curva de depleci3n



Al realizar la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk a los residuos estándar de la curva de depleción, se obtiene lo siguiente:

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
VAR00001	,072	89	,200*	,985	89	,408

Se demuestra que no hay una desviación de la normalidad (significancia de 0.408), por lo que se puede utilizar esta curva para los posteriores cálculos.

El tiempo de vida media ($T_{1/2}$) se calcula dividiendo 0,693 por la pendiente de la curva de depleción. El valor de $T_{1/2}$ calculado es de 1,2 días. Cabe hacer notar que el tiempo de vida media calculado es mucho menor al obtenido en el primer estudio, no obstante, la dosis de Diflubenzurón a la que estaban expuestos fue mayor en este segundo estudio, y los tres primeros tiempos de muestreo se realizaron más seguidos. La curva de depleción obtenida fue mucho mejor a la obtenida en el primer estudio.

Como ya se mencionó anteriormente, *M chilensis* es capaz de bioacumular Diflubenzurón, pero es altamente improbable que esta bioacumulación pueda ser observada en las condiciones de campo donde se desarrolla la producción de mitílidos, y considerando las dosis utilizadas en la salmonicultura. Por otro lado el tiempo de vida media calculado es muy bajo (1,2 días), lo que implica que la escasa cantidad de Diflubenzurón que puede ser bioacumulado por los mejillones, es rápidamente eliminada por éstos.

Objetivo 4: *Determinar la posible bioacumulación de productos terapéuticos en mitílidos, en áreas donde se producen peces y moluscos, y donde existan bancos naturales conocidos.*

5.10. Desarrollo y ejecución de un plan de muestreo y encuesta epidemiológica que considere obtención de muestras desde centros de producción de mitílidos y bancos naturales conocidos, zonas blanco (alejadas de centros de producción de salmónes) y zonas cercanas a producción de salmónes.

Tal como se mencionó anteriormente, de acuerdo a lo consensuado con la Subpesca, se realizó el plan de muestreo de Azametifós y Deltametrina en el centro de cultivo de mitílidos Cataluña ubicado en la Bahía Hueihue, cuyas coordenadas son S 41°54'14.0"; W 073°29'48.4", situado en las cercanías del centro de salmónidos Hueihue, de la empresa Marine Harvest.



5.11. Análisis de las muestras obtenidas mediante las técnicas de laboratorio validadas.

Al analizar las muestras obtenidas de los muestreos de Azametifos y Deltametrina en campo, no se detectó la presencia de los analitos, por lo que se concluye, que la alta dilución del analito en el mar, no permite un contacto con los mejillones, en una proporción medible para las técnicas empleadas, y que produzca una bioacumulación en los mitílidos.

Cabe recordar que en los estudios en condiciones controladas, dónde los mejillones fueron expuestos a una concentración extrema de los antiparasitarios anteriormente señalados, no fue posible detectar los analitos, considerando la concentración y los tiempos de exposición a la que fueron sometidos los mejillones en el estudio.

Los cromatogramas de los resultados de las muestras se pueden observar en el anexo 9.

Objetivo 5: *Evaluar el impacto social y económico de la detección de residuos de productos terapéuticos en la industria mitilicultora.*

5.12. Descripción de la industria mitilicultora

5.12.1 Antecedentes productivos

Los mitílidos son moluscos bivalvos, filtradores, que pertenecen a la familia Mytilidae, de la clase Bivalvia. En la actualidad, prácticamente, el 95% de la oferta mundial, estimada sobre 1,7 millones de toneladas, proviene de la acuicultura. De este modo, el abastecimiento a nivel mundial de este recurso está basado en la estabilidad de la actividad y la capacidad de los cultivadores de aumentar sus cosechas y mejorar los productos.

En general, y con excepción de unos pocos países donde la extracción está estrictamente controlada, los bancos naturales han sido sobreexplotados. Chile no es la excepción. En el país, tres son los recursos de esta especie con importancia económica: el chorito (*Mytilus chilensis*), el choro zapato (*Choromytilus chorus*) y la cholga (*Aulacomya ater*). Sin embargo, según cifras entregadas por el Servicio Nacional de Pesca en su Anuario Estadístico 2012, el chorito representa un 97,8% del volumen total de mitílidos desembarcados con 258.188 t, seguidos por la cholga con el 1,8% y el choro zapato con el 0,3%.

En el país, el chorito ha sido explotado y comercializado en grandes volúmenes desde los años 30, aproximadamente. Los principales bancos naturales estaban en la región de Los Lagos, desde Valdivia hasta las zonas de Puerto Montt y Contao al sur.



En el a1o 1960 se agotaron estos bancos naturales, lo que motiv3 al Estado para comenzar un programa de investigaci3n sobre el desarrollo de cultivos, por intermedio de la Corfo, IFOP y la Divisi3n de Pesca y Caza del SAG. Fueron establecidos centros de cultivo estatales –como Putem3n, Talc3n, Tubildad, Puluqui e Isletilla, entre otros– localizados principalmente en Calbuco y la Isla de Chilo3. A mediados de la d3cada de los '70, el Estado los traspas3 en comodato a otras instituciones y universidades para fines de investigaci3n.

A inicios de la d3cada de la d3cada de los 80, los privados desarrollaron el cultivo comercial del chorito, debido a la creciente demanda. No obstante, los cambios m3s significativos ocurren a fines de los a1os 90, con la llegada de capitales espa1oles que invierten en plantas de proceso y abren un poder comprador importante (D3az, 2010).

Comienza as3 una fuerte expansi3n de las 3reas de cultivo concesionadas. Ya en el a1o 2004, la escala m3nima eficiente en materia de cultivo cambia, pasando de menos de cuatro hect3reas a menos de 15, y los procesos de manejo llegan a ser m3s industriales, tendencia que conduce a una creciente integraci3n vertical (Fishing Partners Ltda., 2005).

5.12.1.1 Producci3n internacional

La producci3n mundial de mejill3n de acuicultura, en t3rminos absolutos, ha crecido entre el 2003 y el 2009 a una tasa de crecimiento interanual del 1,38%, bordeando para el 2009 las 1.760.770 toneladas.

En t3rminos generales, la tendencia de la producci3n mundial de mejill3n de acuicultura es ligeramente positiva, en los a1os 2007 y 2008 se produjo un notable descenso acumulando del 10,4% respecto del 2006 (**Figura 11**).

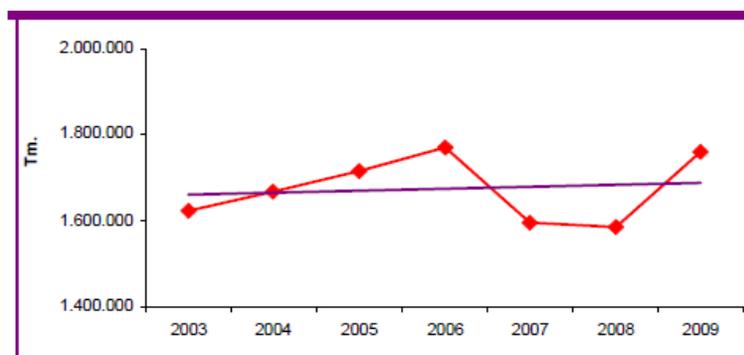


Figura 11. Evoluci3n de la producci3n mundial de mejill3n de acuicultura (Observatorio de precios de los alimentos, 2010).

Como mayor productor de mejill3n de acuicultura del mundo destaca China, la cual concentra el 36% de la producci3n mundial en el a1o 2009, superando las 637.000 toneladas. A una distancia



considerable aparece Tailandia con m1s de 230.000 toneladas, lo que supone un 13% del total mundial y en tercer lugar se ubica Espa1a con una producci3n de 198.531 toneladas y concentra el 11% del total de la producci3n mundial (**Figura 12**).

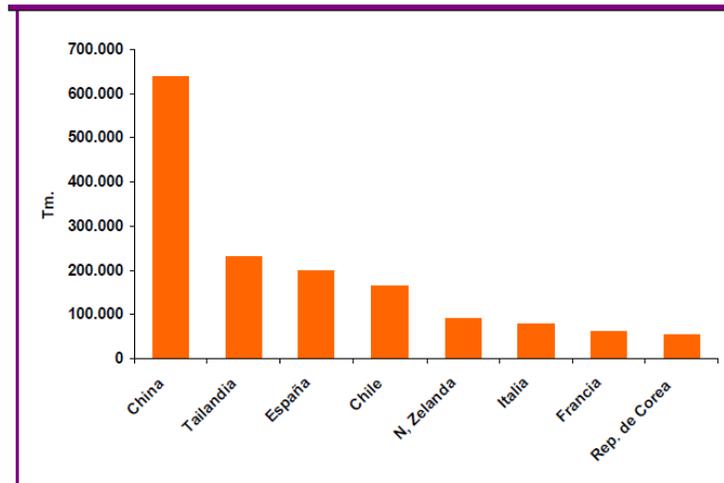


Figura 12. Principales pa1ses productores de mejill3n de acuicultura (Observatorio de precios de los alimentos, 2010).

No es de extra1ar la posici3n de China en el mercado mundial, dado que es el pa1s que posee el mayor volumen de producci3n de especies de acuicultura, con m1s de 45.279.000 de toneladas en el a1o 2009 (**Figura 13**).

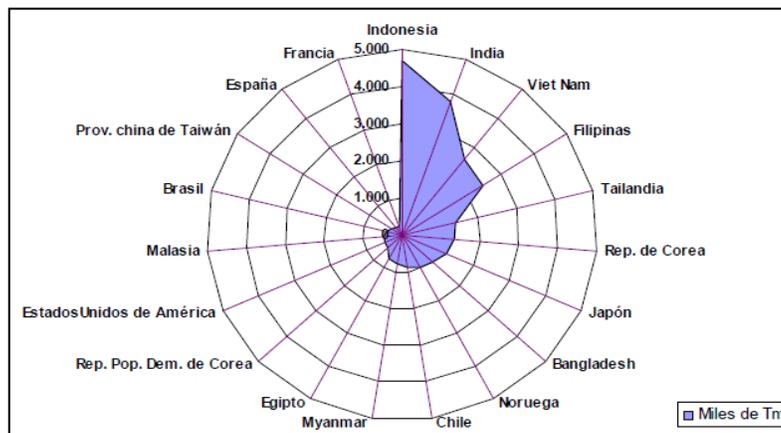


Figura 13. Principales pa1ses productores de acuicultura, a1o 2009. (Observatorio de precios de los alimentos, 2010).



Sin embargo su producto presenta debilidades asociadas a la calidad sanitaria, alta contaminación de sus aguas y la presentación del producto, principalmente tamaño y color, lo que merma la calidad en su producto final.

Es por ello que el mercado chileno está orientando sus esfuerzos comerciales en capturar el mercado asiático, e ingresar a un segmento socioeconómico alto con un producto de alta calidad y buen precio (AMICHILE).

5.12.1.2 Producción Nacional

La historia productiva de los últimos años dan cuenta que el 2002 el desembarque total de choritos fue de 43.213 toneladas, de las cuales 42.776 corresponden a la región de Los Lagos, lo que representa un 99% de la producción; y 41.797 corresponden a producción acuícola, lo que corresponde al 96,7% del total nacional.

El hito de sobrepasar las 100.000 toneladas se logró el 2006, al alcanzar las 127.169 toneladas. De éstas, el 99,95% se produjo en la región de Los Lagos y el 99,83% corresponde producción de la industria acuícola. Siguiendo la misma tendencia en cuanto a origen, el 2010 se superaron las 200 mil toneladas con la producción de 221.876 toneladas.

El peak de producción para el periodo analizado corresponde a las 288.879 toneladas de 2011. Sin embargo para el 2012, que corresponde al último Anuario Estadístico publicado, la producción tuvo un decrecimiento del 11% alcanzando las 258.188 toneladas. Este escenario fue más auspicioso que el anunciado por los productores, quienes esperaban una disminución entre un 30% y 35% de las cosechas debido principalmente al inicio tardío de la producción de las plantas procesadoras y la menor cosecha proyectada para el 2013 producto de la escasez de semilla que se presentó el 2012. La Asociación de Mitilicultores de Chile (AMI-Chile) estimó que esta escasez tendría repercusiones negativas en las cosechas 2013 e incluso de 2014 (www.aqua.cl)

En cuanto al crecimiento anual, para el periodo 2002-2012, éste llega 20,9% promedio registrando un máximo de 44% para el 2006 y un mínimo de -11% para el 2012. Los datos se muestran en las **Tablas 22 a la 24 y Figuras 14 y 15**.

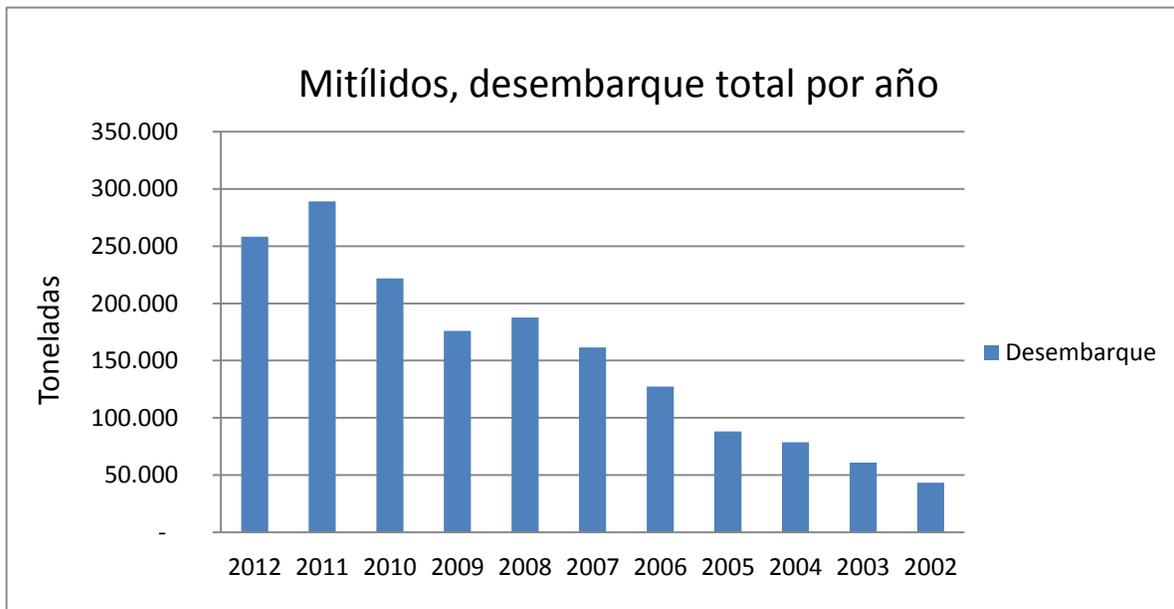


Figura 14. Mitílicos, desembarque total por año. Serie 2002-2012. (Anuarios Estadístico de Pesca, Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura 2002 a 2012).

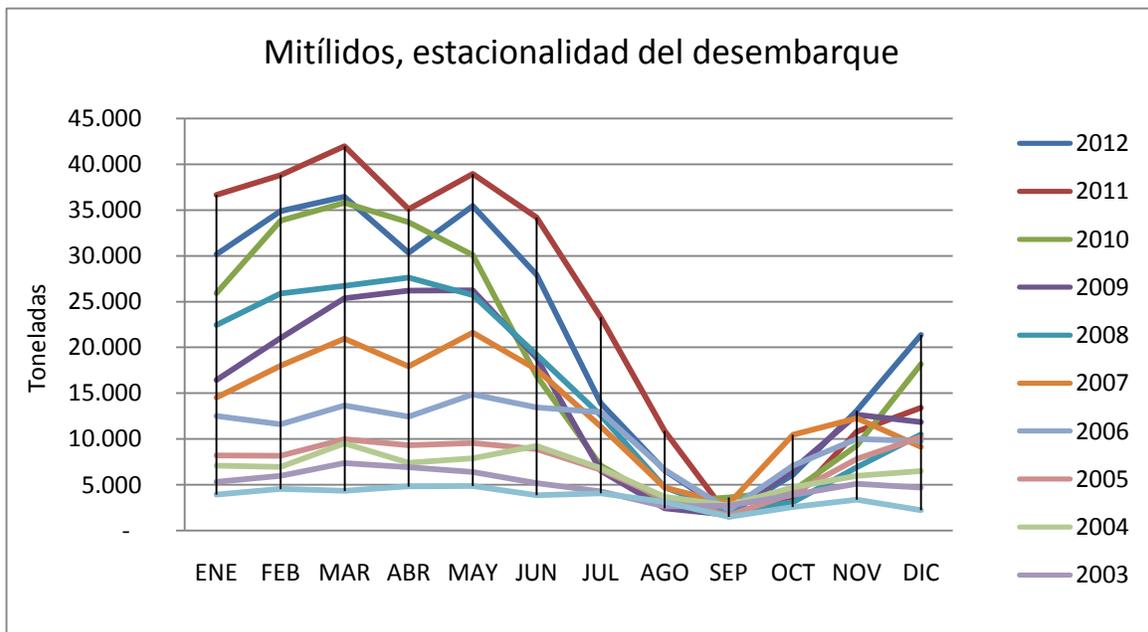


Figura 15. Mitílicos, estacionalidad del desembarque. Serie 2002-2012. (Anuarios Estadístico de Pesca, Servicio Nacional de Pesca 2002 a 2012).



Con respecto a las proyecciones de producción, AMICHILE cifra las expectativas para los próximos años alrededor de las 250.000 toneladas de mantenerse las actuales condiciones de operación a nivel de industria. Crecimientos por sobre esta cifra deben ir acompañados de la optimización de los procesos y del trabajo conjunto en áreas como la captación de semillas, el estudio de la capacidad de carga, el ordenamiento territorial y la operación en agrupación de concesiones.

5.12.2 Análisis de la oferta

5.12.2.1 Mercado nacional

Según cifras informadas por la Asociación Gremial de Mitilicultores de Chile, el mercado nacional consume anualmente del orden de 15.000 toneladas, cifra que fue compartida con el PTI de Mitílicos quien en el informe “Diseño de estrategia de imagen y posicionamiento para el mercado nacional”, cifra la oferta al mercado nacional en 14.000 toneladas para el 2010, las cuales valoriza en MMUS\$ 23 a valor mercado retail y MMUS\$ 11 en valor de producción (**Figura 16**).



Figura 16. Materia prima destinada por producto. (AMICHILE).

5.12.2.2 Mercado internacional

Durante la última década, y con el explosivo desarrollo de la industria acuícola en Chile, se ha visto un importante reposicionamiento de la industria mitilicultora tanto en el nivel de producción como en la importancia relativa de ésta con respecto a otros productos tradicionalmente exportados por Chile, y que generalmente provenían de capturas pesqueras.



Tabla 22.
Desembarque total y por mes. Serie 2002-2012.

Año	Desembarque total por mes												Total
	ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	AGO	SEP	OCT	NOV	DIC	
2012	30.170	34.865	36.441	30.315	35.422	27.940	13.923	6.588	1.962	6.102	13.105	21.355	258.188
2011	36.646	38.814	41.961	35.103	38.937	34.193	23.271	10.889	1.551	3.369	10.826	13.435	288.995
2010	25.936	33.848	35.784	33.658	30.098	16.897	7.090	3.141	3.610	4.367	9.277	18.170	221.876
2009	16.453	21.016	25.382	26.200	26.243	18.857	6.538	2.428	1.706	6.683	12.671	11.844	176.021
2008	22.458	25.885	26.720	27.637	25.713	19.219	12.597	4.731	2.059	3.091	6.916	10.514	187.540
2007	14.542	18.016	20.947	17.928	21.616	17.573	11.354	4.704	2.919	10.452	12.282	9.148	161.481
2006	12.493	11.608	13.650	12.446	14.860	13.435	12.911	6.648	2.267	7.078	10.001	9.772	127.169
2005	8.202	8.186	9.992	9.309	9.570	8.897	6.630	3.526	1.649	4.067	7.822	10.221	88.071
2004	7.079	6.956	9.527	7.393	7.906	9.247	6.823	3.664	2.738	4.718	5.959	6.497	78.507
2003	5.340	5.981	7.386	6.950	6.431	5.191	4.283	2.665	2.742	3.899	5.122	4.718	60.708
2002	3.933	4.537	4.320	4.813	4.854	3.867	4.071	3.121	1.508	2.583	3.371	2.235	43.213

Fuente: Elaboración propia a partir de Anuarios Estadístico de Pesca, Servicio Nacional de Pesca 2002 a 2012.

Tabla 23.
Aporte X Región e industria acuícola al total del desembarque anual. Serie 2002-2012

Año	Total anual	X Región	%	Acuicultura	%
2012	258.188	258.009	99,9%	257.788	99,8%
2011	288.995	288.879	100,0%	288.587	99,9%
2010	221.876	221.809	100,0%	221.552	99,9%
2009	176.021	175.815	99,9%	175.728	99,8%
2008	187.540	187.056	99,7%	187.064	99,7%
2007	161.481	161.107	99,8%	153.433	95,0%
2006	127.169	127.110	100,0%	126.952	99,8%
2005	88.071	87.854	99,8%	87.736	99,6%
2004	78.507	77.501	98,7%	77.461	98,7%
2003	60.708	58.254	96,0%	57.809	95,2%
2002	43.213	42.776	99,0%	41.797	96,7%

Fuente: Elaboración propia a partir de Anuarios Estadístico de Pesca, Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura 2002 a 2012.



Tabla 24.
Crecimiento anual del desembarque. Serie 2002-2012.

Año	Desembarque	Crecimiento anual
2012	258.188	-11%
2011	288.995	30%
2010	221.876	26%
2009	176.021	-6%
2008	187.540	16%
2007	161.481	27%
2006	127.169	44%
2005	88.071	12%
2004	78.507	29%
2003	60.708	40%
2002	43.213	

Fuente: Elaboraci3n propia a partir de Anuarios Estadístico de Pesca, Servicio Nacional de Pesca 2002 a 2012.

De esta forma para el 2002, las exportaciones de choritos congelado correspondiente a MMUS\$ 16, figuraban en el onceavo lugar de los productos de este rubro, después del salm3n del Atlántico con ventas por MMUS\$ 215, salm3n plateado con ventas por MMUS\$ 193, trucha arcoíris con ventas por MMUS\$ 169, merluza com3n con ventas por MMUS\$ 62, erizo con ventas por MMUS\$ 56, jurel con ventas por MMUS\$ 36, bacalao con ventas por MMUS\$ 32, merluza de cola con ventas por MMUS\$ por 28, merluza austral con ventas por MMUS\$ 28 y osti3n del norte con ventas por MMUS\$ 20.

Igual posici3n mantenían los choritos en el rubro de las conservas, cuyas exportaciones ascendieron a MMUS\$ 2.6 ubicándose después del jurel con ventas por MMUS\$ 52, navaja con ventas por MMUS\$ 9.7, lapa con ventas por MMUS\$ 8.4, loco con ventas por MMUS\$ 5.4, navajuela con ventas por MMUS\$ 5.2, almeja con ventas por MMUS\$ 5, salm3n plateado con ventas por MMUS\$ 4.3, culengue-almeja con ventas por MMUS\$ 4.3, centolla con ventas por MMUS\$ 2.9 y caracol con ventas por MMUS\$ 2.8.

Las **Tablas 25, 26** y **Figura 17** muestran la evoluci3n de las exportaciones en t3rminos de producto e ingresos, las cuales han permitido que, en el rubro de los congelados, el chorito se mantenga en 4° lugar de importancia después de los salm3nidos, lo cual es un claro ejemplo de la consolidaci3n de este sector productivo.



Tabla 25.
Exportaciones rubro congelado y conservas de chorito. Serie 2002-2013.

Año	Exportaciones choritos (t)	
	Congelado	Conserva
2013	61.413	3.582
2012	58.152	2.902
2011	64.578	4.207
2010	44.900	2.834
2009	35.717	2.854
2008	43.766	1.732
2007	34.072	935
2006	25.864	1.233
2005	18.003	748
2004	17.190	676
2003	11.771	267
2002	8.200	665

Fuente: Elaboraci3n propia a partir de Bolet3n de Exportaciones Pesqueras de Chile. IFOP, 2002.2013.

La tasa de crecimiento anual de producci3n para el rubro congelado en el periodo analizado registr3 su menor valor el 2009, con un -18%, en tanto los peaks se produjeron el 2004 con un 46% y el 2011 con un 44%.

Para el rubro conservas, la menor tasa de crecimiento se registr3 el 2012 con un -31% y el peak de crecimiento se produjo el 2008 con un 85%.

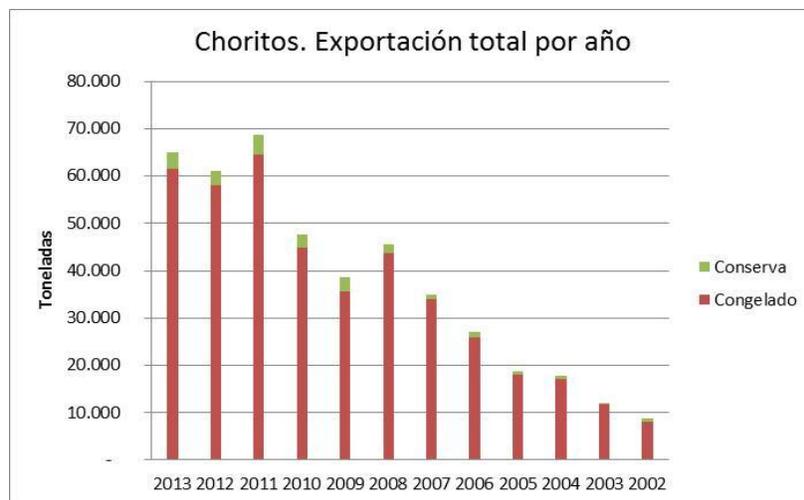


Figura 17. Exportaciones de choritos rubro congelado y conservas, serie 2002-2013. (Bolet3n de Exportaciones Pesqueras de Chile, IFOP, 2002 a 2013).



Tabla 26.
Valor FOB exportaciones rubro congelado y conservas de chorito. Serie 2002-2013

Año	Exportaciones choritos (MUS\$)	
	Congelado	Conserva
2013	163.432	21.159
2012	137.943	15.973
2011	158.887	23.116
2010	93.512	13.306
2009	79.112	15.222
2008	121.411	10.471
2007	80.683	5.131
2006	57.198	7.161
2005	36.625	3.630
2004	36.838	3.119
2003	23.781	1.215
2002	16.170	2.600

Fuente: Elaboración propia a partir de Boletín de Exportaciones Pesqueras de Chile. IFOP, 2002.2013.

Con respecto a los precios del rubro congelados, estos han tenido un promedio de 2.276 US\$/t, con máximos registrados el 2008 a 2.774 US\$/t y el 2013 a 2.661 US\$/t. Los valores para la serie se muestran en la **Figura 18**.

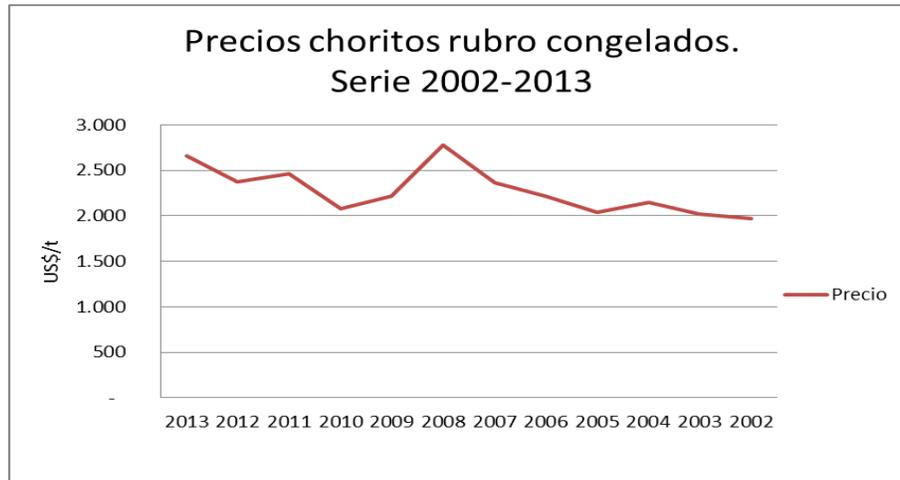


Figura 18. Precios rubro congelados serie 2002-2013. (Fuente: elaboración propia a partir de Boletín de Exportaciones Pesqueras de Chile, IFOP, 2002 a 2013).



En tanto los precios del rubro conservas, registraron un promedio de 5.184 US\$/t, con máximos registrados el 2008 a 6.046 US\$/t y el 2013 a 5.907 US\$/t. Los valores para la serie se muestran en la **Tabla 27**.

Tabla 27.
Precios rubro congelados y conservas, serie 2002-2013.

Año	Precios choritos (US\$/t)	
	Congelado	Conserva
2013	2.661	5.907
2012	2.372	5.504
2011	2.460	5.495
2010	2.083	4.695
2009	2.215	5.333
2008	2.774	6.046
2007	2.368	5.491
2006	2.212	5.809
2005	2.034	4.851
2004	2.143	4.616
2003	2.020	4.556
2002	1.972	3.908

Fuente: Elaboración propia a partir de Boletín de exportaciones pesqueras de Chile. IFOP, 2002.2013.

Con respecto al origen de los capitales presentes en la industria miticultora, hacia mediados de los 90 la inversión extranjera presente fue principalmente de origen español (**Tabla 28**).

Tabla 28.
Principales exportadores de chorito congelado. 2002.

EXPORTADOR	PRODUCCIÓN (t)	VALOR FOB (MMUS\$)
TORALLA S.A	2.489,5	5.211,7
SOC. COMERCIAL RIA AUSTRAL LTDA.	1.079,0	1.905,0
BAGAMAR LTDA	768,2	1.459,2
PACIFIC GOLD S.A.	754,7	1.321,0
INVERSYSTEM S.A.	694,5	1.278,4
GRANJA MARINA CHAUQUEAR LTDA.	315,5	627,2
IMPORTADORA Y EXPORTADORA NANAIMO.	204,9	574,7
COMERCIAL VIENTO SUR S.A.	236,1	431,8
ROMAN Y CIA. LTDA.	186,7	417,1
CONGELADOS DEL SUR S.A	183,9	370,4

Fuente: Elaboración propia a partir de Boletín de Exportaciones Pesqueras de Chile, IFOP, 2002.



Sin embargo, el crecimiento, evoluci3n y madurez de un sector industrial normalmente lleva consigo cambios en los tama1os m3nimos productivos, con nuevos actores, con una fuerte tendencia a la integraci3n vertical, la incorporaci3n acelerada de tecnolog3as de mecanizaci3n de procesos y el desarrollo de proveedores de servicios dedicados tradicionalmente al salm3n y adaptados r3pidamente a este sector emergente.

En este sentido, la llegada de grandes y nuevos actores, especialmente de capital nacional a este sector, comenz3 en el 2005, con el arribo de FYS Chile, Blushell, Huimar-paquito, Sudmaris Chile, Pesquera el Golfo, Camanchaca, Pesquera San Jos3 y Mytilus Multiexport, entre otras, las que en su mayor3a comenzaron a operar modernas plantas durante el 2007 para procesar en una primera etapa, entre 10.000 y 20.000 toneladas anuales.

De esta forma, estos nuevos actores irrumpen en el quehacer productivo de la industria, tal como lo muestran las **Tablas 29 y 30**.

Tabla 29.

Principales exportadores de choritos del rubro congelado. 2012.

EXPORTADOR	2012	
	PRODUCCI3N (t)	VALOR FOB (MMUS\$)
BLUE SHELL S.A.	8.289,5	20.839,9
SAINT ANDREWS SMORY DELICACIES S.A.	6.463,4	15.031,7
CIA. PESQUERA CAMANCHACA S.A.	5.985,6	14.978,2
TORALLA S.A.	4.229,1	12.070,5
PACIFIC GOLD S.A.	6.022,4	11.209,6
FYS CHILE S.A.	4.168,5	9.362,7
SOC. COMERCIAL RIA AUSTRAL LTDA.	3.617,5	8.815,9
SOUTH PACIFIC KORP S.A.	2.807,2	6.851,1
SUDMARIS CHILE S.A.	2.693,1	6.449,6
INVERSIONES COIHUIN LTDA.	2.285,5	5.311,9

Fuente: Elaboraci3n propia a partir de Bolet3n de exportaciones pesqueras de Chile. IFOP, 2012.



Tabla 30.
Principales exportadores de choritos del rubro congelado. 2013.

EXPORTADOR	2013	
	PRODUCCIÓN (t)	VALOR FOB (MMUS\$)
BLUE SHELL S.A.	8.098,8	22.110,0
SAINT ANDREWS SMORY DELICACIES S.A.	7.309,4	19.308,7
CIA. PESQUERA CAMANCHACA S.A.	6.343,2	16.667,6
TORALLA S.A.	4.245,3	13.261,2
SUDMARIS CHILE S.A.	4.342,0	10.986,9
PACIFIC GOLD S.A.	5.138,1	10.350,4
SOUTH PACIFIC KORP S.A.	3.666,5	10.047,4
INMUEBLES CATALUNA LTDA.	3.649,0	9.942,7
INVERSIONES COIHUIN LTDA	3.628,5	9.524,0
FYS CHILE S.A.	3.554,9	9.398,3

Fuente: Elaboración propia a partir de Boletín de exportaciones pesqueras de Chile. IFOP, 2013.

5.12.3 Análisis de la demanda

El análisis de la serie cronológica de las exportaciones de chorito congelado, muestra que los mercados de destinos se han mantenido prácticamente inalterados durante la última década. Para el 2002, el 76% de los envíos se concentraba en 5 destinos, liderado por Italia con un 26%, España con el 23%, Portugal con un 16%, Estados Unidos con un 15% y Francia con un 6%.

11 años después, si bien hay una mayor diversificación de los destinos de las exportaciones, Europa sigue siendo el mercado principal de los choritos chilenos. Es así como España concentra el 18% de la demanda, seguido por Francia con el 13%, Estados Unidos con el 13%, Italia con el 10% y Rusia con el 9%.

La evolución de los volúmenes demandados para los últimos años, se muestra en la **Figura 19**.

Considerando la alta vulnerabilidad que representa la falta de diversificación de los mercados de destino, especialmente considerando la variabilidad de la divisa y la crisis económica europea, una de las principales líneas de acción de las organizaciones gremiales es la búsqueda de nuevos mercados de destino.

En este sentido ProChile, al ser la institución encargada de promover la exportación de bienes y servicios chilenos y de contribuir a la atracción de inversión extranjera, se ha transformado en un socio estratégico importante a la hora de establecer vínculos sólidos con otros mercados. En este sentido ProChile cuenta con una serie de instrumentos de fomento que están siendo utilizados a nivel gremial o individual por las empresas exportadoras de mitílidos.

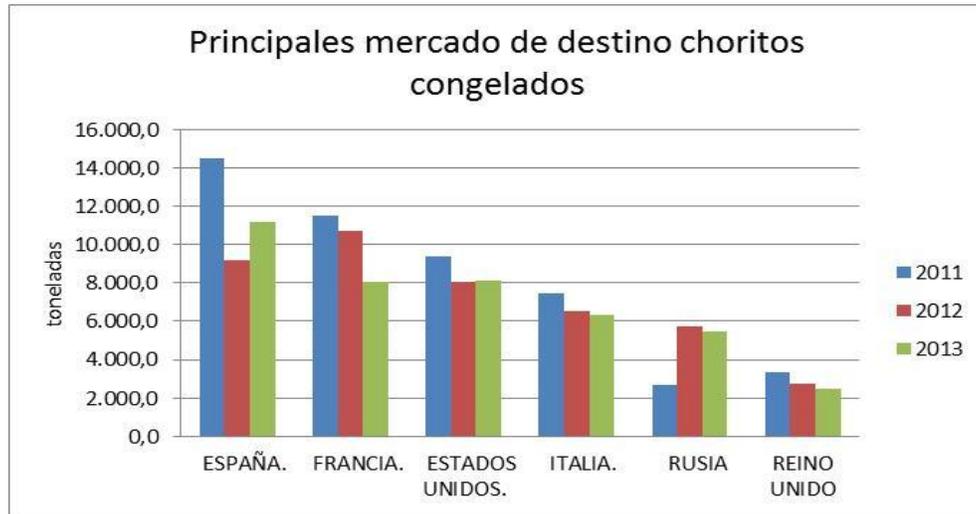


Figura 19. Principales mercados de destino choritos rubro congelados. (Fuente: Elaboración propia a partir de Boletín de Exportaciones Pesqueras de Chile, IFOP, 2011-2013).

a) Marca Sectorial.

Es un concurso público para proyectos que busquen potenciar un determinado sector productivo nacional, mediante la creación e implementación de una marca que sea representativa de un sector.

Cada proyecto diseña una estrategia de marca con el objetivo de penetrar uno o más mercados internacionales, mediante un trabajo asociativo público-privado que tiene la ventaja de lograr economías de escala para la difusión y posicionamiento del sector en el extranjero, trabajando su imagen bajo los atributos asociados a la marca país.

Los proyectos sectoriales desembocan en marcas genéricas que destacan los atributos de sus productos o servicios sin distinción de marcas individuales, empresas o grupos de empresas, lo que permite crear y fortalecer la imagen de los diferentes sectores a nivel internacional, contribuyendo así al posicionamiento de Chile en los distintos mercados alrededor del mundo (www.prochile.cl).

En el caso del sector mitilicultor, Prochile en cooperación con un grupo de empresarios ha financiado 3 proyectos de marca sectorial:

- Mercado de Rusia. Esta iniciativa fue muy bien valorada por el sector, ya que logró incrementar en 400% las exportaciones durante el periodo de ejecución del proyecto. Al respecto, y según información recogida por El Mercurio, Chile se convirtió en el principal exportador de carne congelada de mejillón al mercado ruso con una participación de mercado del 77%.
- Mercado de Brasil. Proyecto de 7 meses de ejecución que permitió incrementar en un 100% los envíos a ese país (AMICHILE). ProChile destaca los logros de la iniciativa a pesar de no ser grandes consumidores de mitílicos.
- Mercado Chino. Iniciativa en ejecución y sobre la que se tienen altas expectativas.



b) Concurso de promoción de las exportaciones silvoagropecuarias y productos del mar.

El Concurso de Promoción de Exportaciones Silvoagropecuarias y Productos del Mar es una iniciativa desarrollada por el Ministerio de Agricultura y ProChile enfocada en apoyar a las empresas en sus estrategias de internacionalización.

El concurso es una herramienta creada para fomentar las exportaciones de alimentos frescos o procesados, productos forestales y productos del mar, a través del co-financiamiento y apoyo en la gestión de diferentes proyectos y estrategias de promoción, tanto de actuales exportadores como de todo aquel que tenga el potencial para iniciarse en el proceso de internacionalización.

El concurso cuenta con más de 15 áreas de apoyo especialmente diseñadas para ajustarse a las necesidades de internacionalización de los empresarios (www.prochile.cl).

Según informa Roxana Monsalve, ejecutiva de Prochile de Los Lagos, los principales esfuerzos en el caso del sector mitilicultor están orientados principalmente al mercado asiático, especialmente Hong Kong, y otros destinos de interés como República Dominicana, Cuba y Brasil; e involucra iniciativas tales como:

- Misiones comerciales
- Visitas de compradores
- Eventos y showrooms orientados especialmente en dar a conocer los productos

c) Sabores de Chile

Es una misión empresarial en diferentes ciudades del mundo, agrupadas en rutas, y que tiene como objetivo generar reuniones de negocios bilaterales con empresarios de cada uno de los destinos en los que se realiza. Con el apoyo de “Sabores de Chile” es posible mostrar los productos y establecer vínculos de negocio con los compradores o potenciales compradores más relevantes del sector.

El trabajo conjunto y coordinado entre las 15 Oficinas Regionales y las más de 50 Oficinas Comerciales en el mundo, hacen posible organizar agendas de negocios con una selección precisa y personalizada de cada una de las contrapartes involucradas.

Sabores de Chile incluye visitas técnicas en destino, guiadas por expertos de ProChile, en las que es posible conocer las claves del mercado en puertos de destino, cadenas de supermercados, tiendas especializadas y bodegas de almacenamiento, a lo que se suman reuniones con expertos de Aduanas, agentes especializados y otros actores clave del mercado. Además, es posible acceder a seminarios temáticos que sirven para potenciar y posicionar a Chile como un socio confiable para hacer negocios, y que abarcan temas como promoción turística, atracción de inversiones, vinos y productos, entre otros.



Con respecto al uso de esta herramienta por parte de los miticultores, Sra. Roxana Monsalve indica que el 2013 se contó con la participación de 5 empresas del sector. Para este año aún se encuentran abiertas las postulaciones y ya se han registrado inscripciones de empresas del rubro.

d) Participación en ferias internacionales

Participar en ferias internacionales es una oportunidad de tener contacto directo con importadores, distribuidores, mayoristas y líderes de opinión, exponiendo la marca de interés frente a los miles de visitantes que recibe el Pabellón de Chile alrededor del mundo.

El objetivo de ProChile es entregar apoyo comercial y logístico en destino, coordinación de reuniones con potenciales compradores y facilitación en la habilitación y montaje de los stands, entre otros servicios orientados a la proyección internacional de tu negocio.

Según informó la oficina regional de ProChile en Los Lagos, se encuentra abierta la convocatoria para la participación en las ferias de interés, que en el caso de los miticultores corresponde a las asociadas a productos del mar: Feria de Boston en Estados Unidos, Feria de Bruselas en Bélgica y Feria de Dailan en China.

e) Acciones de cooperación con organizaciones gremiales

ProChile a través de su oficina regional, organiza visitas de importadores y periodistas interesados y se apoyan en las Asociaciones Gremiales para organizar giras temáticas y dar a conocer en terreno las bondades del producto chileno, desde su origen hasta el destino final.

Adicionalmente se destaca que el accionar de las asociaciones gremiales permite posicionar a la industria más allá de un exportador particular.

f) Acciones frente a demandas concretas de importadores.

Frente a requerimientos concretos de importadores, las respectivas oficinas comerciales toman contacto con los exportadores del sector. La selección de las empresas se realiza mediante un proceso de convocatoria y postulación.

Con posterioridad, las distintas oficinas comerciales realizan una validación de la información entregada por los exportadores y se verifica que las características del producto sean coincidentes con las del producto demandado por los importadores

g) Elaboración de estudios de mercado

Todas las oficinas comerciales realizan normalmente perfiles de mercado, información que es contrastada con el interés de los respectivos exportadores para su priorización.

Esta información es publicada en la página web de ProChile, enviada a las empresas que la puedan considerar una oportunidad de negocio, y a las Asociaciones gremiales para su difusión.



De la experiencia relacionada con los mitílidos, la ejecutiva de la oficina regional de ProChile, destaca la valorización del producto chileno en los mercados trabajados, destacando particularmente el interés de Hong Kong debido a la calidad del producto y la diferenciación con el producto chino.

5.13. Análisis estratégico

5.13.1 Análisis del medio interno: cadena de valor

El foco del análisis de la cadena de valor es la unidad estratégica de negocios. El principio subyacente es que todas las tareas desempeñadas por una unidad de negocios pueden ser clasificadas en 9 categorías distintas. Cinco de ellas son las llamadas actividades primarias y las otras cuatro reciben el nombre de actividades de apoyo.

Las actividades primarias son aquellas implicadas en el movimiento físico de materia prima y de productos terminados, en la producción de bienes y de servicios, y en el proceso de marketing, ventas y subsiguientes servicios de los productos de la firma. En cierta medida se les puede considerar como las funciones clásicas de gestión de la firma, en donde hay una entidad organizacional, con gerencias y jefaturas a cargo de tareas específicas y con pleno equilibrio entre autoridad y responsabilidad.

Las actividades de apoyo, sin embargo, son mucho más invasivas. Su papel esencial consiste en proveer apoyo, no sólo a las actividades primarias, sino que también entre sí. Están compuestas por la infraestructura de gestión de la firma, manejo de recursos humanos, desarrollo de tecnología y adquisiciones (Hax y Majluf, 1994).

5.13.1.1 Descripción del ciclo productivo

En la industria mitilicultora se distinguen claramente 4 procesos productivos principales, los cuales son la base de la cadena de valor (Fig. 20):

- Producción de semillas (63)
- Cultivo de Engorda (1.050)
- Procesamiento (36)
- Comercialización (50. www.mesamitilidos.cl)

Con respecto al nivel de integración de estos procesos productivos, la industria identifica los siguientes perfiles:

- Productores
- Productor integrado con procesador (o también denominado industrial)
- Procesador sin cultivo (o planta)



Según la fuente de información citada, existen diversas clasificaciones para estos perfiles. Para la Asociación Gremial de Mitilicultores de Chile, la categorización de productores se debe realizar en función del volumen de producción. Los productores menores corresponden a aquellos con menos de 2.000 toneladas de materia prima, los medianos asociados a una producción entre 2.000 y 4.000 toneladas y los grandes con sobre 4.000 toneladas por ciclo productivo. Distinta es la visión del Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura, quien categoriza de acuerdo a las hectáreas concesionadas.

Con respecto a los industriales, estos se identifican como medianos o grandes en relación a la capacidad de elaboración de producto final, siendo las 2.500 toneladas la cota que separa ambos grupos.

a) *Captación de Semillas*

La obtención de semilla se realiza mediante captación natural en zonas de reproducción del chorito de banco natural o donde existen cultivos, siendo el desarrollo de hatcheries alternativas que por lo pronto no presentan en Chile ni en el mundo soluciones que logren costos y rendimientos apropiados para la industria.

Para el abastecimiento de semillas, los mitilicultores tienen varias modalidades, ya sea realizar la captación en su propia concesión, comprar el servicio de captación en lugares tradicionales, comprar el servicio de captación en diversos centros privados que ofrecen distintas modalidades de servicios de captación de semilla, comprar las semillas en colectores, comprar las semillas a granel.

Respecto de semilleros, existen 5 grandes áreas para la captación: Yaldad, Ilque- Huelmo, Quillaipe-Metri, Estuario del Reloncaví y Hornopirén-Pichicolo.

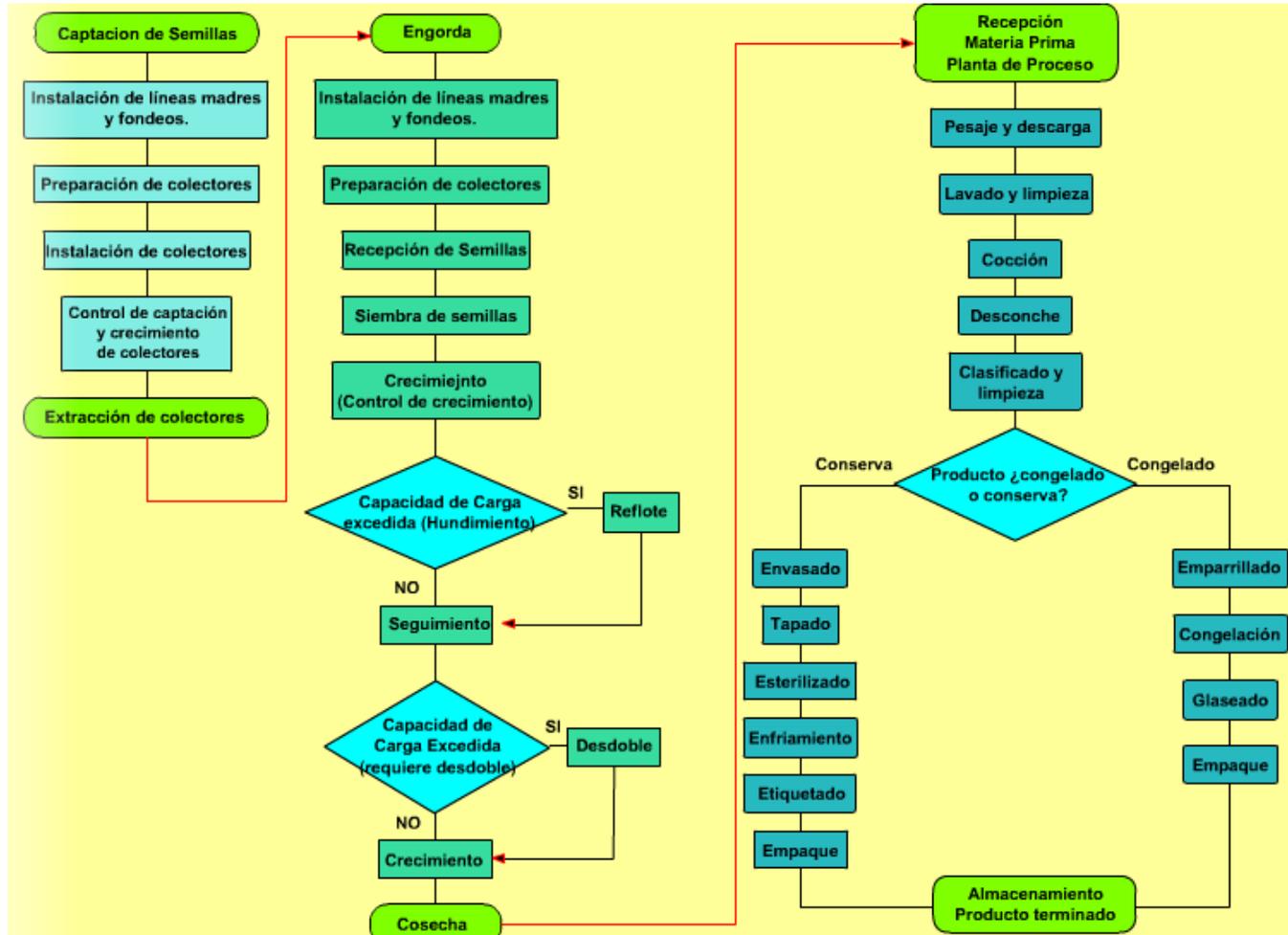


Figura 20. Diagrama de flujo del ciclo productivo (www.moluscoschile.cl).



Esta actividad puede realizarse con un muy bajo nivel de inversión y en pequeñas superficies. Se ha definido que en 5 hectáreas puede colocarse 20.000 colectores de los cuales se obtendrá más habitualmente entre 8 a 12 kilos de semilla por colector (Bagnara *et al*, 2008). Los colectores utilizados son de paño de red en desuso y red trenzada, puestos en sistema suspendido y su longitud es de 4-8 m. La densidad de colectores por unidad de sistema suspendido es mayor que la de las cuelgas de crecimiento llegando, por ejemplo, a 10-15 colectores/m de línea madre. Estos son puestos generalmente a partir de octubre y mantenidos entre 4 a 6 meses. Este período coincide con la época de desove y reclutamiento (Pizarro, 2008)

Un parámetro estimado de producción es que 1 kilo de semilla produce potencialmente 10 kilos de choritos.

Entre los productores de semillas se observa una variedad de participantes, desde pequeños productores hasta empresas de gran envergadura que han ingresado a la industria en el último tiempo y comienzan a generar sus centros semilleros.

b) Centros de engorda.

Los cultivos se desarrollan principalmente en el Archipiélago de Chiloé y en Calbuco, debido a la calidad de las aguas y a las condiciones ambientales favorables para el desarrollo de este recurso. Chiloé representa el 81% por ciento de la producción, siendo secundada por la zona de Calbuco y Puerto Montt.

A inicios de la década del 90, existían principalmente balsas de madera, generalmente de 4 x 6 m, sólo pocos experimentaban con sistemas suspendidos denominados long-line. Hacia fines de la década del 90 se comienza a utilizarse los long-line dobles de 100 y 150 m sostenidos por flotadores cilíndricos principalmente poliestireno expandido 200 y 250 l, desnudos o forrados. A comienzos del 2000, comienzan a incorporarse boyas de plástico, para long-line dobles y algunos aumentan la longitud de sus líneas a 200 o 300 m, siendo más exitosas las de 150 metros.

Hoy existe la tecnología para realizar todos los diseños del sistema y los cálculos correspondientes de fondeo y materiales necesarios para que el sistema no colapse por lo cual las empresas pueden instalar sus centros con seguridad en profundidades de hasta 200 metros.

El sistema de producción generalmente no contempla manejos adicionales entre siembra y engorda, pues las cuerdas son sembradas para llegar a la cosecha sin necesidad de posteriores raleos o desdobles. La cosecha generalmente es manual, realizada por cuadrillas de trabajo apoyados de una plataforma de trabajo que cuenta con teclas y roldadas. En ocasiones los productores pueden contratar el servicio a terceros (Pizarro, 2008).

c) Industrialización en plantas de proceso

En Chile los productos congelados y enlatados son los dominantes, en el caso de congelados que representa gran parte de volumen exportado, casi toda la producción es de carne de choritos con



algunas producciones menores de empacado al vacío entero y también la presentación de media concha. En la medida que ha crecido la industria chilena de mitílicos se ha ido especializando en productos elaborados. Si bien desde su origen hay una participación de la industria conservera con predominancia de esa forma de elaboración y venta en lo industrializado, desde el año 2000 se revierte esa característica y pasa a tener preponderancia la producción de choritos congelados.

Las empresas dedicadas al procesamiento y elaboración de mitílicos suman 36 de acuerdo a los datos de la Mesa de Mitílicos, las cuales se concentran en Puerto Montt, Chiloé y Calbuco. Cabe señalar que la categorización de las plantas de proceso en Chile está relacionada primero con la calidad de la infraestructura que estas poseen y de los procesos que son capaces de realizar, lo que les abre la posibilidad de exportar a mercados con mayores exigencias sanitarias, las de tipo A permiten exportar a los mercados de Estado Unidos, Europa, y sudeste asiático, las de tipo B permiten la entrada a los mercados existentes dentro de América latina y por último las de tipo C y D permiten la venta de productos marinos para consumo directo dentro del Chile.

5.13.1.2 Actividades primarias

Las actividades de la cadena de valor constituyen la base de los factores controlables para lograr superioridad competitiva. Su análisis lleva a la identificación de los factores críticos de éxito que son centrales para competir y a la comprensión de cómo desarrollar las competencias singulares que proveen la base para un sólido liderazgo.

a) Logística de entrada

Respecto de los Insumos para manipulación y transporte de materias primas, se verifica la necesidad de mejorar los formatos y materialidad de los insumos actualmente utilizados tanto para semillas como cosechas, mediante la búsqueda de nuevas soluciones que permitan la disminución de pérdidas por rompimiento o condición de los individuos trasladados entre centros.

Al mismo tiempo es necesario buscar alternativas de acopio y transporte que consideren tecnologías que aseguren las características organolépticas de las materia primas, tal como ocurre en otras industrias acuícolas, dejando de lado los sistemas de transporte en sacos o mallas para pasar a la utilización de bins, maxisacos o sistemas de bandejas.

b) Operaciones

La historia de la mitilicultura como la segunda actividad económica del área acuícola, es reciente y exitosa, lo cual ha garantizado un claro camino de liderazgo mundial. Este proceso de aprendizaje se ha sustentado fundamentalmente en la utilización de las ventajas comparativas que ofrece la Región de Los Lagos para el cultivo de esta especie como clima, geografía y calidad del agua; y la maximización de las ventajas competitivas a través de la búsqueda y adaptación de tecnologías externas, la generación de una oferta de proveedores locales, la fuerte inversión e infraestructura y el fortalecimiento del capital humano.



Las crecientes proyecciones de venta de los actuales y potenciales mercados exigen estándares de calidad e inocuidad. Así, para potenciar las actuales tasas de crecimiento de la industria, se requiere una rápida búsqueda de alternativas que apunten a solucionar los puntos críticos que le restan productividad y competitividad a la industria de los mitílidos en Chile.

En este sentido, la industria debe resolver una serie de factores limitantes asociados principalmente con aspectos biológicos, sanitarios, uso de espacios y de sustentabilidad, que de resolverse adecuadamente permitirán consolidar a la industria a través del aumento de su producción, la disminución de los costos en sus fases primarias mediante la incorporación de procesos de innovación, tecnologías y de nuevas estrategias para lograr instalar a nuestra industria como productora y competidora de clase mundial.

Al respecto, según lo indicado por Yohana González de AMICHILE, una de las aristas de trabajo de esta Asociación Gremial está orientada al estudio de la capacidad de carga de las principales zonas productivas de la región, la implementación de modelos de capacidad y el ordenamiento territorial, las que junto a iniciativas, como las agrupaciones de concesiones promovidas por SUBPESCA, buscan obtener beneficios asociados al ordenamiento productivo y la economía de escala.

En relación a la identificación de necesidades, especialmente en lo relacionado con los aspectos productivos, la fase de captación semillas debe redoblar esfuerzos en el manejo de los parámetros óptimos de puesta de colectores, el estudio de las variables que generan incertidumbre en el proceso de captación de semillas y la necesidad de mejorar métodos y procesos productivos para el aumento de producción de semillas utilizables en la fase de engorda.

Para la misma fase, pero asociado a tecnologías productivas, las principales carencias en la etapa de captación son la falta de equipos y maquinarias para la automatización y estandarización de diversos procesos productivos, como por ejemplo, en la elaboración y puesta de colectores, en las faenas de cosecha, en obtención de semillas seleccionadas y desgranadas, la implementación de tecnologías para cosecha submarina para optimizar rendimientos, tiempos y costos de captación, entre otros.

Al respecto el desarrollo de tecnología de hatchery surge como una alternativa siempre y cuando ésta pueda en el futuro lograr una productividad adecuada a las necesidades de la industria, especialmente en lo relacionado a costos y rendimientos.

Desde el punto de vista de los servicios de apoyo, corresponde a los servicios de monitoreo oceanográfico y larvario en la columna de agua que permitan mejorar los procesos de captación y rendimiento de las actuales áreas de captación y la búsqueda de nuevas áreas apropiadas para el desarrollo de captación del medio natural.

Sobre la fase de engorda, las brechas asociadas a aspectos productivos se concentran en la falta de homogeneidad y estandarización productiva que permita mejores rendimientos en los cultivos, la



necesidad de metodologías, técnicas y estrategias de manejo productivo que optimice los procesos de siembra y cosecha, y la necesidad de potenciar los diversos procesos en aquellas empresas de menor tamaño con el desarrollo de tecnologías accesibles en costo para disminuir las brechas existentes.

En el aspecto tecnológico se detecta la necesidad de contar con mejores técnicas, prácticas y métodos de producción que permitan hacer más eficientes los procesos de siembra y cosecha, el manejo en el agua de la producción y sistemas que permitan conocer el estado de cultivos en términos de biomasa y el uso espacios disponibles para la producción.

Adicionalmente surge la necesidad de implementar nuevos sistemas de cultivo como líneas sinfín, líneas sumergidas, en zonas más expuestas, etc.; junto a sistemas de acopio y transporte de cosechas con la finalidad de disminuir pérdidas, reducir tiempos y desechos producidos.

Con respecto a los servicios de apoyo, se detectan ineficiencias y carencias en los servicios de siembra y cosecha relativos al grado de profesionalización, n° de prestadores, uso de mecanización y costos de dichos servicios; adicionalmente se verifica la necesidad de contar con lugares habilitados como sectores de playa y centros de desembarco a lo largo de la Región de Los Lagos con servicios para descarga y estiba de materias primas adecuados a la mitilicultura, además de servicios de transporte marítimo y terrestre de cosechas que cuenten con mejores condiciones de acopio y mantención de dichas materias primas.

Otros servicios a mejorar son los de fondeo e instalación de líneas de cultivo, dado la implicancia que tiene una mala instalación o dimensionamiento de los centros en los costos finales por efectos de pérdidas de materiales y sistemas de cultivo instalados. Adicionalmente los servicios de certificación y laboratorios, evidencian altos costos para los usuarios o productores más pequeños.

Finalmente la fase de procesamiento, y en lo asociado a la producción, se detecta la necesidad de contar con un mejor abastecimiento de materia prima en calidad, cantidad y oportunidad, especialmente en lo relacionado con materia prima de calidad más homogénea para mejorar los rendimientos finales de los productos elaborados.

Complementando lo anterior, se identifica entre las principales necesidades, carencias y obstáculos, la falta de nuevas técnicas y prácticas productivas que permitan contar con materia prima año completo, la falta de estrategias de planificación de producción de la industria en general, también se señala la escasa utilización de tecnologías limpias, como UV y ozono; y biotecnología como fuentes de solución a los problemas actuales y para la búsqueda de nuevos desarrollos y subproductos procesados con potencial en nuevos nichos de mercado.

Adicionalmente, se identifica la necesidad de fortalecer las capacidades del capital humano de la industria en general, tanto en términos de uso de nuevos conocimientos y tecnologías, como en el adiestramiento en la utilización de equipamientos y maquinarias de interés de la Industria.



c) Logística de salida

Chile ha sido reconocido mundialmente como una potencia alimentaria en lo relacionado a pesca y acuicultura, por lo que una de las principales fortalezas de la industria tiene relación con la consolidación de sus canales de comercialización.

d) Marketing y ventas

Uno de los principales esfuerzos de los exportadores, de las organizaciones gremiales y de las entidades del fomento del Estado como Corfo y ProChile, está orientado a la diversificación de los mercados de destino de los productos de la mitilicultura.

Tal como se señaló en el análisis de la demanda, la serie cronológica de las exportaciones de chorito muestra que los mercados de destinos se han mantenido prácticamente inalterados durante la última década. Actualmente el principal destino es Europa dado que España concentra el 18% de la demanda, seguido por Francia con el 13%, Estados Unidos con el 13%, Italia con el 10% y Rusia con el 9%.

Las principales brechas se presentan por esta tradicional concentración de mercado que no sólo hace vulnerable a la industria nacional frente a los avatares de un mercado particular, sino que limita la capacidad productiva.

Según comentó Yohana González de AMICHILE, la industria posee capacidad de crecimiento en la medida que el mercado lo demande y es por ello que se trabaja fuertemente en consolidar la apertura de los mercados trabajados durante los últimos años: Rusia, Brasil, China, entre otros.

Con respecto al mercado nacional, las iniciativas desarrolladas para la promoción del consumo nacional, como el "Diseño de estrategia de imagen y posicionamiento para el mercado nacional" elaborado por el Programa Territorial Integrado - PTI Mitilidos, no cumplió en su momento con las expectativas de los gremios, particularmente por el retorno de los recursos invertidos en iniciativas orientadas a potenciar el consumo interno. Al respecto, y sólo en términos de rentabilidad, los recursos invertidos en apertura de mercados externos tienen mayor rentabilidad que los orientados al mercado nacional.

e) Servicio

El área del servicio de post venta es fundamental para consolidar la fidelidad de los clientes con el producto, y es una de las tareas a fortalecer especialmente en momentos en que la diversificación y consolidación de mercados es un punto crítico para el sector miticultor.

5.13.1.3 Actividades de apoyo

Tal como se mencionó anteriormente, las actividades de apoyo están esparcidas, abarcando todos los aspectos de la organización.



a) Infraestructura de la firma

En cuanto al ámbito infraestructura productiva, se verifican como principales carencias, obstáculos y necesidades tecnológicas el deficiente desarrollo de infraestructuras productivas en mar y tierra, como por ejemplo plataformas mecanizadas de trabajo, barcazas adaptadas a la mitilicultura, plataformas especiales adaptables a condiciones de trabajo en zonas más expuestas, infraestructura para carga y descarga de cosechas, como principales aspectos.

Con respecto a la fase de procesamiento, se estima que existe capacidad de procesamiento ociosa que no es cubierta por la actual capacidad productiva de los centros de engorda (Pizarro, 2008).

Con respecto a la infraestructura asociada al transporte, es necesario destacar que dadas las características de la Macrozona Austral, el sector acuícola utiliza un sistema de transferencia multimodal, marítimo-terrestre y aéreo, para el transporte de sus insumos y productos, que dado su dinamismo y orientación exportadora, es necesario evaluar permanentemente.

Los mayores niveles de congestión ocurren en los puntos de transferencia modal marítimo-terrestre; que un problema a resolver es la inexistencia de operadores regulados en las facilidades portuarias públicas, lo que genera riesgos sanitarios y de eficiencia; que para Los Lagos los ejes viales ruta 7 (Puelche/Hornopirén), ruta costera Chiloé (Quemchi/Dalcahue), son las rutas principales para el transporte del sector; y que el grado de congestión vial en el tramo Castro/Quellón, permite vislumbrar la necesidad de mejoras en cuanto a la ampliación de caminos.

Existe una cartera de iniciativas compuesta de 20 proyectos, de los cuales 9 corresponden a infraestructura vial y 7 proyectos portuarios para la Región de los Lagos. (Acua Ltda., 2012)

b) Manejo de recursos humanos

En cuanto a la mano de obra de la industria, las principales falencias y necesidades identificadas guardan relación con la falta de mano de obra calificada, semicalificada y no calificada en la industria, segmento que es el de mayor presencia.

Según lo antecedentes presentados por la Dirección del Trabajo, respecto a las condiciones de trabajo en la industria del chorito para productores con más de 10 trabajadores, las funciones específicas consignadas a labores productivas representan el 81,4% de las contrataciones y éstas corresponden a jefes de centro, asistentes de centro, buzos mariscadores básicos, buzos mariscadores intermedios, operarios, administrativos en área productiva y otros trabajadores como jefes de patio, apoyo productivo, personal de mantención. De este universo, el 76,7% de los ocupados en labores productivas cumplen función o cargo de operarios (**Figura 21**).

Para el caso de las plantas de proceso, las que concentran el mayor volumen de contratación, el 78,8% de los trabajadores corresponden a personal no calificado y el 15,7% a profesionales, técnicos y trabajadores calificados que se desempeñan principalmente en la dirección y control del proceso de elaboración.

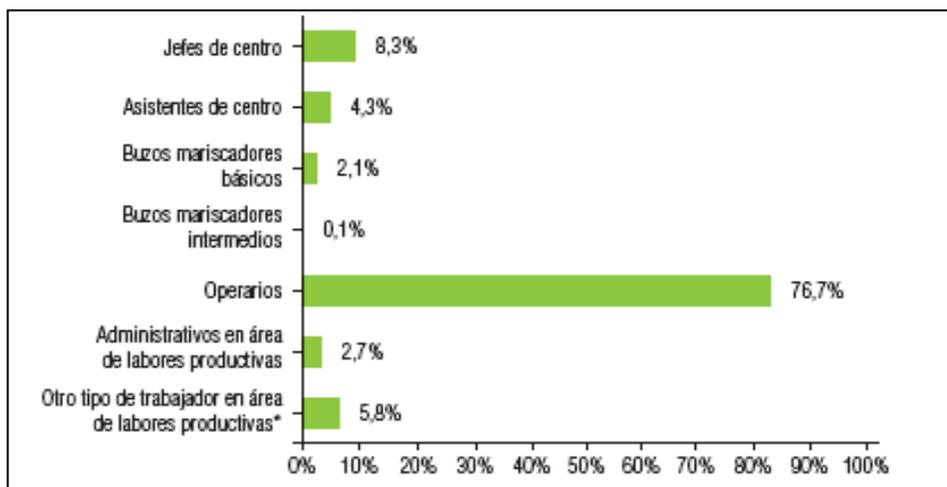


Figura 21. Distribuci3n porcentual del personal que realiza labores productivas contratado en centros de producci3n con m3s de 10 trabajadores (D3az, 2010).

Esto dado que los actuales sistemas de producci3n utilizados requieren la realizaci3n de muchas faenas manuales o tradicionales tanto para la siembra como cosecha, por lo que se requiere de muchas horas hombre para realizar los diversos procesos productivos tanto la fase de captaci3n como de cultivo mismo.

Se requiere en la actualidad una mayor calificaci3n y adiestramiento del recurso humano y fortalecimiento del capital humano que posee la industria, raz3n por la cual se hace imperioso desarrollar programas de adiestramiento y de formaci3n de capacidades t3cnicas relevantes a todo nivel, con miras a fortalecer la base de sustento actual de la cadena productiva (Pizarro, 2008), especialmente considerando el nivel de escolaridad presente en los trabajadores, seg3n muestra la **Tabla 31.**

Tabla 31.
Grado de escolaridad de los trabajadores de empresas de chorito.

Grado de escolaridad	Hombres	Mujeres	Total
B3sica incompleta	18,8	19,9	19,5
B3sica completa	18,6	18,3	18,5
Media incompleta	14,3	20,4	17,9
Media completa	34,3	37,0	35,9
Superior incompleta	1,9	1,0	1,4
Superior completa	12,0	3,1	6,7
Total	100,0	100,0	100,0

Fuente: D3az, 2010.



Adicionalmente, el análisis de caso presentado por la Dirección del Trabajo, da cuenta de brechas importantes relacionadas con remuneraciones en comparación con otros sectores industriales. Se indica que es posible concluir que las remuneraciones promedio imponibles de los trabajadores de la industria de choritos son bajas debido principalmente a que la cadena productiva agrega poco valor al recurso chorito, en tanto sale al mercado de destino con reducida transformación. O, dicho de otro modo, que los trabajadores cumplen su actividad realizando, en general, operaciones manuales con ayuda de herramientas simples, dado lo cual no requieren niveles de calificación o aprendizaje sofisticados (Díaz, 2010).

Otra de las brechas tiene relación con higiene y seguridad, particularmente con la necesidad de generar de acciones y procedimientos preventivos que eviten accidentes laborales y enfermedades profesionales. Las estadísticas del periodo analizado indican que un 6,6% del total de trabajadores contratados, presentaron en los últimos seis meses licencias por accidentes y enfermedades derivadas del trabajo. Sin embargo el dato más fuerte, es que en el último año calendario fueron consignados sendos accidentes con resultado de muerte para trabajadores (Díaz, 2010).

Otra de las aéreas con brecha tiene relación con la organización sindical e instrumentos colectivos. Si se analizan sólo las empresas de mayor tamaño, sólo el 29% registra conformación sindical, un 25% instrumentos colectivos y 33% comités bipartitos de capacitación. Lo anterior cobra gran relevancia si se considera que este último es una herramienta central para elevar el capital humano y con ello la productividad del trabajo.

Finalmente destacar las brechas de género, orientadas principalmente a la disponibilidad de salas cunas, las diferencias salariales y la segmentación según puesto de trabajo o función. Dado que los hombres se desempeñan mayoritariamente en tareas del área productiva, tiene una mayor estabilidad laboral que las mujeres que se desempeñan principalmente en plantas de proceso, donde hay un importante porcentaje de contratos temporales.

c) Desarrollo de tecnologías

En el área del desarrollo de tecnologías, los esfuerzos se deben orientar hacia la generación de mejoras en la estandarización productiva, la optimización logística, la condición sanitaria y fortalecimiento de competencias del recurso humano.

Se identifican principalmente tecnologías y técnicas orientadas a la selección, clasificación y desgrane de cosechas tanto para semillas como para engorda, las que permiten un mejor manejo de densidades de siembra; tecnologías de cultivo smart line, sistemas de cultivo sumergido y de zonas más expuestas. Asimismo, es relevante la utilización de mejores sistemas y técnicas de análisis de aguas para captación de semillas y para acopio y transporte de materias primas, con la finalidad de aumentar la eficiencia en la producción y la disminución de pérdidas por desprendimiento o deterioro de la condición de los individuos cosechados.

La tecnología de hatchery aparece como alternativa tecnológica relevante en la medida que las técnicas actuales puedan ser mejoradas en cuanto a capacidad productiva de gran escala en



espacios reducidos y que garanticen costos de producción acordes a la realidad de la mitilicultura nacional. Otro tipo de tecnologías relevantes se refieren a aquellas que permitan un manejo de producción para año continuo y aquellas de información satelital.

En relación a los conocimientos relevantes para el sector, destacan aquellos relativos a la determinación de capacidades de carga de zonas de cultivo, actuales y potenciales, el establecimiento de conocimientos e información de disposición amplia para productores sobre parámetros y variables ambientales y el desarrollo de métodos in situ de detección de toxinas.

En este contexto se hace necesario el fortalecimiento de organismos o plataformas con recursos humanos profesionalizados de apoyo a la industria y que actúen en concordancia con los requerimientos concretos de la industria.

d) Adquisiciones

Las brechas identificadas en adquisición de insumos y materiales para la etapa de mar guardan relación con cuerdas y cabos, donde existe la necesidad de estandarizar la calidad de los múltiples materiales utilizados tanto en captación como fase cultivo, y por otra parte la búsqueda de nuevos materiales idóneos a las condiciones propias de la mitilicultura nacional. En este sentido, el alto costo de los insumos, cabos mussels, también se presentan como un obstáculo para un mejor desempeño de la actividad sobre todo para pequeños productores.

Respecto de los insumos de flotación, existe un alto consenso en los productores más pequeños respecto del alto costo relativo de flotadores para mitilicultura, siendo estos el insumo más caro en la actividad. Actualmente se verifica la necesidad de mejorar la materialidad de este insumo especialmente ante la puesta en vigencia de la normativa establecida en el Reglamento Ambiental para la Acuicultura (RAMA) relativa los flotadores para colectores y cultivo de choritos instalados en la jurisdicción de Castro.

En lo relativo a empaques del producto final, existe la necesidad de contar con nuevas alternativas tanto en materialidad como formato para la elaboración y ampliar los nichos de comercialización de productos finales a mercados destinos que exigen mayor valor agregado o mayor sofisticación en la presentación del producto final.

La sistematización del análisis interno se muestra en la **Figura 22**.

5.13.2 Análisis del medio externo

La definición de la posición competitiva de un negocio requiere de la evaluación de la industria en la que está inserta. El marco de referencia más influyente y el más ampliamente empleado es el modelo de las 5 fuerzas propuestas por M. Porter, quien postula que hay 5 fuerzas que conforman la estructura de la industria y dan cuenta de las relaciones que se establecen entre estos componentes.



5.13.2.1 Amenaza de nuevos participantes

Si bien la industria mitilicultora es la segunda en importancia del sector acuicultora nacional, existe una serie de condiciones del entorno que deben ser mejoradas para consolidar a este sector industrial.

Las principales amenazas para la incorporación de nuevos participantes tienen relación con la inversión y con la rentabilidad esperada. La industria ha realizado altas inversiones, similares a las realizadas en la industria salmonera, y la rentabilidad percibida durante los últimos años, especialmente en el segmento industrial, no ha tenido los resultados esperados. Según información entregada por AMICHILE, hay participantes que se mantienen en el sector principalmente por la alta capacidad instalada más que por los retornos generados. La búsqueda de rentabilidad se orienta al volumen de ventas.

Por otra parte, la capacidad de crecimiento por lo pronto se orienta a las fusiones, como la de Saint Andrews Smory Delicacies S.A. y FYS Chile S.A., y compra de concesiones, ya que el otorgamiento de concesiones por parte de la Subsecretaría de Pesca y Acuicultura, se encuentra congeladas hasta el 2015.

Otra de las amenazas identificadas tiene relación con la dependencia de variables ambientales. Mucho se ha hablado sobre la importancia de la captación de semilla para el éxito del proceso productivo, como también del desconocimiento existente sobre los factores que influyen en su variabilidad interanual. Al respecto, se espera que iniciativas orientadas a fortalecer el conocimiento, como las ejecutadas actualmente por el Instituto Tecnológico de la Mitilicultura, INTEMIT, entre otras, aporten en este sentido.

Adicionalmente la industria presenta grandes desafíos en el área normativa sanitaria y ambiental que se mantienen pendientes. En términos sanitarios, particularmente sobre las nuevas técnicas de detección de toxinas marinas que exigirá el mercado a partir del 2015, su aplicabilidad y técnicas alternativas.



Infraestructura	Fortalecer infraestructura productiva de medianos y pequeños productores; junto a la infraestructura de apoyo a la industria			
Manejo de recursos humanos	Calificación de mano de obra y resolución de brechas en condiciones salariales, higiene y seguridad, organización sindical y género			
Desarrollo de tecnologías	Generación de mejoras en la estandarización y optimización productiva, desarrollar conocimiento de condición sanitaria y ambiental.			
Adquisiciones	Sector de bienes y servicios consolidados. Fortalecer productos específicos para el sector mitilicultor			
	Fortalecer transporte para optimizar calidad	Alta capacidad técnica y productiva Optimización del uso de los RRNN disponibles y que diferencian el producto nacional Producto de elevada calidad a potenciar		Mercados tradicionales cautivos y canales de comercialización Requerimiento diversificación de mercado Consolidación de marca sectorial
	Logística de entrada	Operaciones	Logística de salida	MKT y ventas
				Servicios

Figura 22. Sistematización de la cadena de valor.



Con respecto a las oportunidades, grandes capitales chilenos originados en la industria pesquera y salmonera derivaron en la mitilicultura ante la necesidad de diversificar su producción. Con este respaldo y canales de comercialización desarrollados para los productos del mar, la industria del chorito, que presenta tasas crecientes de consumo en el mundo, se percibió como una muy buena alternativa. Sin perjuicio de lo anterior, una de las principales áreas de trabajo durante los últimos años, ha sido la apertura de nuevos mercados, obteniendo excelentes resultados especialmente con la marca sectorial Patagonia Mussel en el mercado ruso, brasileño y prontamente se espera que en el Chino.

El apoyo de ProChile con su diversos programas, junto a otras iniciativas ejecutadas anteriormente como el apoyo de Corfo al Cluster y al PTI, buscan apoyar el crecimiento del sector, sin embargo se percibe la necesidad de contar con una mayor respaldo del Estado en herramientas de fomento para consolidar el crecimiento del sector. Actualmente con recursos del Gobierno Regional de Los Lagos se estableció la Mesa de Mitílicos, instancia orientada a coordinar acciones entre organismos públicos y privados, proponiendo lineamientos estratégicos de fomento productivo e innovación y que aporten a la competitividad y al desarrollo sustentable del sector, por lo que se esperan avances en las 4 temáticas abordadas para los comités establecidos: fomento, normativa sectorial, innovación y capital humano.

5.13.2.2 Rivalidad entre competidores

Chile se ubica dentro de los principales productores de mitílicos a nivel mundial. Tradicionalmente ocupó el cuarto lugar después de China, Tailandia y España, sin embargo durante el 2013 se posicionó en el tercer lugar desplazando a España. Con respecto a las dificultades que enfrentan estos países y que posicionan a Chile como productor de gran calidad, comentar que China se caracteriza por un producto de menos calidad debido a los problemas sanitarios que enfrenta, la calidad de sus aguas y las propiedades físicas del producto final, por su parte España registra recurrentes fenómenos de floración de algas nocivas y restricciones para el crecimiento en zonas tradicionalmente productoras como Galicia.

Al respecto Chile se ha visto enfrentado a eventos de floración puntuales siendo controlados sus efectos a través del Programa de Sanidad de Productos Bivalvos (PSMB) y otras instancias de seguimiento del fenómeno como el Programa de Marea Roja desarrollado por el Instituto de Fomento Pesquero desde Los Lagos a Magallanes.

La calidad de las aguas y las condiciones ambientales del mar interior de Chiloé y Llanquihue, son extremadamente propicias para el crecimiento de los mitílicos, condiciones que aseguran un producto de calidad mundial, las cuales deben ser potenciadas para sostener y aumentar la capacidad de crecimiento por la que apuestan los distintos sectores productivos, ya que el incremento de los retornos que la industria espera obtener son a través del incremento productivo, más allá del valor agregado que se pueda dar al producto.



La convivencia de empresas de distinto tamaño productivo y nivel de integración agrega una dinámica industrial interesante. Los pequeños productores centran su fortaleza en la calidad del producto ofrecido a las plantas o industriales de mayor, para quienes este suministro permanente permite apoyar la fase de instalación y crecimiento, diversificando el origen de las zonas de extracción, ampliando las ventanas de cosecha y con ello el ingreso de materia prima al proceso de elaboración y reduciendo el riesgo de presencia de marea roja que afecte la disponibilidad de producto final. El aspecto negativo de esta sociedad compra-venta es que los productores tienen la percepción de que las plantas deciden arbitrariamente sobre precio, cantidad y mermas.

Por otra parte, la presencia de grandes capitales ha generado la operación de empresas integradas verticalmente las cuales trabajan con altos volúmenes de producción, lo anterior debido a la necesidad de competir con volúmenes importantes para ingresar a nuevos mercados que requieren de éstos para operar, además de generar economías de escala que permitan respaldar el grado de tecnificación incorporado.

En esta diversidad de escenarios, la asociatividad cobra importancia, acercando posturas entre los distintos actores de la industria, apoyando y representando a los miembros a través de una estrecha relación entre los organismos públicos y privados y contribuyendo al desarrollo, perfeccionamiento y reconocimiento de la industria nacional. Sin embargo existe diversidad entre las distintas asociaciones en términos de organización, planes de trabajo, recursos técnicos y financieros para la ejecución de sus respectivas misiones.

Las organizaciones presentes son AG de Cultivadores de Moluscos de Calbuco, AG de Mitilicultores de Quellón, AG de Acuicultores y Trabajadores del Mar Estero Yaldad, AG de Mitilicultores de Chile AMICHILE, AG de Productores de Mitílicos de Chiloé, AG de Acuicultores de Queilén, AG de Microempresarios de la Mitilicultura de Hualihué.

5.13.2.3 Amenaza de sustitutos

Dentro del rubro de los mitílicos, son los choritos los que representan el segmento más significativo con más del 97% de la producción. Sin embargo existe un potencial escasamente explotado en las cholgas y el choro zapato, que según lo expuesto en el encuentro “Diálogo para la productividad de la Acuicultura” convocado por el Ministro de Economía durante Octubre del presente año.

5.13.2.4 Poder de negociación de los compradores

El tipo de relación con los compradores, y por ende su poder de negociación, depende de la confianza establecida tanto con el mercado de destino, como con el comprador. Esta claramente definido que en la medida que los compradores estén cautivos las facilidades de intercambio serán mayores.



Los requisitos para el ingreso de producto, dependerán de los requisitos establecidos por cada país. En este sentido los requisitos establecidos por el mercado tradicional de la mitilicultura, Europa y estados Unidos, son ampliamente conocidos y no representan un gran desafío. Distinta es la situación con los nuevos mercados que están siendo explorados por la industria: Rusia, Brasil y China.

El mercado ruso es definido como complejo, especialmente por los requisitos documentales, solicitud de muestras, etiquetado y poca seriedad a la hora de los acuerdos, entre otros. El mercado brasileño se ha vuelto más exigente por la necesidad de resguardar su patrimonio sanitario y debido a la detección de ingresos de producto irregulares especialmente desde China.

Para ingresar a Brasil, todos los productos de origen animal, frescos o procesados, están sujetos a aprobación previa de sus rótulos/etiquetas por parte del Ministerio de Agricultura, Pecuaria y Abastecimiento (MAPA), específicamente evaluados por parte del Departamento de Inspección de Productos de Origen Animal (DIPOA). Actualmente la obtención del registro DIPOA, válido por planta y producto autorizado, está demorando de 3 a 4 meses, pero una vez obtenido tramitación de despacho es expedita.

El mercado asiático en general es muy exigente en cuanto a calidad del producto, debido a su amplia experiencia como potencia acuícola. Están especialmente interesados en conocer en terreno todo el proceso de producción y a realizar pruebas a los productos.

Con respecto al pago de compromisos, existen varias alternativas que dependerán de la confianza e historial establecido con el comprador. Las más utilizadas son las cartas de crédito en las modalidades abierto y confirmado, 30, 45 o 60 días, o más; y la Cash Against Document (CAD), la que consiste en transferir al importador los documentos que representan la propiedad de la mercancía, contra el pago efectuado por la misma; el cual consiste en un porcentaje del orden del 20% a 30% como anticipo y el saldo contra documentos para la liberación de contenedores del puerto de destino.

5.13.2.5 Poder de negociación de los proveedores

Sin duda la existencia de una fuerte industria salmonera con amplia presencia en la zona sur de Chile ha generado, en consecuencia, una amplia variedad de empresas nacionales e internacionales productoras de bienes y servicios, que han sido aprovechados por otros rubros de la acuicultura, como la producción de mitílidos. En este sentido, la fortaleza del área de bienes y servicios hace que la integración hacia el área productiva no sea una alternativa atractiva, debido a que en esencia funcionan como un sector industrial más.

Las tareas pendientes en el área se relacionan con la prestación de servicios, especialmente en el área de las operaciones. Dada la temporalidad de prestaciones como las cosechas, existe una oferta limitada y de alto valor, lo que afecta principalmente a las empresas productoras de menos tamaño.



Pero sin duda la mayor amenaza para los proveedores y, a la vez oportunidad para la industria productora, es el bajo poder de negociación de los primeros en lo relacionado a los plazos de pago. En términos generales los plazos de pago se concentran entre los 60 y 90 días, generando normalmente dificultades en los pequeños prestadores de bienes y servicio. Esta situación debería ser regularizada con la entrada en vigencia de la reforma tributaria.

La sistematización del análisis externo se muestra en la **Tabla 32**.

5.14. Cuantificación económica social

5.14.1 Análisis del problema

El árbol de problemas, se presenta en el **Anexo 9**.

5.14.2. Evaluación económica

A partir de la recopilación de antecedentes presentados precedentemente, se establecen los parámetros utilizados en la evaluación económica.

Dado que los resultados del proyecto dan cuenta de que no hay un efecto de bioacumulación en los mitílicos bajo los escenarios analizados, la evaluación económica no considera una situación de detección de residuos de productos terapéuticos sobre la industria mitilicultora.

5.14.2.1 Variables de entrada

La determinación de los parámetros de entrada del modelo se realizó a partir del análisis de los antecedentes presentados, para posteriormente definir una distribución de frecuencia y sus parámetros para incorporar en las simulaciones.

- Tasa de crecimiento. Para la definición de la tasa de crecimiento se consideró el historial de incremento de exportaciones durante los últimos 5 años y los antecedentes entregados por AMICHILE. El valor del modelo corresponde a un 6% y la simulación se realizó con una distribución triangular con valor mínimo de -18%, valor promedio de 6% y valor máximo de 44%.
- Precio promedio. El precio del modelo se determinó con el promedio de los últimos 5 años y la simulación se realizó con una distribución normal con media de 2.276 (US\$/t) y con una desviación estándar de 257,1.
- Costo de producción. Se determinó a partir de antecedentes presentados por Pizarro, 2008, en el Informe Final de consultoría innovación tecnológica PTI industria mitílicos, y contrastados con antecedentes del sector. El valor del modelo corresponde a un 2.200 (US\$/t) y la simulación se realizó con una distribución triangular con valor mínimo de 1.900 (US\$/t), valor promedio de 2.200 (US\$/t) y valor máximo de 2.300 (US\$/t).



Tabla. 32.
Sistematización de las 5 fuerzas de Porter. Actual  futura 

		Muy poco atractivo	Poco atractivo	Neutral	Atractivo	Muy atractivo	
Amenaza de nuevos participantes							
Inversiones elevadas de capital	Alta		 				Baja
Capacidad de crecimiento efectivo	Bajo						Alto
Rentabilidad	Baja		 				Alta
Dependencia de variables ambientales	Alta		 				Baja
Canales de mercadeo desarrollado en productos del mar	Insipientes						Consolidados
Mercados limitados y tradicionales	No diversificado						Diversificado
Normativa sanitaria y ambiental establecida	General						Específica
Insentivos gubernamentales	Bajo						Alto
Especialización de activos	Alta		 				Baja
Rivalidad entre competidores							
Grandes productores a nivel mundial	Concentrado			 			Disperso
Condiciones ambientales propicias	Desconocidas						Conocidas
Capacidad de crecimiento productivo	Baja				 		Alta
Diferenciación del producto	Inexistente				 		Existente
Valor agregado	Alto			 			Bajo
Diversidad de tamaño de operación	Inexistente				 		Existente
Grandes competidores integrados verticalmente	Inexistente				 		Existente
Potencial Asociativo	Baja						Alta
Amenaza de sustitutos							
Potenciar producción de otras especies de mitilidos	Bajo						Alto
Lealtad de clientes	Baja				 		Alta
Poder de negociación de los compradores							
Fidelidad	Baja				 		Alta
Requisitos para ingreso	Bajo			 			Alto
Medios y condiciones de pago					 		
Poder de negociación de los proveedores							
Amenazas de integración	Alta				 		Baja
Diponibilidad de proveedores y productos	Baja						Alta
Desarrollo de área de prestación de servicio	Bajo		 				Alto
Pago a proveedores	Bajo		 				Alto
Estandar de productos	Bajo		 				Alto



- Dólar. El valor se determinó con el análisis de los valores diarios informados por el Banco Central desde enero del 2009 a diciembre del 2013. La simulación se realizó con una distribución normal con media de 507,04 (US\$/t) y con una desviación estándar de 35,5.

5.14.2.2 Variables de salida

Dadas las características de la evaluación, se utilizó como indicador de rentabilidad el Valor Actual Neto VAN.

Al considerar la tasa de descuento social del 2013, que corresponde a un 6%, el VAN corresponde a MM\$ 49.201 (Anexo 10).

Dada la incertidumbre que pueden presentar las variables de entrada, se realizaron 10.000 iteraciones utilizando el software @risk entregando los resultados que se muestran en la **Figura 23**.

Nota: Entrevistas realizadas:

- Sra. Johana González. Gerente Asociación Gremial de Miticultores de Chile, AMI-CHILE.
- Sra. Roxana Monsalve. Ejecutiva Regional ProChile Los Lagos.

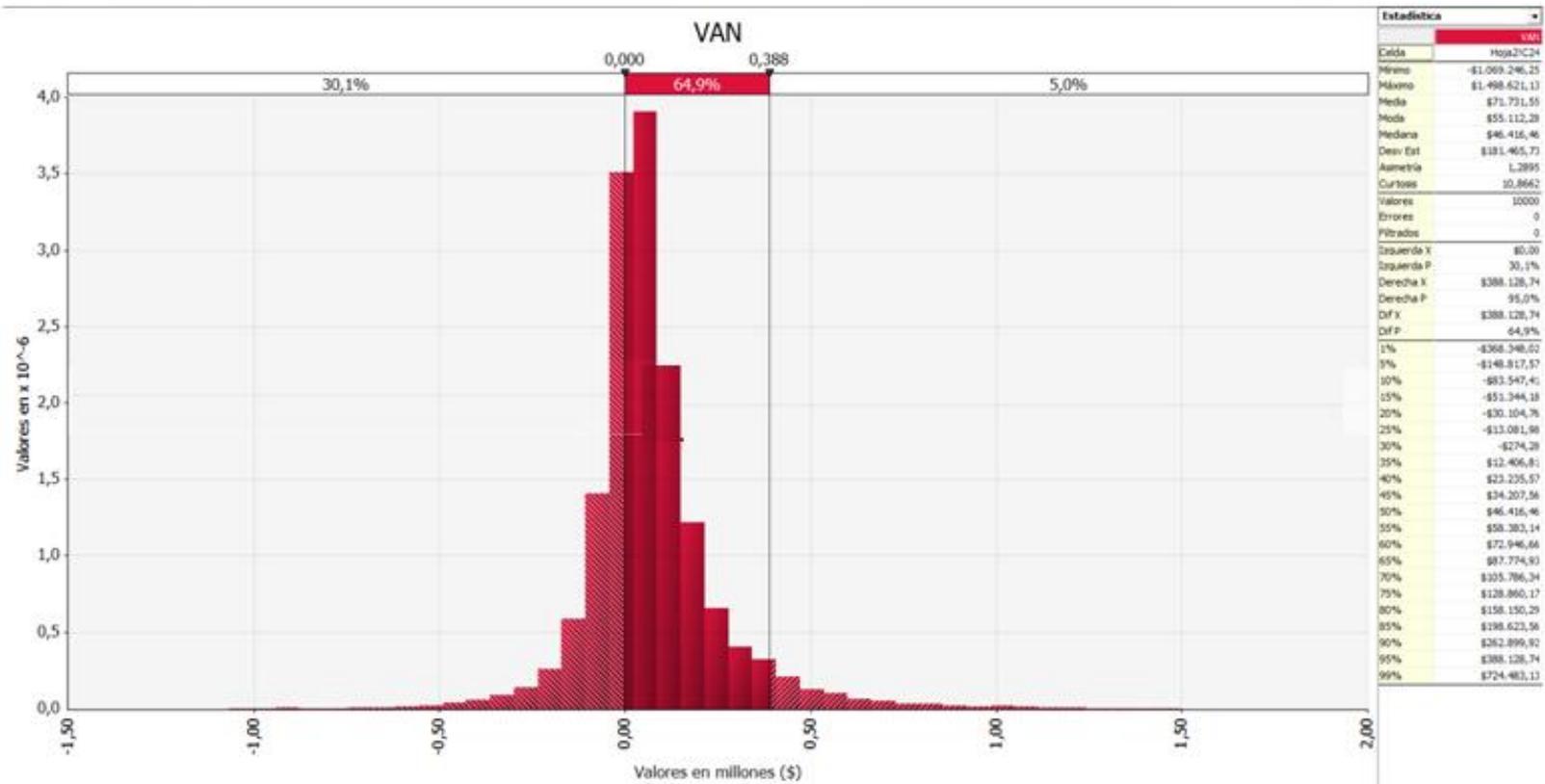


Figura 23. Resultados de simulación con @risk con 10.000 iteraciones.

5.15. Actividades Generales:

5.15.1 Documento borrador con resultados derivados del estudio para publicación científica:

Se elaboró un documento borrador en formato de publicación científica, con los resultados derivados del estudio, el que fue enviado por correo electrónico a Alejandro Barrientos y a Maureen Alcayaga, ambos representantes de Subpesca, el día 26 de Enero del presente año. Una copia del documento borrador se puede observar en el anexo 12.

5.15.2 Taller de resultados:

El día 5 de Junio de 2015, se realizó el taller de presentación de los resultados del proyecto, evento que contó con la participación de representantes de la Subsecretaría de Pesca y Acuicultura, Servicio Nacional de Pesca, CORFO, SERCOTEC y representantes de la industria Mitilicultora y Salmonera. La lista de participantes se puede observar en el anexo 13. La presentación entregada en el evento puede ser observada en el anexo 14.

6. CONCLUSIONES

1. Se realizó una caracterización de los productos antiparasitarios autorizados para su uso en acuicultura en Chile, para el control de caligidosis en salmónidos, para verificar la capacidad de ser bioacumulados por mitílidos en cultivo.
2. Se realizó la revisión de literatura nacional e internacional asociada a bioacumulación de productos terapéuticos de uso en acuicultura en especies de mitílidos. Al respecto se encontró una publicación que contempla estudios de bioacumulación de cipermetrina en *M. edulis*. No se encontraron publicaciones que contemplen estudios de bioacumulación y obtención de curvas de depleción de otros fármacos en mitílidos asociados a la salmonicultura, pero sí se encontraron algunos trabajos de bioacumulación de otras sustancias orgánicas en mitílidos.
3. No se encontraron documentos asociados a normativas internacionales que aborden la bioacumulación de productos terapéuticos de uso en acuicultura de mitílidos u otros moluscos bivalvos.
4. Se desarrollaron y validaron técnicas analíticas para la detección Azametifós, Diflubenzurón, Cipermetrina y Deltametrina mediante la técnica de HPLC, en matriz de carne de chorito chileno (*M. chilensis*).
5. Una gran ventaja de las metodologías de extracción desarrolladas para Azametifos y Diflubenzurón es que son exactamente iguales, y solo difieren en la proporción de agua del extracto final para ser inyectado en el HPLC y las condiciones cromatográficas de cada uno, lo que podría simplificar la realización de estos ensayos, pudiéndose realizar una sola extracción, para luego diluir las muestras y analizar cromatográficamente cada analito en particular.
6. La linealidad es adecuada en los rangos estudiados para todos los analitos, lo que se demuestra obteniéndose un r^2 sobre 0,99 y con la observación visual de las curvas de calibración y de los gráficos de residuales.
7. La recuperación, especificidad y precisión obtenida en los estudios es adecuada para los analitos Diflubenzurón y Azametifós.
8. La recuperación de Cipermetrina y Deltametrina es baja, pero su especificidad y precisión son óptimas.
9. Los límites de detección para Azametifos (50 ppb) y Diflubenzuron (486 ppb) son adecuados, ya que el Límite Máximo Residual (LMR) para estos analitos en salmones es de

100 y 1000 ppb, respectivamente, tomados como referencia, ante la inexistencia de LMR para estos analitos en matriz de carne de chorito.

10. Se desarrollaron los ensayos in vivo en ambiente controlado de Cipermetrina, Deltametrina, Azametifos y Diflubenzurón en el Centro de Maricultura Hueihue, pertenecientes a IFOP.
11. Al respecto, para el caso de Cipermetrina, Deltametrina y Azametifós, no fue posible comprobar bioacumulación de los antiparasitarios administrados por baño, lo que puede deberse a las bajas concentraciones utilizadas en el estudio (que corresponden a las aplicadas en la salmonicultura) y/o al tiempo de aplicación utilizado.
12. Las muestras de Diflubenzurón analizadas en un primer estudio, fueron trabajadas con una curva de calibración más baja y utilizando fortificados de 114 ppb, para obtener un límite de detección y cuantificación, que permitiera cuantificarlas.
13. Se demostró que los choritos son capaces de bioacumular Diflubenzurón, pero a concentraciones inferiores a 1000 ppb (LMR en salmones).
14. Se realizó un segundo y nuevo estudio de Diflubenzurón en condiciones controladas, utilizando una mayor dosificación de este principio activo, y realizando 4 tiempos de muestreo durante la medicación.
15. Se comprueba que los choritos son capaces de bioacumular Diflubenzurón bajo las condiciones estudiadas, con una mayor dosificación del principio activo. La concentración máxima obtenida bordea los 1000 ppb.
16. El tiempo de vida media calculado en el segundo estudio de Diflubenzurón, fue de 1.2 días, indicando que el antiparasitario es eliminado por el mejillón rápidamente.
17. Se realizaron estudios de campo para Azametifós y Deltametrina, sin lograrse detectar los analitos en cuestión, lo que concuerda con los resultados derivados de los ensayos realizados en condiciones controladas.
18. Se considera altamente improbable la detección de los antiparasitarios utilizados en la salmonicultura, para las dosis utilizadas en esta industria para combatir las parasitosis, en choritos de cultivo, al menos a las concentraciones que pudieran afectar su inocuidad alimentaria.

19. En relación a la evaluación socioeconómica efectuada, se considera que la industria mitilicultora se ha consolidado durante los últimos años como la segunda actividad productiva del sector. Sin embargo, como toda unidad productiva, presenta fortalezas y debilidades que deben ser abordadas por los productores para continuar en la senda de crecimiento logrado.
20. Las fortalezas se orientan principalmente en la capacidad técnica y productiva del sector, en tanto sus principales debilidades se enfocan en la necesidad de incrementar el conocimiento técnico, sanitario y ambiental con el objetivo de optimizar el uso de los recursos naturales disponibles y que son la fuente de diferenciación del producto nacional.
21. En su conjunto, la industria mitilicultora tiene grandes oportunidades para consolidar el trabajo desarrollado, las que se basan en el historial de Chile como potencia productiva de productos del mar y por ende con canales de comercialización establecidos para este sector industrial.
22. La amenaza identificada es que la industria no sea capaz de aprovechar estas oportunidades, debido a la alta concentración de los mercados de destino, los que prácticamente no ha variado en la última década. Por lo anterior se deben potenciar las acciones de diversificación, la promoción de la marca sectorial y la asociatividad para enfrentar con éxito las oportunidades que se presentan.
23. La evaluación económica, bajo el escenario descrito, da cuenta de un sector que debe trabajar fuertemente en aprovechar su potencial productivo. El Valor Actual Neto, en un horizonte de evaluación de 10 años, es de MM\$ 49.201, equivalente a MMUS\$ 97, cifra poco significativa para las inversiones y capacidad productiva del sector.
24. El análisis de sensibilidad consideró rangos y distribuciones de frecuencia para los parámetros de ingreso al modelo, entregando luego de 10.000 iteraciones una mediana de MM\$ 46.416, moda de MM\$ 55.112 y media o promedio de MM\$ 71.731. Otro de los parámetros de salida, indica que existe un 30% de probabilidad que el VAN sea igual a cero, bajo los parámetros planteados.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acua Ltda. 2012. Consultoría Análisis de la infraestructura para el desarrollo del sector acuícola regiones de Los Lagos Magallanes. Dirección de Planeamiento del Ministerio de Obras Públicas. 86 pp.
- Armenta S, Quintás G, Garrigues S, de la Guardia M. 2005. A validated and fast procedure for FTIR determination of Cypermethrin and Chlorpyrifos. *Talanta* Volume 67, Issue 3, 15 September 2005, Pages 634–639
- Asociación Gremial de Mitilicultores de Chile, AMICHILE. www.amichile.com
- Asociación Gremial de Mitilicultores de Chile, AMICHILE. Presentación Mejillón chileno, la proteína del futuro.
- Asociación Gremial de Cultivadores de Moluscos A.G. www.moluscoschile.cl
- Aulakh, J.S., Malik, A.K. & Mahjan, R.K. 2005. Solid phase microextraction – high pressure liquid chromatographic determination of nabam, thiram and azamethiphos in water samples with UV detection: preliminary data. *Talanta*, 66, 266–270.
- Bachelot M, Li Z, Munaron D, Le Gall P, Casellas C, Fenet H, Gomez E. 2012. Organic UV filter concentrations in marine mussels from French coastal regions. *Sci Total Environ.* 2012 Mar 15; 420:273-9.
- Balinova A. 1998. Multiresidue determination of pesticides in plants by high-performance liquid chromatography following gel permeation chromatographic clean-up. *Journal of Chromatography A*. Volume 823, Issues 1–2, 9 October 1998, Pages 11–16.
- Bagnara, M. y M. Donoso. 2008. Descripción del sector mitilicultor en la región de Los Lagos, Chile: evolución y proyecciones. En A. Lovatelli, A. Farías e I. Uriarte (eds). Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Taller Técnico Regional de la FAO. 20–24 de agosto de 2007, Puerto Montt, Chile. FAO Actas de Pesca y Acuicultura. No. 12. Roma, FAO. pp. 189–198.
- Vendendo Gizelle Cristina, Sales Fontes Jardim Isabel Cristina, Carasek Eduardo. 2012. Multiresidue determination of pesticides in industrial and fresh orange juice by hollow fiber microporous membrane liquid–liquid extraction and detection by liquid chromatography–electrospray-tandem mass spectrometry. *Talanta*. Volume 88, 15 January 2012, Pages 573–580.

- Boonchiangma S, Ngeontae W, Srijaranai S. 2012. Determination of six pyrethroid insecticides in fruit juice samples using dispersive liquid-liquid microextraction combined with high performance liquid chromatography. *Talanta*.
- Borja, À., 2002. Los impactos ambientales de la acuicultura y la sostenibilidad de esta actividad. *Boletín ISSN: 0074-0195. Instituto Español de Oceanografía. Bol. Inst. Esp. Oceanogr.* 18 (1-4), 41 - 49.
- Brondi Silvia H.G., Macedo Adriana M. and Nogueira Ana R.A.. Evaluation of QuEChERS Method for Analysis of Cypermethrin Residue in Cow's Milk. 2nd Latin American Pesticide Residue Workshop-L APRW 2009. SP-PP-2009.00278.
- Buschmann, A., Fortt, A., 2005. Efectos ambientales de la acuicultura intensiva y alternativas para un desarrollo sustentable. *Ambiente y Desarrollo.* 21, 58-64.
- Carneiro Raphaella P., Oliveira Fabiano A.S., Madureira Fernando D., Silva Gilsara, de Souza Wesley R., Pereira Lopes Renata. 2013. Development and method validation for determination of 128 pesticides in bananas by modified QuEChERS and UHPLC–MS/MS analysis. *Food Control, Volume 33, Issue 2, October 2013, Pages 413–423.*
- Carro AM, García-Rodríguez D, Gonzalez-Siso P, Lorenzo RA. 2012. Determination of chemotherapeutic agents in fish and shellfish by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Sep Sci.* 35(21):2866-74.
- Chalányová M, Hutta M, Pagác M. 2010. On-line flow-through extraction-preconcentration-large volume injection-RP LC for trace determination of pyrethroids in Slovak soil. *J Sep Sci.* 2010 Feb; 33(2):134-42.
- Chen HG, Jia XP, Cai WG, Lin Q, Ma SW. 2011. Antioxidant responses and bioaccumulation in green-lipped mussels (*Perna viridis*) under acute tributyltin chloride exposure. *Bull Environ Contam Toxicol.* 2011 Nov; 87(5):506-11.
- Chen Guogiang, Cao Pengying, Liu Renjiang. 2011. A multi-residue method for fast determination of pesticides in tea by ultra performance liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry combined with modified QuEChERS sample preparation procedure. *Food Chemistry.* Volume 125, Issue 4, 15 April 2011, Pages 1406–1411.
- Cheng Jianhua, Liu Miao, Yu Yong, Wang Xiuoin, Zhang Hangi, Ding Lan, Jin Haiyan. 2009. Determination of pyrethroids in porcine tissues by matrix solid-phase dispersion extraction and high-performance liquid chromatography. *Meat Science* Volume 82, Issue 4, August 2009, Pages 407–412.

- De La Colina, C; Baez, ME; Pena, A; Romero, E; Dios, G. 1994. Simultaneous determination of various pesticides in water by solid-phase extraction/HPLC with photodiode array detection. *Science of the Total Environment*: 153 1-6.
- Ding Yan, White Catherine A., S. Muralidhara S., Bruckner James V., Michael G. Bartlett Michael G.. 2004. Determination of deltamethrin and its metabolite 3-phenoxybenzoic acid in male rat plasma by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, Volume 810, Issue 2, 25 October 2004, Pages 221–227.
- Díaz, E., 2010. Mitílidos en la región de Los Lagos. Condiciones de trabajo en la industria del chorito. Cuaderno de investigación N° 38. Departamento de estudios. Dirección del trabajo. 186 pp.
- Dommarco R, Santilio A, Fornarelli L., Rubbiani M. 1998. Simultaneous quantitative determination of thirteen urea pesticides at sub-ppb levels on a Zorbax SB-C₁₈ column. *Journal of Chromatography A*. Volume 825, Issue 2, 6 November 1998, Pages 200–204
- EMEA, 1995. Note for Guidance: Approach towards Harmonisation of Withdrawal Periods. EMEA/CVMP/036/95-FINAL.
- Fabbri D, Baravelli V, Giannotti K, Donnini F, Fabbri E. 2006. Bioaccumulation of cyclopenta [cd]pyrene and benzo[ghi]fluoranthene by mussels transplanted in a coastal lagoon. *Chemosphere*. Aug;64(7):1083-92.
- Fang JK, Wu RS, Zheng GJ, Lam PK, Shin PK. 2010. Seasonality of bioaccumulation of trace organics and lysosomal integrity in green-lipped mussel *Perna viridis*. *Sci Total Environ*. 2010 Feb 15; 408(6):1458-65.
- Fang JK, Wu RS, Zheng GJ, Lam PK, Shin PK. 2010. Seasonality of bioaccumulation of trace organics and lysosomal integrity in green-lipped mussel *Perna viridis*. *Sci Total Environ*. 2010 Feb 15; 408(6): 1458-65.
- Ferrer I, Pichon V, Hennion M-C, Barceló D. 1997. Automated sample preparation with extraction columns by means of anti-isoproturon immunosorbents for the determination of phenylurea herbicides in water followed by liquid chromatography–diode array detection and liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. Volume 777, Issue 1, 8 August 1997, Pages 91–98.
- Fishing Partners Ltda, 2005. Estado de situación y perspectivas de la industria del chorito. Elaborado por Plaza, H., Órtúzar, y., González, M. y Aros, J.

- Gil García, M.D.; Martínez Galera, M.; Barranco Martínez, D.; Gilbert Gallego, J. 2006. Determination of benzoylureas in ground water samples by fully automated on-line pre-concentration and liquid chromatography-fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*. Vol. 1103 Issue 2, p271-277.
- Gilbert-López Bienvenida, García-Reyes Juan F., Lozano Ana, Fernández-Alba Amadeo R., Molina-Díaz Antonio. 2010. Large-scale pesticide testing in olives by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry using two sample preparation methods based on matrix solid-phase dispersion and QuEChERS. *Journal of Chromatography A*. Volume 1217, Issue 39, 24 September 2010, Pages 6022–6035.
- Gowland B, Webster L, Fryer R, Davies I, Moffat C, Stagg R. 2002. Uptake and effects of the cypermethrin-containing sea lice treatment Excis in the marine mussel, *Mytilus edulis*. *Environmental Pollution* 120 (2002) 805-811.
- Hax, A. y N. Majluf, 1994. *Gestión de empresas con una visión estratégica*. Dolmen Ediciones. 501 pp.
- Hormazabal, V., Steffenak, I., Yndestad, M., 1996. Simultaneous extraction and determination of florfenicol and the metabolite florfenicol amine in sediment by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*. 724, 364-366.
- Instituto de Fomento Pesquero, IFOP. *Boletín de Exportaciones Pesqueras de Chile, 2002 a 2013*.
- Instituto de Fomento Pesquero, IFOP. 2014. Informe Final, proyecto, "Elaboración y validación de protocolos para la aplicación de productos antiparasitarios en tratamientos mediante baños para el control de la caligidosis en salmónidos de cultivo". SUBPESCA.
- Katagi T. 2010. Bioconcentration, bioaccumulation, and metabolism of pesticides in aquatic organisms. *Rev Environ Contam Toxicol*. 2010; 204:1-132.
- Kyu Bong Kim, Michael G. Bartlett, Sathanandam S. Anand, James V. Bruckner, Hyo Jung Kim. 2006. Rapid determination of the synthetic pyrethroid insecticide, deltamethrin, in rat plasma and tissues by HPLC. *Journal of Chromatography B*, Volume 834, Issues 1–2, 13 April 2006, Pages 141–148.
- Lalumera, G.M., Calamari, D., Galli, P., Castiglioni, S., Crosa, G., Fanelli, R., 2004. Preliminary investigation on the environmental occurrence and effects of antibiotics used in aquaculture in Italy. *Chemosphere*. 54, 661-668.
- Mesa de Mitílicos Región de Los Lagos. www.mesamitilidos.cl

- Lee Sung Woo, Choi Jeong-Heui, Cho Soon-Kil, Yu Hyun-A, Abd El-Aty A.M., Shim Jae-Han. 2011. Development of a new QuEChERS method based on dry ice for the determination of 168 pesticides in paprika using tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. Volume 1218, Issue 28, 15 July 2011, Pages 4366–4377.
- Lesueur C., Knittl P., Gartner M., Mentler A., Fuerhacker M.. 2008. Analysis of 140 pesticides from conventional farming foodstuff samples after extraction with the modified QuEChERS method. *Food Control*. Volume 19, Issue 9, September 2008, Pages 906–914.
- López-López T., Gil-García M.D., Martínez-Vidal J.L., Martínez-Galera M. 2001. Determination of pyrethroids in vegetables by HPLC using continuous on-line post-elution photoirradiation with fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta* 447 (2001) 101–111.
- Luvizotto-Santos R., Marques Cordeiro P.J., Vieira E.M. 2009. Análisis of Difluzbazon in Tilapia Filet by HPLC-DAD. *Journal of Chromatographic Science*, Vol 47, 785-788
- Martínez-Galera M., López-López T., Gil-García M.D., Martínez-Vidal J.L., Parrilla Vázquez P. 2001. Determination of benzoylureas in tomato by high-performance liquid chromatography using continuous on-line post-elution photoirradiation with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*. Volume 918, Issue 1, 18 May 2001, Pages 79–85.
- Mayer-Helm Bernhard, Hofbauer Ludwig, Müller Jutta. 2008. Method development for the determination of selected pesticides on tobacco by high-performance liquid chromatography–electrospray ionisation-tandem mass spectrometry. *Talanta*. Volume 74, Issue 5, 15 February 2008, Pages 1184–1190.
- Mazzola A., Sarà G. 2001. The effect of fish farming organic waste on food availability for bivalve molluscs (Gaeta Gulf, Central Tyrrhenian, MED): stable carbon isotopic analysis. *Aquaculture* Volume 192, Issues 2–4, 15 January 2001, Pages 361–379.
- Miliadis George E., Tsiropoulos Nicholas G., Aplada-Sarlis Pipina G. 1999. High-performance liquid chromatographic determination of benzoylurea insecticides residues in grapes and wine using liquid and solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A*. Volume 835, Issues 1–2, 12 March 1999, Pages 113–120.
- Muhammad Faqir, Awaie Mian Muhammad, Akhtar Masood and Anwar Muhammad Irfan. 2013. Quantitative structure activity relationship and risk analysis of some pesticides in the goat milk. *Iranian Journal of Environmental Health Sciences & Engineering* 2013, 10:4.
- Nesto N, Romano S, Moschino V, Mauri M, Da Ros L. 2007. Bioaccumulation and biomarker responses of trace metals and micro-organic pollutants in mussels and fish from the Lagoon of Venice, Italy. *Mar Pollut Bull*. 2007; 55(10-12):469-84.

Nisharaj N.R., Thomas S, P.A. Mary Helen P.A., Jaya Sree S., Suku Sh. 2012. Biodegradation of Cypermethrin. *Intl. J. Agric. Env. Biotech.* 5(1) : 1-4, March 2012.

Observatorio de precios de los alimentos MARM, 2011. Estudio de la cadena de valor y formación de precios del mejillón fresco de acuicultura. Ministerio de medioambiente y medio rural y marino. Gobierno de España.

Park Ji-Yeon, Choi Jeong-Heui, Abd El-Aty A.M., Kim Bo Mi, Oh Jae-Ho, Do Jung-Ah, Kwon Ki Sung, Shim Ki-Hoon, Choi Ok-Ja, Shin Sung Chul, Shim Jae-Han. 2011. Simultaneous multiresidue analysis of 41 pesticide residues in cooked foodstuff using QuEChERS: Comparison with classical method. *Food Chemistry*, Volume 128, Issue 1, 1 September 2011, Pages 241–253.

Pfenning Allen P., Roybal José E., Tumipseed Sherri B., Gonzáles Steve A. and Hurlbut Jeffrey A. 1999. Determination of Residues of Azamethiphos in Salmon Tissue by Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. *JOURNAL OF AOAC INTERNATIONAL* VOL. 82, NO. 5, 1224-1228.

Pizarro, L. 2008. Consultoría innovación tecnológica PTI industria mitílicos. Informe final. 83 pp.

Pouliquen, H., Morvan, M.L., 2005. Determination of Florfenicol in Freshwater, sediments and bryophyte *fontinalis antipyretica* by HPLC with Fluorescence. *Chromatographia.* 62, 225-231.

Pouliquen. H., Deléppe, R., Thorin, Ch., Haury, J., Larhantec-Verdier, M., Morvan, M., Le Bris, H., 2009. Comparison of water, sediment, and plants for the monitoring of antibiotics: a case study on a river dedicated to fish farming. *Environ. Toxicol. Chem.* 28, 496-502.

ProChile. <http://www.prochile.gob.cl/herramientas/herramientas-pro-chile/marcas-sectoriales/>

ProChile. <http://www.prochile.gob.cl/noticias/se-lanza-convocatoria-del-concurso-de-promocion-de-exportaciones-silvoagropecuarias-y-productos-del-mar-2014/>

ProChile. <http://www.prochile.gob.cl/herramientas/herramientas-pro-chile/sabores-de-chile/>

ProChile <http://www.prochile.gob.cl/herramientas/herramientas-pro-chile/ferias-internacionales/>

Rawn Dorothea F. K., Krakalovich Tom, Forsyth Donald S. & Roscoe Veronica. 2009. Analysis of fin and non-fin fish products for azamethiphos and dichlorvos residues from the Canadian retail market. *International Journal of Food Science and Technology* 2009, 44, 1510–1516.

Rawn Dorothea F. K., Judge Judy, Roscoe Veronica. 2010. Application of the QuEChERS method for the analysis of pyrethrins and pyrethroids in fish tissues. *Anal Bioanal Chem* (2010) 397:2525–2531.

- Ricciardi F, Matozzo V, Marin MG. 2008. Effects of 4-nonylphenol exposure in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and crabs (*Carcinus aestuarii*) with particular emphasis on vitellogenin induction. *Mar Pollut Bull.* 2008; 57(6-12):365-72.
- Riviere, J. 2011. *Comparative Pharmacokinetics: Principles, Techniques, and Applications*, Second Edition, 442 p.
- Riviere, J. and Mason, S. 2011. Tissue residues and withdrawal times. In: *Comparative Pharmacokinetics: Principles, Techniques, and Applications*, Second Edition, Edited by Jim E. Riviere, 413-424.
- Rodríguez E., Barrio R.J., Goicolea A., Gómez de Balugera Z. 1999. Determination of diflubenzuron and its main metabolites in forestry matrices by liquid chromatography with on-line diode-array and electrochemical detection. *Analytica Chimica Acta*. Volume 384, Issue 1, 22 March 1999, Pages 63–70.
- Roscoe Veronica, Judge Judy, Rawn Dorothea F. K. 2008. Application of the QuEChERS extraction method for the analysis of pyrethrin and pyrethroid pesticides in fin and non-fin fish. Presentation: Western Canada Trace Organic Workshop, 2008.
- Saraji M, Tansazan N. 2009. Application of dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of phenylurea herbicides in water samples by HPLC-diode array detection. *J Sep Sci.* 2009 Dec; 32(23-24):4186-92.
- Sernapesca. 2011. *Anuario Estadístico de Pesca 2011*. Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura. Ministerio de Economía Fomento y Turismo. Sistemas de información y estadísticas pesqueras. Gobierno de Chile.
- Sernapesca. 2012. Informe de seguimiento Programa Sanitario Específico de Vigilancia y Control de Caligidosis. Subdirección de Acuicultura. Unidad de Salud Animal. Septiembre- 2012.
- Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura. *Anuario Estadístico de Pesca Años 2002 a 2012*.
- Skarphedinsdottir H, Gunnarsson K, Gudmundsson GA, Nfon E. 2010. Bioaccumulation and biomagnification of organochlorines in a marine food web at a pristine site in Iceland. *Arch Environ Contam Toxicol.* 2010 Apr; 58(3):800-9.
- Tfouni S.A.V., Furlani R.P.Z., Carreiro L.B., Loredó I.S.D., Gomes A.G., Alves L.A., Mata R.S.S., Fonseca A.M.D., Rocha R.M.S. 2013. Determination of diflubenzuron residues in milk and cattle tissues. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* v.65, n.1, p.301-307, 2013.

- Tomšej T., Hajsšlová J. 1995. Determination of benzoylurea insecticides in apples by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. Volume 704, Issue 2, 9 June 1995, Pages 513–517.
- Tsochatzis ED, Menkissoglu-Spirodi U, Karpouzias DG, Tzimou-Tsitouridou R. 2010. A multi-residue method for pesticide residue analysis in rice grains using matrix solid-phase dispersion extraction and high-performance liquid chromatography-diode array detection. *Anal Bioanal Chem*. Jul; 397(6):2181-90.
- Uriarte, I. 2008. Estado actual del cultivo de moluscos bivalvos en Chile. Taller Técnico Regional de la FAO 20-24 de Agosto de 2007. Puerto Montt, Chile. FAO Actas de Pesca y Acuicultura N°12. Roma. pp 61-75.
- VICH, 2011. Guidance for industry: Studies to Evaluate the Metabolism and Residue Kinetics of Veterinary Drugs in Food-Producing Animals: Marker Residue Depletion Studies to Establish Product Withdrawal Periods. VICH GL48-Final.
- Yakan SD, Henkelmann B, Schramm K-W, Okay OS. 2011. Bioaccumulation depuration kinetics and effects of benzo (a) anthracene on *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Pollution Bulletin* 63 (2011) 471–476.
- Yu Xi, Sun Ying, Jiang Chunzhu, Sun Xiumin, Gao Yan, Wang Yuanpeng, Zhang Hanqi, Song Daqian. 2012. Magnetic solid-phase extraction of five pyrethroids from environmental water samples followed by ultrafast liquid chromatography analysis. *Talanta*, Volume 98, 30 August 2012, Pages 257–264.
- Zanella R., Munaretto J.S., Martins M.L. 2013. Determination of Pesticide Multiresidues in Apple, Pear and Grape using modified QuEChERS and analysis by LC-QTOF MS. Agilent Technologies Inc. 2013. 5991 1872EN.
- Zhang Jiaheng, Liang Zhe, Li Songqing, Li Yubo, Peng Bing, Zhou Wenfeng, Gao Haixiang. 2012. In-situ metathesis reaction combined with ultrasound-assisted ionic liquid dispersive liquid–liquid microextraction method for the determination of phenylurea pesticides in water samples. *Talanta*. Volume 98, 30 August 2012, Pages 145–151.
- Zhou Qing Xiang, Xie Guo Hong, Xiao Jun Ping, Wang Wei Dong, Ding Yu Jie. 2008. Sensitive determination of fenprothrin, cyhalothrin and deltamethrin in environmental water samples using multiwalled carbon nanotubes cartridge prior to HPLC. *Chinese Chemical Letters*, Volume 19, Issue 1, January 2008, Pages 95–98.

- Zhou Q, Wang G, Xie G. 2013. Dispersive liquid-phase microextraction in combination with HPLC for the enrichment and rapid determination of benzoylurea pesticides in environmental water samples. *J Sep Sci.* 2013 Jul; 36(14):2323-9.
- Zuccari Bissacot D. and Vassilieff I. 1997. HPLC Determination of Flumethrin, Deltamethrin, Cypermethrin, and Cyhalothrin Residues in the Milk and Blood of Lactating Dairy Cows *Journal of Analytical Toxicology*, Vol. 21, September 1997.

A N E X O S

A N E X O 1

Protocolo de obtención de bioacumulación y/o curvas de depleción de antiparasitarios en Mitílidos (*M. chilensis*) en condiciones controladas.



INSTITUTO DE FOMENTO PESQUERO



PROTOCOLO DE ESTUDIO

**Obtención de Curvas de Depleción de
Cipermetrina en Mitílidos (*Mytilus chilensis*) en
condiciones controladas**

Identificación de Protocolo de Estudio: CD-CONT-Cip-M

Lugar de realización: Modulo Experimental de Especies Hidrobiológicas
Centro de Maricultura Hueihue, IFOP
Camino a Manao s/n, Ancud

Fono: Carrier-2-1964130.

Director del Estudio: Luis Norambuena S.

Investigador Principal del Estudio: Luis Norambuena S.

Proyecto: Evaluación de la capacidad de mitílidos de bioacumular productos químicos y farmacéuticos de uso en la acuicultura de la eficacia y seguridad de productos biológicos y determinación de las curvas de depleción de productos farmacológicos utilizados en la salmonicultura. SUBPESCA.

Fecha:

APROBACIÓN DE PROTOCOLO



Obtención de Curvas de Depleción de Cipermetrina
en Mitílicos (*Mytilus chilensis*) en condiciones
controladas

Identificación de Protocolo de Estudio: CD-CONT-Cip-M

DIRECTOR DE ESTUDIO: Luis Norambuena S.
Departamento de Salud Hidrobiológica.
División de Investigación en Acuicultura.
Instituto de Fomento Pesquero
Balmaceda 252, Puerto Montt

Fecha:
Firma:



APROBACION DE ESTUDIO POR COMITE CIENTIFICO

Mediante el presente documento se certifica que el siguiente estudio:

Título:

Obtención de Curvas de Depleción de Cipermetrina en Mitílicos
(*Mytilus chilensis*) en condiciones controladas

Identificación de Protocolo de Estudio:

CD-CONT-Cip-M

ha sido aprobado por Comité Científico de IFOP, Puerto Montt.

Nombre:.....

Firma..... Fecha.....



Obtención de Curvas de Depleción de Cipermetrina en Mitílicos (*Mytilus chilensis*) en condiciones controladas

Identificación de Protocolo de Estudio: CD-CONT-Cip-M

1.- Antecedentes.

La producción intensiva de mitílicos en Chile ha tenido un fuerte crecimiento en los últimos 10 años, posicionándose como el segundo mayor sector productivo de la acuicultura. El cultivo de choritos en Chile comenzó en 1961, y a partir del año 2006, el 100 % de la producción de éstos es de cultivo (Uriarte, I. 2008). La producción de moluscos bivalvos se realiza principalmente en la Región de Los Lagos, compartiendo zonas geográficas y cuerpos de agua similares con la producción de especies salmónidas. De las 288.587 toneladas de choritos cosechadas el año 2011, 288.579 toneladas fueron obtenidas en la Región de Los Lagos (SERNAPESCA, 2011).

En el proceso productivo de peces salmónidos pueden presentarse enfermedades infecciosas, parasitarias y fúngicas que requieren de tratamiento químico o farmacológico. Si bien el uso de productos terapéuticos ayuda a controlar estas enfermedades, también conlleva a la inclusión directa o indirecta de estos en la columna de agua. La incorporación directa incluye el uso de productos para uso en baño o a través del alimento medicado no ingerido por los peces, mientras que la indirecta incluye la inclusión a la columna de agua de metabolitos excretados por piel (mucus), heces y orina de los peces. En este contexto, el mayor riesgo identificado para la producción de mitílicos se encuentra en los productos terapéuticos utilizados en baños (piretroides). Los cuerpos de agua que contengan estos productos terapéuticos pueden llegar a zonas cercanas de producción de mitílicos.

Existe numerosa bibliografía de la liberación de fármacos al medio ambiente, como excreción fecal y urinaria, o como alimento medicado no ingerido por parte de peces de cultivo (Hormazabal et al., 1996, Lalumera et al, 2004, Pouliquen y Morvan, 2005, Pouliquen et al., 2009). El peligro de la aplicación de altas cantidades de estas sustancias, se evidencia en sus efectos colaterales, como puede ser la modificación cuantitativa y cualitativa de la flora bacteriana en el ambiente, afectando la conservación de la biodiversidad marina (Buschmann y Fortt, 2005), incidencia en las cadenas tróficas, desarrollo de defensas antibacterianas en patógenos de peces y transferencia de resistencia bacteriana a patógenos humanos (Borja, 2002). Estudios llevados a cabo en sistemas intensivos de producción de peces, han demostrado que en ciertas ocasiones se puede detectar un impacto significativo en un radio de un kilómetro alrededor de las jaulas de cultivo, siendo éste generalmente, mayor en el fondo (Borja, 2002). Sin embargo no hay publicaciones de niveles de fármacos en mitílicos producto de la actividad salmonicultura.



Actualmente, en Chile y a nivel mundial, existe escaso conocimiento respecto de la capacidad de mitílidos de bioacumular, mediante su capacidad filtradora, productos terapéuticos a las dosis utilizadas. Asimismo, se desconoce si mediante el proceso de bioacumulación es posible encontrar residuos de productos químicos y farmacéuticos en los ejemplares de mitílidos. Sin embargo, se han realizados muchos estudios de depleción de diversos fármacos en animales, en los cuales éstos se medican de acuerdo a las dosis recomendada por cada fabricante y se obtienen muestras de matrices biológicas desde la suspensión de la medicación (Rievère y Mason, 2011). Así, las curvas de depleción son estudios de farmacocinética, toda vez que se evidencia el cambio de concentraciones a través del tiempo (Riviere, 2011). Debido a que los estudios de depleción se realizan bajo condiciones controladas, es necesario contrastarlos con estudios de campo, esto es especialmente necesario en mitílidos, ya que su exposición a los fármacos es muy inferior a la que recibirían en estudios en condiciones controladas.

En consecuencia, el presente proyecto de investigación aborda esta problemática, determinando la capacidad potencial que tienen los mitílidos de bioacumular este tipo de residuos y su impacto sobre la inocuidad alimentaria.

2.- Objetivos.

Obtener las curvas de depleción de la presentación comercial de Cipermetrina utilizada en la salmonicultura nacional, desde muestras de partes blandas de choritos (*Mytilus chilensis*), bajo condiciones controladas.

3.- Justificación.

El presente protocolo busca la obtención de las curvas de depleción del producto comercial de Cipermetrina utilizado en la salmonicultura nacional, de las partes blandas de choritos, bajo condiciones controladas, con la finalidad de levantar información técnica para la correcta toma de decisiones por parte de la Autoridad.



4.- Diseño del Estudio.

4.1.- Animales.

Se trabajará con choritos (*Mytilus chilensis*), en los grupos experimentales designados CD-CONT-Cip-M (Betamax, Novartis).

- Tamaño de choritos: Se utilizarán choritos de longitud de 5-7 cm.
- Número de choritos a utilizar: 300 individuos por estanque. Esto considera la mortalidad esperada (10%) y un retiro de 10 choritos en el tiempo cero (Control Negativo, antes de comenzar el tratamiento).
- Los choritos se mantendrán a una salinidad de 30 ± 2 ppm.
- Fuente de los choritos: Se obtendrán los individuos de un stock comercial, obtenidos desde zonas alejadas de centros de producción de salmones.
- Método(s) de identificación de los individuos: Los choritos se identificarán por estanques (Códigos CD-CONT-Cip-M).
- Criterio(s) de inclusión/exclusión: Se incluirán aquellos choritos aparentemente sanos y que estén dentro las tallas establecidas.
- Aclimatación de los choritos: La aclimatación de los choritos será de al menos 7 días antes del inicio del estudio, alimentándose con un cultivo de microalgas producida en el mismo centro.
- La experiencia se realizará en triplicado, denominándose los grupos y estanques como CD-CONT-Cip-M-1, CD-CONT-Cip-M-2, CD-CONT-Cip-M-3, respectivamente.

4.2.- Fármaco utilizado y controles.

- Fármaco estudiado: Cipermetrina (Betamax, Cipermetrina 5%, Novartis).
- Dosis a evaluar: 15 ug/lit de agua por 30 minutos.

4.3.- Metodología de Muestreo.

Se realizará 1 muestreo de 20 choritos (4 pooles de 5 choritos cada uno) antes de comenzar el tratamiento, posteriormente se realizarán 4 muestreos programados, de 50 choritos (10 pooles de 5 choritos cada uno) por tiempo de muestreo, el primero 1 hora post-tratamiento y los tres siguientes a los 5, 10, y 15 días desde el término del tratamiento. Al momento de muestrear los choritos, serán lavados con agua de mar, para eliminar el fármaco que pudiera estar en el exterior. Luego los choritos serán envasados en bolsas plásticas debidamente rotuladas, las que serán congeladas a -20°C , hasta su posterior envío al Laboratorio del IFOP en Puerto Montt.

4.4.- Instalaciones e Infraestructuras utilizadas en el estudio.

- Contención: Se utilizarán estanques de plástico reforzado de 300 litros de capacidad.
- Se mantendrá un registro diario de la temperatura de estanques, según POE 101: Procedimiento de registro de temperatura.



- Iluminación: Durante todo el ensayo se mantendrá un fotoperíodo ambiental normal de 12 horas luz y 12 horas de oscuridad.
- Salinidad de los estanques: Se mantendrá un registro diario de la salinidad de los estanques, según POE 102: Procedimiento de registro de salinidad.
- Concentración de oxígeno: Se mantendrá un nivel de oxígeno entre 6 y 10 mg/l, siendo el ideal 10 mg/L. Se mantendrá un registro diario de la concentración de oxígeno disuelto en estanques, según POE 104: Procedimiento de registro de concentración de oxígeno.
- Control del flujo de agua de los estanques: Se mantendrá un flujo de agua de aproximadamente 5 lt/min.
- Limpieza de estanques: Se realizará una limpieza diaria de los estanques bajo las rejillas y día por medio en las paredes laterales y de fondo a las 15 hrs.

4.5.- Dietas a utilizar en el estudio.

4.5.1.- Dieta:

Diariamente los bivalvos serán alimentados con *Isochrysis galbana* cada mañana.

4.5.2.- Tratamiento:

Los choritos serán transferidos a un estanque de 100 lt con Cipermetrina a una concentración de 15 ug/lt de agua por 30 minutos. Una vez transcurrido el tiempo de tratamiento, los choritos serán devueltos a su estanque original.

4.6.- Retiro de individuos del estudio.

Los individuos muertos se retirarán diariamente junto a la alimentación. Se llevará un registro de esto.

4.7.- Destino de alimento medicado y animales experimentales del estudio.

Con el fin de evitar la contaminación medioambiental todo el material medicado y restos de choritos serán incinerados.

5.- Programación.

- Día -7 a 0 :Aclimatación de choritos
- Día 0 : muestreo 10 choritos
- Día 1 postratamiento : muestreo 50 choritos
- Día 5 postratamiento : muestreo 50 choritos
- Día 10 postratamiento : muestreo 50 choritos
- Día 15 postratamiento : muestreo 50 choritos

6.- Mediciones, observaciones, resultados y registros.



Los registros de temperatura, pH, salinidad y oxígeno disuelto de los estanques se obtendrán de acuerdo a los POE correspondientes y mantendrán en fichas en cada estanque de experimentación por todo el estudio.

7.- Obtención de las curvas de depleción.

En el Laboratorio de IFOP-Puerto Montt, se analizará la concentración de Cipermetrina (Cip) a pooles de 5 choritos (10 pooles por tiempo de muestreo) de las muestras obtenidas. Posteriormente se obtendrán las curvas de depleción graficando el logaritmo natural (Ln) de concentración de Cipermetrina vs el tiempo en días, y se obtendrá la ecuación de la recta. Para que la experiencia sea válida se deben cuantificar al menos 3 puntos de la recta. Es necesario que la regresión lineal, cumpla con ciertos requisitos: homogeneidad de las varianzas del Ln de concentración de Cip obtenido en cada día de muestreo, linealidad de Ln de concentración de Cip obtenido vs tiempo (se puede ver visualmente en el gráfico), distribución normal de errores (se puede ver con un gráfico de residuales). Con las curvas de depleción se calculará el tiempo de vida media ($T_{1/2}$) de Cip en las partes blandas del chorito.

8.- Informe.

Finalizado el estudio, se confeccionará un informe de estudio que resumirá los resultados obtenidos.

9.- Manejo de la información generada.

Durante el desarrollo del estudio, la Bitácora de Estudio y todo registro bruto se mantendrá dentro del Modulo Experimental de Especies Hidrobiológicas, IFOP Hueihue y con acceso restringido. Finalizado el estudio, todo registro será mantenido y archivado en dependencias de IFOP, Puerto Montt.

10.- Eventos inesperados.

Cualquier evento inesperado del desarrollo del estudio será documentado en la Bitácora de Estudio y se informará inmediatamente al Director del Estudio.

11.- Personal participante.

Director del Estudio: Luis Norambuena S.

Investigador Principal del Estudio: Luis Norambuena S.



Investigadores a cargo del Modulo Experimental de Especies Hidrobiológicas:
Mylena Menanteau y Loreto Ovalle
Personal Técnico en Modulo Experimental de Especies Hidrobiológicas: Dany
Alvarez y Kitza Kalergis

13.- Bibliografía.

Borja, Á., 2002. Los impactos ambientales de la acuicultura y la sostenibilidad de esta actividad. Boletín ISSN: 0074-0195. Instituto Español de Oceanografía. Bol. Inst. Esp. Oceanogr. 18 (1-4), 41 - 49.

Buschmann, A., Fortt, A., 2005. Efectos ambientales de la acuicultura intensiva y alternativas para un desarrollo sustentable. Ambiente y Desarrollo. 21, 58-64.

Hormazabal, V., Steffenak, I., Yndestad, M., 1996. Simultaneous extraction and determination of florfenicol and the metabolite florfenicol amine in sediment by high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. A. 724, 364-366.

Lalumera, G.M., Calamari, D., Galli, P., Castiglioni, S., Crosa, G., Fanelli, R., 2004. Preliminary investigation on the environmental occurrence and effects of antibiotics used in aquaculture in Italy. Chemosphere. 54, 661-668.

Pouliquen, H., Morvan, M.L., 2005. Determination of Florfenicol in Freshwater, sediments and bryophyte fontinalis antipyretica by HPLC with Fluorescence. Chromatographia. 62, 225-231.

Pouliquen, H., Delépe, R., Thorin, Ch., Haury, J., Larhantec-Verdier, M., Morvan, M., Le Bris, H., 2009. Comparison of water, sediment, and plants for the monitoring of antibiotics: a case study on a river dedicated to fish farming. Environ. Toxicol. Chem. 28, 496-502.

Riviere, J. 2011. Comparative Pharmacokinetics: Principles, Techniques, and Applications, Second Edition, 442 p.

Riviere, J. and Mason, S. 2011. Tissue residues and withdrawal times. In: Comparative Pharmacokinetics: Principles, Techniques, and Applications, Second Edition, Edited by Jim E. Riviere, 413-424.

Sernapesca. 2011. Anuario Estadístico de Pesca 2011. Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura. Ministerio de Economía Fomento y Turismo. Sistemas de información y estadísticas pesqueras. Gobierno de Chile.

Uriarte, I. 2008. Estado actual del cultivo de moluscos bivalvos en Chile. Taller Técnico Regional de la FAO 20-24 de Agosto de 2007. Puerto Montt, Chile. FAO Actas de Pesca y Acuicultura Nº12. Roma. pp 61-75.





INSTITUTO DE FOMENTO PESQUERO



PROTOCOLO DE ESTUDIO

**Obtención de Curvas de Depleción de
Deltametrina en Mitílicos (*Mytilus chilensis*) en
condiciones controladas**

Identificación de Protocolo de Estudio: CD-CONT-DeI-M

Lugar de realización: Modulo Experimental de Especies Hidrobiológicas
Centro de Maricultura Hueihue, IFOP
Camino a Manao s/n, Ancud

Fono: Carrier-2-1964130.

Director del Estudio: Luis Norambuena S.

Investigador Principal del Estudio: Luis Norambuena S.

Proyecto: Evaluación de la capacidad de mitílicos de bioacumular productos químicos y farmacéuticos de uso en la acuicultura de la eficacia y seguridad de productos biológicos y determinación de las curvas de depleción de productos farmacológicos utilizados en la salmonicultura. SUBPESCA.

Fecha:

APROBACIÓN DE PROTOCOLO



Obtención de Curvas de Depleción de Deltametrina
en Mitílicos (*Mytilus chilensis*) en condiciones
controladas

Identificación de Protocolo de Estudio: CD-CONT-Del-M

DIRECTOR DE ESTUDIO: Luis Norambuena S.
Departamento de Salud Hidrobiológica.
División de Investigación en Acuicultura.
Instituto de Fomento Pesquero
Balmaceda 252, Puerto Montt

Fecha:
Firma:

- 11 -



APROBACION DE ESTUDIO POR COMITE CIENTIFICO

Mediante el presente documento se certifica que el siguiente estudio:

Título:

Obtención de Curvas de Depleción de Deltametrina en Mitílicos
(*Mytilus chilensis*) en condiciones controladas

Identificación de Protocolo de Estudio:

CD-CONT-DeI-M

ha sido aprobado por Comité Científico de IFOP, Puerto Montt.

Nombre:.....

Firma..... Fecha.....



Obtención de Curvas de Depleción de Deltametrina en Mitilidos (*Mytilus chilensis*) en condiciones controladas

Identificación de Protocolo de Estudio: CD-CONT-DeI-M

1.- Antecedentes.

La producción intensiva de mitílidos en Chile ha tenido un fuerte crecimiento en los últimos 10 años, posicionándose como el segundo mayor sector productivo de la acuicultura. El cultivo de choritos en Chile comenzó en 1961, y a partir del año 2006, el 100 % de la producción de éstos es de cultivo (Uriarte, I. 2008). La producción de moluscos bivalvos se realiza principalmente en la Región de Los Lagos, compartiendo zonas geográficas y cuerpos de agua similares con la producción de especies salmónidas. De las 288.587 toneladas de choritos cosechadas el año 2011, 288.579 toneladas fueron obtenidas en la Región de Los Lagos (SERNAPESCA, 2011).

En el proceso productivo de peces salmónidos pueden presentarse enfermedades infecciosas, parasitarias y fúngicas que requieren de tratamiento químico o farmacológico. Si bien el uso de productos terapéuticos ayuda a controlar estas enfermedades, también conlleva a la inclusión directa o indirecta de estos en la columna de agua. La incorporación directa incluye el uso de productos para uso en baño o a través del alimento medicado no ingerido por los peces, mientras que la indirecta incluye la inclusión a la columna de agua de metabolitos excretados por piel (mucus), heces y orina de los peces. En este contexto, el mayor riesgo identificado para la producción de mitílidos se encuentra en los productos terapéuticos utilizados en baños (piretroides). Los cuerpos de agua que contengan estos productos terapéuticos pueden llegar a zonas cercanas de producción de mitílidos.

Existe numerosa bibliografía de la liberación de fármacos al medio ambiente, como excreción fecal y urinaria, o como alimento medicado no ingerido por parte de peces de cultivo (Hormazabal et al., 1996, Lalumera et al, 2004, Pouliquen y Morvan, 2005, Pouliquen et al., 2009). El peligro de la aplicación de altas cantidades de estas sustancias, se evidencia en sus efectos colaterales, como puede ser la modificación cuantitativa y cualitativa de la flora bacteriana en el ambiente, afectando la conservación de la biodiversidad marina (Buschmann y Fortt, 2005), incidencia en las cadenas tróficas, desarrollo de defensas antibacterianas en patógenos de peces y transferencia de resistencia bacteriana a patógenos humanos (Borja, 2002). Estudios llevados a cabo en sistemas intensivos de producción de peces, han demostrado que en ciertas ocasiones se puede detectar un impacto significativo en un radio de un kilómetro alrededor de las jaulas de cultivo, siendo éste generalmente, mayor en el fondo (Borja, 2002). Sin embargo no hay publicaciones de niveles de fármacos en mitílidos producto de la actividad salmonicoltora.



Actualmente, en Chile y a nivel mundial, existe escaso conocimiento respecto de la capacidad de mitílidos de bioacumular, mediante su capacidad filtradora, productos terapéuticos a las dosis utilizadas. Asimismo, se desconoce si mediante el proceso de bioacumulación es posible encontrar residuos de productos químicos y farmacéuticos en los ejemplares de mitílidos. Sin embargo, se han realizados muchos estudios de depleción de diversos fármacos en animales, en los cuales éstos se medican de acuerdo a las dosis recomendada por cada fabricante y se obtienen muestras de matrices biológicas desde la suspensión de la medicación (Rievère y Mason, 2011). Así, las curvas de depleción son estudios de farmacocinética, toda vez que se evidencia el cambio de concentraciones a través del tiempo (Riviere, 2011). Debido a que los estudios de depleción se realizan bajo condiciones controladas, es necesario contrastarlos con estudios de campo, esto es especialmente necesario en mitílidos, ya que su exposición a los fármacos es muy inferior a la que recibirían en estudios en condiciones controladas.

En consecuencia, el presente proyecto de investigación aborda esta problemática, determinando la capacidad potencial que tienen los mitílidos de bioacumular este tipo de residuos y su impacto sobre la inocuidad alimentaria.

2.- Objetivos.

Obtener las curvas de depleción de la presentación comercial de Deltametrina más utilizada en la salmonicultura nacional, desde muestras de partes blandas de choritos (*Mytilus chilensis*), bajo condiciones controladas.

3.- Justificación.

El presente protocolo busca la obtención de las curvas de depleción del producto comercial más utilizado en la salmonicultura nacional de Deltametrina utilizado en la salmonicultura nacional, de las partes blandas de choritos, bajo condiciones controladas, con la finalidad de levantar información técnica para la correcta toma de decisiones por parte de la Autoridad.



4.- Diseño del Estudio.

4.1.- Animales.

Se trabajará con choritos (*Mytilus chilensis*), en los grupos experimentales designados CD-CONT-Del-M (Deltametrina 1%, FAV S.A.).

- Tamaño de choritos: Se utilizarán choritos de longitud de 4-6 cm.
- Número de choritos a utilizar: 300 individuos por estanque. Esto considera la mortalidad esperada (10%) y un retiro de 20 choritos en el tiempo cero (Control Negativo, antes de comenzar el tratamiento).
- Los choritos se mantendrán a una salinidad de 30 ± 2 ppm.
- Fuente de los choritos: Se obtendrán los individuos de un stock comercial, obtenidos desde zonas alejadas de centros de producción de salmones.
- Método(s) de identificación de los individuos: Los choritos se identificarán por estanques (Códigos CD-CONT-Del-M).
- Criterio(s) de inclusión/exclusión: Se incluirán aquellos choritos aparentemente sanos y que estén dentro las tallas establecidas.
- Aclimatación de los choritos: La aclimatación de los choritos será de al menos 7 días antes del inicio del estudio, alimentándose con un cultivo de microalgas producida en el mismo centro.
- La experiencia se realizará en triplicado, denominándose los grupos y estanques como CD-CONT-Del-M-1, CD-CONT-Del-M-2, CD-CONT-Del-M-3, respectivamente.

4.2.- Fármaco utilizado y controles.

- Fármaco estudiado: Cipermetrina (Deltametrina 1%, FAV S.A.).
- Dosis a evaluar: 3 ug/lit de agua por 40 minutos.

4.3.- Metodología de Muestreo.

Se realizará 1 muestreo de 20 choritos (4 pooles de 5 choritos cada uno) antes de comenzar el tratamiento, posteriormente se realizarán 4 muestreos programados, de 50 choritos (10 pooles de 5 choritos cada uno) por tiempo de muestreo, el primero 1 hora post-tratamiento y los tres siguientes a los 5, 10, y 15 días desde el término del tratamiento. Al momento de muestrear los choritos, serán lavados con agua de mar, para eliminar el fármaco que pudiera estar en el exterior. Luego los choritos serán envasados en bolsas plásticas debidamente rotuladas, las que serán congeladas a -20°C , hasta su posterior envío al Laboratorio del IFOP en Puerto Montt.

4.4.- Instalaciones e Infraestructuras utilizadas en el estudio.

- Contención: Se utilizarán estanques de plástico reforzado de 300 litros de capacidad.
- Se mantendrá un registro diario de la temperatura de estanques, según POE 101: Procedimiento de registro de temperatura.



- Iluminación: Durante todo el ensayo se mantendrá un fotoperíodo ambiental normal de 12 horas luz y 12 horas de oscuridad.
- Salinidad de los estanques: Se mantendrá un registro diario de la salinidad de los estanques, según POE 102: Procedimiento de registro de salinidad.
- Concentración de oxígeno: Se mantendrá un nivel de oxígeno entre 6 y 10 mg/l, siendo el ideal 10 mg/L. Se mantendrá un registro diario de la concentración de oxígeno disuelto en estanques, según POE 104: Procedimiento de registro de concentración de oxígeno.
- Control del flujo de agua de los estanques: Se mantendrá un flujo de agua de aproximadamente 5 lt/min.
- Limpieza de estanques: Se realizará una limpieza diaria de los estanques bajo las rejillas y día por medio en las paredes laterales y de fondo a las 15 hrs.

4.5.- Dietas a utilizar en el estudio.

4.5.1.- Dieta:

Diariamente los bivalvos serán alimentados con Isochrysis galbana cada mañana.

4.5.2.- Tratamiento:

Los choritos serán transferidos a un estanque de 100 lt con Deltametrina a una concentración de 3 ug/lt de agua por 40 minutos. Una vez transcurrido el tiempo de tratamiento, los choritos serán devueltos a su estanque original.

4.6.- Retiro de individuos del estudio.

Los individuos muertos se retirarán diariamente junto a la alimentación. Se llevará un registro de esto.

4.7.- Destino de alimento medicado y animales experimentales del estudio.

Con el fin de evitar la contaminación medioambiental todo el material medicado y restos de choritos serán incinerados.

5.- Programación.

- | | |
|-------------------------|---------------------------|
| - Día -7 a 0 | :Aclimatación de choritos |
| - Día 0 | : muestreo 10 choritos |
| - Día 1 postratamiento | : muestreo 50 choritos |
| - Día 5 postratamiento | : muestreo 50 choritos |
| - Día 10 postratamiento | : muestreo 50 choritos |
| - Día 15 postratamiento | : muestreo 50 choritos |

6.- Mediciones, observaciones, resultados y registros.



Los registros de temperatura, pH, salinidad y oxígeno disuelto de los estanques se obtendrán de acuerdo a los POE correspondientes y mantendrán en fichas en cada estanque de experimentación por todo el estudio.

7.- Obtención de las curvas de depleción.

En el Laboratorio de IFOP-Puerto Montt, se analizará la concentración de Deltametrina (Del) a pooles de 5 choritos (10 pooles por tiempo de muestreo) de las muestras obtenidas. Posteriormente se obtendrán las curvas de depleción graficando el logaritmo natural (Ln) de concentración de Deltametrina vs el tiempo en días, y se obtendrá la ecuación de la recta. Para que la experiencia sea válida se deben cuantificar al menos 3 puntos de la recta. Es necesario que la regresión lineal, cumpla con ciertos requisitos: homogeneidad de las varianzas del Ln de concentración de Del obtenido en cada día de muestreo, linealidad de Ln de concentración de Del obtenido vs tiempo (se puede ver visualmente en el gráfico), distribución normal de errores (se puede ver con un gráfico de residuales). Con las curvas de depleción se calculará el tiempo de vida media ($T_{1/2}$) de Del en las partes blandas del chorito.

8.- Informe.

Finalizado el estudio, se confeccionará un informe de estudio que resumirá los resultados obtenidos.

9.- Manejo de la información generada.

Durante el desarrollo del estudio, la Bitácora de Estudio y todo registro bruto se mantendrá dentro del Modulo Experimental de Especies Hidrobiológicas, IFOP Hueihue y con acceso restringido. Finalizado el estudio, todo registro será mantenido y archivado en dependencias de IFOP, Puerto Montt.

10.- Eventos inesperados.

Cualquier evento inesperado del desarrollo del estudio será documentado en la Bitácora de Estudio y se informará inmediatamente al Director del Estudio.

11.- Personal participante.

Director del Estudio: Luis Norambuena S.

Investigador Principal del Estudio: Luis Norambuena S.



Investigadores a cargo del Modulo Experimental de Especies Hidrobiológicas:
Mylena Menanteau y Loreto Ovalle
Personal Técnico en Modulo Experimental de Especies Hidrobiológicas: Dany
Alvarez y Kitzka Kalergis

13.- Bibliografía.

Borja, À., 2002. Los impactos ambientales de la acuicultura y la sostenibilidad de esta actividad. Boletín ISSN: 0074-0195. Instituto Español de Oceanografía. Bol. Inst. Esp. Oceanogr. 18 (1-4), 41 - 49.

Buschmann, A., Fortt, A., 2005. Efectos ambientales de la acuicultura intensiva y alternativas para un desarrollo sustentable. Ambiente y Desarrollo. 21, 58-64.

Hormazabal, V., Steffenak, I., Yndestad, M., 1996. Simultaneous extraction and determination of florfenicol and the metabolite florfenicol amine in sediment by high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. A. 724, 364-366.

Lalumera, G.M., Calamari, D., Galli, P., Castiglioni, S., Crosa, G., Fanelli, R., 2004. Preliminary investigation on the environmental occurrence and effects of antibiotics used in aquaculture in Italy. Chemosphere. 54, 661-668.

Pouliquen, H., Morvan, M.L., 2005. Determination of Florfenicol in Freshwater, sediments and bryophyte fontinalis antipyretica by HPLC with Fluorescence. Chromatographia. 62, 225-231.

Pouliquen, H., Delépe, R., Thorin, Ch., Haury, J., Larhantec-Verdier, M., Morvan, M., Le Bris, H., 2009. Comparison of water, sediment, and plants for the monitoring of antibiotics: a case study on a river dedicated to fish farming. Environ. Toxicol. Chem. 28, 496-502.

Riviere, J. 2011. Comparative Pharmacokinetics: Principles, Techniques, and Applications, Second Edition, 442 p.

Riviere, J. and Mason, S. 2011. Tissue residues and withdrawal times. In: Comparative Pharmacokinetics: Principles, Techniques, and Applications, Second Edition, Edited by Jim E. Riviere, 413-424.

Sernapesca. 2011. Anuario Estadístico de Pesca 2011. Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura. Ministerio de Economía Fomento y Turismo. Sistemas de información y estadísticas pesqueras. Gobierno de Chile.

Uriarte, I. 2008. Estado actual del cultivo de moluscos bivalvos en Chile. Taller Técnico Regional de la FAO 20-24 de Agosto de 2007. Puerto Montt, Chile. FAO Actas de Pesca y Acuicultura Nº12. Roma. pp 61-75.





INSTITUTO DE FOMENTO PESQUERO



PROTOCOLO DE ESTUDIO

**Obtención de Curvas de Depleción de
Azametifos en Mitílicos (*Mytilus chilensis*) en
condiciones controladas**

Identificación de Protocolo de Estudio: CD-CONT-Aza-M

Lugar de realización: Modulo Experimental de Especies Hidrobiológicas
Centro de Maricultura Hueihue, IFOP
Camino a Manao s/n, Ancud

Fono: Carrier-2-1964130.

Director del Estudio: Luis Norambuena S.

Investigador Principal del Estudio: Luis Norambuena S.

Proyecto: Evaluación de la capacidad de mitílicos de bioacumular productos químicos y farmacéuticos de uso en la acuicultura de la eficacia y seguridad de productos biológicos y determinación de las curvas de depleción de productos farmacológicos utilizados en la salmonicultura. SUBPESCA.

Fecha:

APROBACIÓN DE PROTOCOLO



Obtención de Curvas de Depleción de Azametifos en
Mitílicos (*Mytilus chilensis*) en condiciones
controladas

Identificación de Protocolo de Estudio: CD-CONT-Aza-M

DIRECTOR DE ESTUDIO: Luis Norambuena S.
Departamento de Salud Hidrobiológica.
División de Investigación en Acuicultura.
Instituto de Fomento Pesquero
Balmaceda 252, Puerto Montt

Fecha:
Firma:



APROBACION DE ESTUDIO POR COMITE CIENTIFICO

Mediante el presente documento se certifica que el siguiente estudio:

Titulo:

Obtención de Curvas de Depleción de Azametifos en Mitílicos
(*Mytilus chilensis*) en condiciones controladas

Identificación de Protocolo de Estudio:

CD-CONT-Aza-M

ha sido aprobado por Comité Científico de IFOP, Puerto Montt.

Nombre:.....

Firma..... Fecha.....



Obtención de Curvas de Depleción de Azametifos en Mitílicos (*Mytilus chilensis*) en condiciones controladas

Identificación de Protocolo de Estudio: CD-CONT-Aza-M

1.- Antecedentes.

La producción intensiva de mitílicos en Chile ha tenido un fuerte crecimiento en los últimos 10 años, posicionándose como el segundo mayor sector productivo de la acuicultura. El cultivo de choritos en Chile comenzó en 1961, y a partir del año 2006, el 100 % de la producción de éstos es de cultivo (Uriarte, I. 2008). La producción de moluscos bivalvos se realiza principalmente en la Región de Los Lagos, compartiendo zonas geográficas y cuerpos de agua similares con la producción de especies salmónidas. De las 288.587 toneladas de choritos cosechadas el año 2011, 288.579 toneladas fueron obtenidas en la Región de Los Lagos (SERNAPESCA, 2011).

En el proceso productivo de peces salmónidos pueden presentarse enfermedades infecciosas, parasitarias y fúngicas que requieren de tratamiento químico o farmacológico. Si bien el uso de productos terapéuticos ayuda a controlar estas enfermedades, también conlleva a la inclusión directa o indirecta de estos en la columna de agua. La incorporación directa incluye el uso de productos para uso en baño o a través del alimento medicado no ingerido por los peces, mientras que la indirecta incluye la inclusión a la columna de agua de metabolitos excretados por piel (mucus), heces y orina de los peces. En este contexto, el mayor riesgo identificado para la producción de mitílicos se encuentra en los productos terapéuticos utilizados en baños (piretroides). Los cuerpos de agua que contengan estos productos terapéuticos pueden llegar a zonas cercanas de producción de mitílicos.

Existe numerosa bibliografía de la liberación de fármacos al medio ambiente, como excreción fecal y urinaria, o como alimento medicado no ingerido por parte de peces de cultivo (Hormazabal et al., 1996, Lalumera et al, 2004, Pouliquen y Morvan, 2005, Pouliquen et al., 2009). El peligro de la aplicación de altas cantidades de estas sustancias, se evidencia en sus efectos colaterales, como puede ser la modificación cuantitativa y cualitativa de la flora bacteriana en el ambiente, afectando la conservación de la biodiversidad marina (Buschmann y Fortt, 2005), incidencia en las cadenas tróficas, desarrollo de defensas antibacterianas en patógenos de peces y transferencia de resistencia bacteriana a patógenos humanos (Borja, 2002). Estudios llevados a cabo en sistemas intensivos de producción de peces, han demostrado que en ciertas ocasiones se puede detectar un impacto significativo en un radio de un kilómetro alrededor de las jaulas de cultivo, siendo éste generalmente, mayor en el fondo (Borja, 2002). Sin embargo no hay publicaciones de niveles de fármacos en mitílicos producto de la actividad salmonicultura.



Actualmente, en Chile y a nivel mundial, existe escaso conocimiento respecto de la capacidad de mitílidos de bioacumular, mediante su capacidad filtradora, productos terapéuticos a las dosis utilizadas. Asimismo, se desconoce si mediante el proceso de bioacumulación es posible encontrar residuos de productos químicos y farmacéuticos en los ejemplares de mitílidos. Sin embargo, se han realizados muchos estudios de depleción de diversos fármacos en animales, en los cuales éstos se medican de acuerdo a las dosis recomendada por cada fabricante y se obtienen muestras de matrices biológicas desde la suspensión de la medicación (Rievere y Mason, 2011). Así, las curvas de depleción son estudios de farmacocinética, toda vez que se evidencia el cambio de concentraciones a través del tiempo (Rivière, 2011). Debido a que los estudios de depleción se realizan bajo condiciones controladas, es necesario contrastarlos con estudios de campo, esto es especialmente necesario en mitílidos, ya que su exposición a los fármacos es muy inferior a la que recibirían en estudios en condiciones controladas.

En consecuencia, el presente proyecto de investigación aborda esta problemática, determinando la capacidad potencial que tienen los mitílidos de bioacumular este tipo de residuos y su impacto sobre la inocuidad alimentaria.

2.- Objetivos.

Obtener las curvas de depleción de la presentación comercial de Azametifos desde muestras de partes blandas de choritos (*Mytilus chilensis*), bajo condiciones controladas.

3.- Justificación.

El presente protocolo busca la obtención de las curvas de depleción del producto comercial de Azametifos utilizado en la salmonicultura nacional, de las partes blandas de choritos, bajo condiciones controladas, con la finalidad de levantar información técnica para la correcta toma de decisiones por parte de la Autoridad.



4.- Diseño del Estudio.

4.1.- Animales.

Se trabajará con choritos (*Mytilus chilensis*), en los grupos experimentales designados CD-CONT-Aza-M (Azametifos 50%, Bayer S.A.).

- Tamaño de choritos: Se utilizarán choritos de longitud de 4-6 cm.
- Número de choritos a utilizar: 300 individuos por estanque. Esto considera la mortalidad esperada (10%) y un retiro de 20 choritos en el tiempo cero (Control Negativo, antes de comenzar el tratamiento).
- Los choritos se mantendrán a una salinidad de 30 ± 2 ppm.
- Fuente de los choritos: Se obtendrán los individuos de un stock comercial, obtenidos desde zonas alejadas de centros de producción de salmones.
- Método(s) de identificación de los individuos: Los choritos se identificarán por estanques (Códigos CD-CONT-Aza-M).
- Criterio(s) de inclusión/exclusión: Se incluirán aquellos choritos aparentemente sanos y que estén dentro las tallas establecidas.
- Aclimatación de los choritos: La aclimatación de los choritos será de al menos 7 días antes del inicio del estudio, alimentándose con un cultivo de microalgas producida en el mismo centro.
- La experiencia se realizará en triplicado, denominándose los grupos y estanques como CD-CONT-Aza-M-1, CD-CONT-Aza-M-2, CD-CONT-Aza-M-3, respectivamente.

4.2.- Fármaco utilizado y controles.

- Fármaco estudiado: Azametifos (Azametifos 50%, Bayer S.A.).
- Dosis a evaluar: 100 ug/lit de agua por 60 minutos (tiempo máximo de exposición).

4.3.- Metodología de Muestreo.

Se realizará 1 muestreo de 20 choritos (4 pooles de 5 choritos cada uno) antes de comenzar el tratamiento, posteriormente se realizarán 4 muestreos programados, de 50 choritos (10 pooles de 5 choritos cada uno) por tiempo de muestreo, el primero 1 hora post-tratamiento y los tres restantes a los 5, 10, y 15 días desde el término del tratamiento. Al momento de muestrear los choritos, serán lavados con agua de mar, para eliminar el fármaco que pudiera estar en el exterior. Luego los choritos serán envasados en bolsas plásticas debidamente rotuladas, las que serán congeladas a -20°C , hasta su posterior envío al Laboratorio del IFOP en Puerto Montt.

4.4.- Instalaciones e Infraestructuras utilizadas en el estudio.

- Contención: Se utilizarán estanques de plástico reforzado de 300 litros de capacidad.



- Se mantendrá un registro diario de la temperatura de estanques, según POE 101: Procedimiento de registro de temperatura.
- Iluminación: Durante todo el ensayo se mantendrá un fotoperíodo ambiental normal de 12 horas luz y 12 horas de oscuridad.
- Salinidad de los estanques: Se mantendrá un registro diario de la salinidad de los estanques, según POE 102: Procedimiento de registro de salinidad.
- Concentración de oxígeno: Se mantendrá un nivel de oxígeno entre 6 y 10 mg/l, siendo el ideal 10 mg/L. Se mantendrá un registro diario de la concentración de oxígeno disuelto en estanques, según POE 104: Procedimiento de registro de concentración de oxígeno.
- Control del flujo de agua de los estanques: Se mantendrá un flujo de agua de aproximadamente 5 lt/min.
- Limpieza de estanques: Se realizará una limpieza diaria de los estanques bajo las rejillas y día por medio en las paredes laterales y de fondo a las 15 hrs.

4.5.- Dietas a utilizar en el estudio.

4.5.1.- Dieta:

Diariamente los bivalvos serán alimentados con *Isochrysis galbana* cada mañana.

4.5.2.- Tratamiento:

Los choritos serán transferidos a un estanque de 100 lt con Azametifos a una concentración de 100 ug/lt de agua por 60 minutos. Una vez transcurrido el tiempo de tratamiento, los choritos serán devueltos a su estanque original.

4.6.- Retiro de individuos del estudio.

Los individuos muertos se retirarán diariamente junto a la alimentación. Se llevará un registro de esto.

4.7.- Destino de alimento medicado y animales experimentales del estudio.

Con el fin de evitar la contaminación medioambiental todo el material medicado y restos de choritos serán incinerados.

5.- Programación.

- | | |
|-------------------------|---------------------------|
| - Día -7 a 0 | :Aclimatación de choritos |
| - Día 0 | : muestreo 20 choritos |
| - Día 1 postratamiento | : muestreo 50 choritos |
| - Día 5 postratamiento | : muestreo 50 choritos |
| - Día 10 postratamiento | : muestreo 50 choritos |
| - Día 15 postratamiento | : muestreo 50 choritos |

6.- Mediciones, observaciones, resultados y registros.



Los registros de temperatura, pH, salinidad y oxígeno disuelto de los estanques se obtendrán de acuerdo a los POE correspondientes y mantendrán en fichas en cada estanque de experimentación por todo el estudio.

7.- Obtención de las curvas de depleción.

En el Laboratorio de IFOP-Puerto Montt, se analizará la concentración de Azametifos (Aza) a pooles de 5 choritos (10 pooles por tiempo de muestreo) de las muestras obtenidas. Posteriormente se obtendrán las curvas de depleción graficando el logaritmo natural (Ln) de concentración de Azametifos vs el tiempo en días, y se obtendrá la ecuación de la recta. Para que la experiencia sea válida se deben cuantificar al menos 3 puntos de la recta. Es necesario que la regresión lineal, cumpla con ciertos requisitos: homogeneidad de las varianzas del Ln de concentración de Aza obtenido en cada día de muestreo, linealidad de Ln de concentración de Aza obtenido vs tiempo (se puede ver visualmente en el gráfico), distribución normal de errores (se puede ver con un gráfico de residuales). Con las curvas de depleción se calculará el tiempo de vida media ($T_{1/2}$) de Aza en las partes blandas del chorito.

8.- Informe.

Finalizado el estudio, se confeccionará un informe de estudio que resumirá los resultados obtenidos.

9.- Manejo de la información generada.

Durante el desarrollo del estudio, la Bitácora de Estudio y todo registro bruto se mantendrá dentro del Modulo Experimental de Especies Hidrobiológicas, IFOP Hueihue y con acceso restringido. Finalizado el estudio, todo registro será mantenido y archivado en dependencias de IFOP, Puerto Montt.

10.- Eventos inesperados.

Cualquier evento inesperado del desarrollo del estudio será documentado en la Bitácora de Estudio y se informará inmediatamente al Director del Estudio.

11.- Personal participante.

Director del Estudio: Luis Norambuena S.

Investigador Principal del Estudio: Luis Norambuena S.

Investigadores a cargo del Modulo Experimental de Especies Hidrobiológicas:
Mylene Menanteau y Loreto Ovalle



Personal Técnico en Modulo Experimental de Especies Hidrobiológicas: Dany Alvarez y Kitzka Kalergis

12.- Bibliografía.

Borja, À., 2002. Los impactos ambientales de la acuicultura y la sostenibilidad de esta actividad. Boletín ISSN: 0074-0195. Instituto Español de Oceanografía. Bol. Inst. Esp. Oceanogr. 18 (1-4), 41 - 49.

Buschmann, A., Fortt, A., 2005. Efectos ambientales de la acuicultura intensiva y alternativas para un desarrollo sustentable. Ambiente y Desarrollo. 21, 58-64.

Hormazabal, V., Steffenak, I., Yndestad, M., 1996. Simultaneous extraction and determination of florfenicol and the metabolite florfenicol amine in sediment by high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. A. 724, 364-366.

Lalumera, G.M., Calamari, D., Galli, P., Castiglioni, S., Crosa, G., Fanelli, R., 2004. Preliminary investigation on the environmental occurrence and effects of antibiotics used in aquaculture in Italy. Chemosphere. 54, 661-668.

Pouliquen, H., Morvan, M.L., 2005. Determination of Florfenicol in Freshwater, sediments and bryophyte fontinalis antipyretica by HPLC with Fluorescence. Chromatographia. 62, 225-231.

Pouliquen, H., Delépe, R., Thorin, Ch., Haury, J., Larhantec-Verdier, M., Morvan, M., Le Bris, H., 2009. Comparison of water, sediment, and plants for the monitoring of antibiotics: a case study on a river dedicated to fish farming. Environ. Toxicol. Chem. 28, 496-502.

Riviere, J. 2011. Comparative Pharmacokinetics: Principles, Techniques, and Applications, Second Edition, 442 p.

Riviere, J. and Mason, S. 2011. Tissue residues and withdrawal times. In: Comparative Pharmacokinetics: Principles, Techniques, and Applications, Second Edition, Edited by Jim E. Riviere, 413-424.

Sernapesca. 2011. Anuario Estadístico de Pesca 2011. Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura. Ministerio de Economía Fomento y Turismo. Sistemas de información y estadísticas pesqueras. Gobierno de Chile.

Uriarte, I. 2008. Estado actual del cultivo de moluscos bivalvos en Chile. Taller Técnico Regional de la FAO 20-24 de Agosto de 2007. Puerto Montt, Chile. FAO Actas de Pesca y Acuicultura Nº12. Roma. pp 61-75.





INSTITUTO DE FOMENTO PESQUERO



PROTOCOLO DE ESTUDIO

**Obtención de Curvas de Depleción de
Diflubenzurón en Mitílicos (*Mytilus chilensis*) en
condiciones controladas**

Identificación de Protocolo de Estudio: CD-CONT-Dif-M

Lugar de realización: Modulo Experimental de Especies Hidrobiológicas
Centro de Maricultura Hueihue, IFOP
Camino a Manao s/n, Ancud

Fono: Carrier-2-1964130.

Director del Estudio: Luis Norambuena S.

Investigador Principal del Estudio: Luis Norambuena S.

Proyecto: Evaluación de la capacidad de mitílicos de bioacumular productos químicos y farmacéuticos de uso en la acuicultura de la eficacia y seguridad de productos biológicos y determinación de las curvas de depleción de productos farmacológicos utilizados en la salmonicultura. SUBPESCA.

Fecha:



APROBACIÓN DE PROTOCOLO

Obtención de Curvas de Depleción de Diflubenzurón Mitílicos (*Mytilus chilensis*) en condiciones controladas

Identificación de Protocolo de Estudio: CD-CONT-Dif-M

DIRECTOR DE ESTUDIO: Luis Norambuena S.
Departamento de Salud Hidrobiológica.
División de Investigación en Acuicultura.
Instituto de Fomento Pesquero
Balmaceda 252, Puerto Montt

Fecha:

- 29 -



Firma:

APROBACION DE ESTUDIO POR COMITE CIENTIFICO

Mediante el presente documento se certifica que el siguiente estudio:

Título:

Obtención de Curvas de Depleción de Diflubenzurón en Mitílicos
(*Mytilus chilensis*) en condiciones controladas

Identificación de Protocolo de Estudio:

CD-CONT-Dif-M

ha sido aprobado por Comité Científico de IFOP, Puerto Montt.

Nombre:.....

Firma..... Fecha.....



Obtención de Curvas de Depleción de Diflubenzurón en Mitílidos (*Mytilus chilensis*) en condiciones controladas

Identificación de Protocolo de Estudio: CD-CONT-Dif-M

1.- Antecedentes.

La producción intensiva de mitílidos en Chile ha tenido un fuerte crecimiento en los últimos 10 años, posicionándose como el segundo mayor sector productivo de la acuicultura. El cultivo de choritos en Chile comenzó en 1961, y a partir del año 2006, el 100 % de la producción de éstos es de cultivo (Uriarte, I. 2008). La producción de moluscos bivalvos se realiza principalmente en la Región de Los Lagos, compartiendo zonas geográficas y cuerpos de agua similares con la producción de especies salmónidas. De las 288.587 toneladas de choritos cosechadas el año 2011, 288.579 toneladas fueron obtenidas en la Región de Los Lagos (SERNAPESCA, 2011).

En el proceso productivo de peces salmónidos pueden presentarse enfermedades infecciosas, parasitarias y fúngicas que requieren de tratamiento químico o farmacológico. Si bien el uso de productos terapéuticos ayuda a controlar estas enfermedades, también conlleva a la inclusión directa o indirecta de estos en la columna de agua. La incorporación directa incluye el uso de productos para uso en baño o a través del alimento medicado no ingerido por los peces, mientras que la indirecta incluye la inclusión a la columna de agua de metabolitos excretados por piel (mucus), heces y orina de los peces. En este contexto, el mayor riesgo identificado para la producción de mitílidos se encuentra en los productos terapéuticos utilizados en baños (piretroides). Los cuerpos de agua que contengan estos productos terapéuticos pueden llegar a zonas cercanas de producción de mitílidos.

Existe numerosa bibliografía de la liberación de fármacos al medio ambiente, como excreción fecal y urinaria, o como alimento medicado no ingerido por parte de peces de cultivo (Hormazabal et al., 1996, Lalumera et al, 2004, Pouliquen y Morvan, 2005, Pouliquen et al., 2009). El peligro de la aplicación de altas cantidades de estas sustancias, se evidencia en sus efectos colaterales, como puede ser la modificación cuantitativa y cualitativa de la flora bacteriana en el ambiente, afectando la conservación de la biodiversidad marina (Buschmann y Fortt, 2005), incidencia en las cadenas tróficas, desarrollo de defensas antibacterianas en patógenos de peces y transferencia



de resistencia bacteriana a patógenos humanos (Borja, 2002). Estudios llevados a cabo en sistemas intensivos de producción de peces, han demostrado que en ciertas ocasiones se puede detectar un impacto significativo en un radio de un kilómetro alrededor de las jaulas de cultivo, siendo éste generalmente, mayor en el fondo (Borja, 2002). Sin embargo no hay publicaciones de niveles de fármacos en mitílidos producto de la actividad salmonicultura.

Actualmente, en Chile y a nivel mundial, existe escaso conocimiento respecto de la capacidad de mitílidos de bioacumular, mediante su capacidad filtradora, productos terapéuticos a las dosis utilizadas. Asimismo, se desconoce si mediante el proceso de bioacumulación es posible encontrar residuos de productos químicos y farmacéuticos en los ejemplares de mitílidos. Sin embargo, se han realizados muchos estudios de depleción de diversos fármacos en animales, en los cuales éstos se medican de acuerdo a las dosis recomendada por cada fabricante y se obtienen muestras de matrices biológicas desde la suspensión de la medicación (Rievère y Mason, 2011). Así, las curvas de depleción son estudios de farmacocinética, toda vez que se evidencia el cambio de concentraciones a través del tiempo (Riviere, 2011). Debido a que los estudios de depleción se realizan bajo condiciones controladas, es necesario contrastarlos con estudios de campo, esto es especialmente necesario en mitílidos, ya que su exposición a los fármacos es muy inferior a la que recibirían en estudios en condiciones controladas.

En consecuencia, el presente proyecto de investigación aborda esta problemática, determinando la capacidad potencial que tienen los mitílidos de bioacumular este tipo de residuos y su impacto sobre la inocuidad alimentaria.

2.- Objetivos.

Obtener las curvas de depleción de la presentación comercial de Diflubenzurón desde muestras de partes blandas de choritos (*Mytilus chilensis*), bajo condiciones controladas.

3.- Justificación.

El presente protocolo busca la obtención de las curvas de depleción del producto comercial de Diflubenzurón utilizado en la salmonicultura nacional, de las partes blandas de choritos, bajo condiciones controladas, con la finalidad de levantar información técnica para la correcta toma de decisiones por parte de la Autoridad.



4.- Diseño del Estudio.

4.1.- Animales.

Se trabajará con Salmón del Atlántico (*Salmo salar*), en los grupos experimentales designados CD-CONT-Dif-M (Calishot Fav S.A.)

- Peso vivo inicial: Se iniciará el estudio con peces de un peso vivo promedio de 120 gramos +/-50 g.
- Tamaño de choritos: Se utilizarán choritos de longitud de 4-6 cm.
- Estado fisiológico: Se utilizarán peces sanos y libres de enfermedades concomitantes.
- Número de animales a utilizar: 20 peces y 300 choritos por estanque. Esto considera la mortalidad esperada (10%) y el retiro de 20 choritos antes de empezar el tratamiento.
- Fuente de los animales: Se obtendrán los peces de un stock comercial debidamente certificados sanitariamente. Los choritos serán obtenidos de sitios alejados de los centros de cultivo.
- Método(s) de identificación de los animales: Los choritos se identificarán por estanques (Códigos CD-CONT-Dif-M).
- Criterio(s) de inclusión/exclusión: Se incluirán aquellos peces sanos y que estén dentro los pesos vivos establecidos y choritos aparentemente sanos y que estén dentro las tallas establecidas.
- Aclimatación de los animales: La aclimatación de los peces y choritos será de al menos 7 días antes del inicio del estudio, sin realizar otros manejos sanitarios y alimentándose con una fórmula comercial no medicada.
- La experiencia se realizará en triplicado para el producto comercial, denominándose los grupos y estanques como CD-CONT-Dif-M-1, CD-CONT-Dif-M-2, CD-CONT-Dif-M-3, respectivamente.

4.2.- Fármaco utilizado y controles.

- Fármaco estudiado: Diflubenzurón.
- Dosis a evaluar: 6 mg/kg P.V. en 24 horas por 14 días, vía oral en alimento comercial.
- Almacenamiento del fármaco durante el estudio: Los alimentos medicados se almacenarán evitando el contacto con el alimento no medicado, otros peces y personal.

4.3.- Metodología de Muestreo.

Se realizará 1 muestreo de 20 choritos (4 pooles de 5 choritos cada uno) antes de comenzar el tratamiento, posteriormente se realizarán 4 muestreos programados, de 50 choritos (10 pooles de 5 choritos cada uno), el primer muestreo 1 día post-tratamiento y los otros a los 2, 5, y 7 días desde el término del tratamiento. Al momento de muestrear los choritos, serán lavados con agua de mar, para eliminar el fármaco que pudiera estar en el exterior. Luego los choritos serán envasados en bolsas plásticas debidamente rotuladas, las



que serán congeladas a -20°C , hasta su posterior envío al Laboratorio del IFOP en Puerto Montt.

4.4.- Instalaciones e Infraestructuras utilizadas en el estudio.

- Contención: Se utilizarán estanques de plástico reforzado de 300 litros de capacidad.
- Equipo de calefacción y/o enfriamiento: Se mantendrá un registro diario de la temperatura de estanques, según POE 101: Procedimiento de registro de temperatura.
- Iluminación: Durante todo el ensayo se mantendrá un fotoperíodo ambiental normal de 12 horas luz y 12 horas de oscuridad.
- Salinidad de los estanques: Se mantendrá un registro diario de la salinidad de los estanques, según POE 102: Procedimiento de registro de salinidad.
- Concentración de oxígeno: Se mantendrá un nivel de oxígeno entre 6 y 10 mg/l, siendo el ideal 10 mg/L. Se mantendrá un registro diario de la concentración de oxígeno disuelto en estanques, según POE 104: Procedimiento de registro de concentración de oxígeno.
- Control del flujo de agua de los estanques: Se mantendrá un flujo de agua de aproximadamente 5 lt/min.
- Limpieza de estanques: Se realizará una limpieza diaria de los estanques bajo las rejillas y día por medio en las paredes laterales y de fondo a las 15 hrs.

4.5.- Dietas a utilizar en el estudio.

4.5.1.- Dieta no medicada:

La dieta no medicada esta formulada de acuerdo a las necesidades nutricionales de cada especie de pez y a una razón de 1,4% PV.

4.5.2.- Dieta medicada:

Se utilizará una dieta idéntica a la anterior pero con una concentración conocida de Diflubenzurón, que equivaldrá a una concentración ingerida equivalente a 6 mg/Kg PV/día.

4.5.3.- Programa de alimentación:

La alimentación será 1 vez por día independiente de la dieta que se esté utilizando (no medicada o medicada). La dosis diaria a entregar será calculada para cada estanque en base a los antecedentes de número de peces del día y peso promedio de la semana. La dosis calculada será pesada utilizando balanza semianalítica marca Quiris con sensibilidad de 0.1 g., posteriormente se dividirá en 20 raciones las que serán entregadas manualmente por un alimentador asignado para esta experiencia en intervalos de 3 minutos finalizando la entrega de las 20 dosis en la totalidad del grupo experimental al cabo de 1 hora. La aplicación del tratamiento farmacológico se iniciará diariamente a las 12:00 AM durante 14 días.

4.5.4.- Adicionalmente los bivalvos serán alimentados diariamente con Isochrysis galbana cada mañana.

4.6.- Retiro de individuos del estudio.



Aquellos individuos que presenten evidencias de trastornos clínico-patológicos serán retirados del estudio y sacrificados, según POE 202: Procedimiento de sacrificio de peces. Los choritos muertos serán retirados diariamente.

4.7.- Destino de alimento medicado y animales experimentales del estudio.

Con el fin de evitar la contaminación medioambiental todo el material medicado y restos de animales y choritos serán incinerados.

5.- Programación.

- Día -7 a 0 :Aclimatación de choritos y peces con alimento normal
- Día 0 : muestreo 10 choritos
- Día 1 a 14 : alimentación con alimento medicado
- Día 1 postratamiento : muestreo 50 choritos
- Día 2 postratamiento : muestreo 50 choritos
- Día 5 postratamiento : muestreo 50 choritos
- Día 7 postratamiento : muestreo 50 choritos

6.- Mediciones, observaciones, resultados y registros.

Se mantendrá una Bitácora de Estudio donde se registrarán diariamente observaciones como apetito, letargia, entre otros. Adicionalmente, se monitoreará diariamente a todo el grupo experimental por sintomatología clínica anormal.

Los registros de temperatura, pH, salinidad y oxígeno disuelto de los estanques se obtendrán de acuerdo a los POE correspondientes y mantendrán en fichas en cada estanque de experimentación por todo el estudio.

7.- Obtención de las curvas de depleción.

En el Laboratorio de IFOP-Puerto Montt, se analizará la concentración de Diflubenzurón (Dif) a pooles de 5 choritos (10 pooles por tiempo de muestreo) de las muestras obtenidas. Posteriormente se obtendrán las curvas de depleción graficando el logaritmo natural (Ln) de concentración de Diflubenzurón vs el tiempo en días, y se obtendrá la ecuación de la recta. Para que la experiencia sea válida se deben cuantificar al menos 3 puntos de la recta. Es necesario que la regresión lineal, cumpla con ciertos requisitos: homogeneidad de las varianzas del Ln de concentración de Dif obtenido en cada día de muestreo, linealidad de Ln de concentración de Dif obtenido vs tiempo (se puede ver visualmente en el gráfico), distribución normal de errores (se puede ver con un gráfico de residuales). Con las curvas de depleción se calculará el tiempo de vida media ($T_{1/2}$) de Dif en las partes blandas del chorito.



8.- Informe.

Finalizado el estudio, se confeccionará un informe de estudio que resumirá los resultados obtenidos.

9.- Manejo de la información generada.

Durante el desarrollo del estudio, la Bitácora de Estudio y todo registro bruto se mantendrá dentro del Modulo Experimental de Especies Hidrobiológicas, IFOP Hueihue y con acceso restringido. Finalizado el estudio, todo registro será mantenido y archivado en dependencias de IFOP, Puerto Montt.

10.- Eventos inesperados.

Cualquier evento inesperado del desarrollo del estudio será documentado en la Bitácora de Estudio y se informará inmediatamente al Director del Estudio.

11.- Procedimientos Estándares Operacionales.

Se ocuparán Procedimientos Estándares Operacionales descritos en el presente protocolo.

12.- Personal participante.

Director del Estudio: Luis Norambuena S.

Investigador Principal del Estudio: Luis Norambuena S.

Investigadores a cargo del Modulo Experimental de Especies Hidrobiológicas:
Mylena Menanteau y Loreto Ovalle
Personal Técnico en Modulo Experimental de Especies Hidrobiológicas: Dany Alvarez y Kitza Kalergis

13.- Bibliografía.

Borja, À., 2002. Los impactos ambientales de la acuicultura y la sostenibilidad de esta actividad. Boletín ISSN: 0074-0195. Instituto Español de Oceanografía. Bol. Inst. Esp. Oceanogr. 18 (1-4), 41 - 49.

Buschmann, A., Fortt, A., 2005. Efectos ambientales de la acuicultura intensiva y alternativas para un desarrollo sustentable. Ambiente y Desarrollo. 21, 58-64.



Hormazabal, V., Steffenak, I., Yndestad, M., 1996. Simultaneous extraction and determination of florfenicol and the metabolite florfenicol amine in sediment by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* . 724, 364-366.

Lalumera, G.M., Calamari, D., Galli, P., Castiglioni, S., Crosa, G., Fanelli, R., 2004. Preliminary investigation on the environmental occurrence and effects of antibiotics used in aquaculture in Italy. *Chemosphere*. 54, 661-668.

Pouliquen, H., Morvan, M.L., 2005. Determination of Florfenicol in Freshwater, sediments and bryophyte *fontinalis antipyretica* by HPLC with Fluorescence. *Chromatographia*. 62, 225-231.

Pouliquen, H., Delépe, R., Thorin, Ch., Haury, J., Larhantec-Verdier, M., Morvan, M., Le Bris, H., 2009. Comparison of water, sediment, and plants for the monitoring of antibiotics: a case study on a river dedicated to fish farming. *Environ. Toxicol. Chem.* 28, 496-502.

Riviere, J. 2011. *Comparative Pharmacokinetics: Principles, Techniques, and Applications*, Second Edition, 442 p.

Riviere, J. and Mason, S. 2011. Tissue residues and withdrawal times. In: *Comparative Pharmacokinetics: Principles, Techniques, and Applications*, Second Edition, Edited by Jim E. Riviere, 413-424.

Sernapesca. 2011. Anuario Estadístico de Pesca 2011. Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura. Ministerio de Economía Fomento y Turismo. Sistemas de información y estadísticas pesqueras. Gobierno de Chile.

Uriarte, I. 2008. Estado actual del cultivo de moluscos bivalvos en Chile. Taller Técnico Regional de la FAO 20-24 de Agosto de 2007. Puerto Montt, Chile. FAO Actas de Pesca y Acuicultura N°12. Roma. pp 61-75.



INSTITUTO DE FOMENTO PESQUERO



PROCOLO DE ESTUDIO

**Obtención de Bioacumulación y Curva de
Depleción de Diflubenzurón en Mitílicos (*Mytilus
chilensis*) en condiciones controladas**

Identificación de Protocolo de Estudio: BA-CD-CONT-Dif-M

Lugar de realización: Modulo Experimental de Especies Hidrobiológicas
Centro de Maricultura Hueihue, IFOP
Camino a Manao s/n, Ancud

Fono: Carrier-2-1964130.

Director del Estudio: Luis Norambuena S.

Investigador Principal del Estudio: Luis Norambuena S.

Proyecto: Evaluación de la capacidad de mitílicos de bioacumular productos químicos y farmacéuticos de uso en la acuicultura de la eficacia y seguridad de productos biológicos y determinación de las curvas de depleción de productos farmacológicos utilizados en la salmonicultura. SUBPESCA.

Fecha:



APROBACIÓN DE PROTOCOLO

Obtención de Bioacumulación y Curva de Depleción
de Diflubenzurón Mitílidos (*Mytilus chilensis*) en
condiciones controladas

Identificación de Protocolo de Estudio: BA-CD-CONT-Dif-M

DIRECTOR DE ESTUDIO: Luis Norambuena S.
Departamento de Salud Hidrobiológica.
División de Investigación en Acuicultura.
Instituto de Fomento Pesquero
Balmaceda 252, Puerto Montt

Fecha:

- 39 -



Firma:

APROBACION DE ESTUDIO POR COMITE CIENTIFICO

Mediante el presente documento se certifica que el siguiente estudio:

Título:

Obtención de Bioacumulación y Curva de Depleción de Diflubenzurón en Mitílidos (*Mytilus chilensis*) en condiciones controladas

Identificación de Protocolo de Estudio:

BA-CD-CONT-Dif-M

ha sido aprobado por Comité Científico de IFOP, Puerto Montt.

Nombre:.....

Firma..... Fecha.....

- 40 -



Obtención de Bioacumulación y Curva de Depleción de Diflubenzurón en Mitílicos (*Mytilus chilensis*) en condiciones controladas

Identificación de Protocolo de Estudio: BA-CD-CONT-Dif-M

1.- Antecedentes.

La producción intensiva de mitílicos en Chile ha tenido un fuerte crecimiento en los últimos 10 años, posicionándose como el segundo mayor sector productivo de la acuicultura. El cultivo de choritos en Chile comenzó en 1961, y a partir del año 2006, el 100 % de la producción de éstos es de cultivo (Uriarte, I. 2008). La producción de moluscos bivalvos se realiza principalmente en la Región de Los Lagos, compartiendo zonas geográficas y cuerpos de agua similares con la producción de especies salmónidas. De las 288.587 toneladas de choritos cosechadas el año 2011, 288.579 toneladas fueron obtenidas en la Región de Los Lagos (SERNAPESCA, 2011).

En el proceso productivo de peces salmónidos pueden presentarse enfermedades infecciosas, parasitarias y fúngicas que requieren de tratamiento químico o farmacológico. Si bien el uso de productos terapéuticos ayuda a controlar estas enfermedades, también conlleva a la inclusión directa o indirecta de estos en la columna de agua. La incorporación directa incluye el uso de productos para uso en baño o a través del alimento medicado no ingerido por los peces, mientras que la indirecta incluye la inclusión a la columna de agua de metabolitos excretados por piel (mucus), heces y orina de los peces. En este contexto, el mayor riesgo identificado para la producción de mitílicos se encuentra en los productos terapéuticos utilizados en baños (piretroides). Los cuerpos de agua que contengan estos productos terapéuticos pueden llegar a zonas cercanas de producción de mitílicos.

Existe numerosa bibliografía de la liberación de fármacos al medio ambiente, como excreción fecal y urinaria, o como alimento medicado no ingerido por parte de peces de cultivo (Hormazabal et al., 1996, Lalumera et al, 2004, Pouliquen y Morvan, 2005, Pouliquen et al., 2009). El peligro de la aplicación de altas cantidades de estas sustancias, se evidencia en sus efectos colaterales, como puede ser la modificación cuantitativa y cualitativa de la flora bacteriana en el ambiente, afectando la conservación de la biodiversidad

- 41 -



marina (Buschmann y Fortt, 2005), incidencia en las cadenas tróficas, desarrollo de defensas antibacterianas en patógenos de peces y transferencia de resistencia bacteriana a patógenos humanos (Borja, 2002). Estudios llevados a cabo en sistemas intensivos de producción de peces, han demostrado que en ciertas ocasiones se puede detectar un impacto significativo en un radio de un kilómetro alrededor de las jaulas de cultivo, siendo éste generalmente, mayor en el fondo (Borja, 2002). Sin embargo no hay publicaciones de niveles de fármacos en mitílidos producto de la actividad salmonicultra.

Actualmente, en Chile y a nivel mundial, existe escaso conocimiento respecto de la capacidad de mitílidos de bioacumular, mediante su capacidad filtradora, productos terapéuticos a las dosis utilizadas. Asimismo, se desconoce si mediante el proceso de bioacumulación es posible encontrar residuos de productos químicos y farmacéuticos en los ejemplares de mitílidos. Sin embargo, se han realizados muchos estudios de depleción de diversos fármacos en animales, en los cuales éstos se medican de acuerdo a las dosis recomendada por cada fabricante y se obtienen muestras de matrices biológicas desde la suspensión de la medicación (Rievère y Mason, 2011). Así, las curvas de depleción son estudios de farmacocinética, toda vez que se evidencia el cambio de concentraciones a través del tiempo (Rivière, 2011). Debido a que los estudios de depleción se realizan bajo condiciones controladas, es necesario contrastarlos con estudios de campo, esto es especialmente necesario en mitílidos, ya que su exposición a los fármacos es muy inferior a la que recibirían en estudios en condiciones controladas.

En consecuencia, el presente proyecto de investigación aborda esta problemática, determinando la capacidad potencial que tienen los mitílidos de bioacumular este tipo de residuos y su impacto sobre la inocuidad alimentaria.

2.- Objetivos.

Obtener la bioacumulación y curva de depleción de la presentación comercial de Diflubenzurón desde muestras de partes blandas de choritos (*Mytilus chilensis*), bajo condiciones controladas.

3.- Justificación.

El presente protocolo busca la obtención de las curvas de depleción del producto comercial de Diflubenzurón utilizado en la salmonicultra nacional, de las partes blandas de choritos, bajo condiciones controladas, con la finalidad de levantar información técnica para la correcta toma de decisiones por parte de la Autoridad.



4.- Diseño del Estudio.

4.1.- Animales.

Se trabajará con Trucha Arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*, en los grupos experimentales designados BA-CD-CONT-Dif-M (Calishot Fav S.A.)

- Peso vivo inicial: Se iniciará el estudio con peces de un peso vivo promedio de 150 gramos +/-50 g.
- Tamaño de choritos: Se utilizarán choritos de longitud de 4-6 cm.
- Estado fisiológico: Se utilizarán peces sanos y libres de enfermedades concomitantes.
- Número de animales a utilizar: 60 peces y 600 choritos por estanque. Esto considera la mortalidad esperada (10%) y el retiro de 20 choritos antes de empezar el tratamiento.
- Fuente de los animales: Se obtendrán los peces de un stock comercial debidamente certificados sanitariamente. Los choritos serán obtenidos de sitios alejados de los centros de cultivo.
- Método(s) de identificación de los animales: Los choritos se identificarán por estanques (Códigos BA-CD-CONT-Dif-M).
- Criterio(s) de inclusión/exclusión: Se incluirán aquellos peces sanos y que estén dentro los pesos vivos establecidos y choritos aparentemente sanos y que estén dentro las tallas establecidas.
- Aclimatación de los animales: La aclimatación de los peces y choritos será de al menos 7 días antes del inicio del estudio, sin realizar otros manejos sanitarios y alimentándose con una fórmula comercial no medicada.
- La experiencia se realizará en triplicado para el producto comercial, denominándose los grupos y estanques como BA-CD-CONT-Dif-M-1, BA-CD-CONT-Dif-M-2, BA-CD-CONT-Dif-M-3, respectivamente.

4.2.- Fármaco utilizado y controles.

- Fármaco estudiado: Diflubenzurón.
- Dosis a evaluar: 6 mg/kg P.V. en 24 horas por 14 días, vía oral en alimento comercial.
- Almacenamiento del fármaco durante el estudio: Los alimentos medicados se almacenarán evitando el contacto con el alimento no medicado, otros peces y personal.

4.3.- Metodología de Muestreo.

Se realizará 1 muestreo de 20 choritos (4 pooles de 5 choritos cada uno) antes de comenzar el tratamiento, posteriormente se realizarán 8 muestreos programados, de 50 choritos (10 pooles de 5 choritos cada uno), Los primeros 4 muestreos serán durante el tratamiento (días 4, 7, 11 y 14 de tratamiento), los otros 4 tiempos de muestreo serán una vez finalizado el tratamiento (días 1, 2, 3, y 7 post-tratamiento). Al momento de muestrear los choritos, serán lavados con agua de mar, para eliminar el fármaco que pudiera estar en el exterior. Luego los choritos serán envasados en bolsas plásticas debidamente



rotuladas, las que serán congeladas a -20°C , hasta su posterior envío al Laboratorio del IFOP en Puerto Montt.

4.4.- Instalaciones e Infraestructuras utilizadas en el estudio.

- Contención: Se utilizarán estanques de plástico reforzado de 1000 litros de capacidad.
- Equipo de calefacción y/o enfriamiento: Se mantendrá un registro diario de la temperatura de estanques, según POE 101: Procedimiento de registro de temperatura.
- Iluminación: Durante todo el ensayo se mantendrá un fotoperíodo ambiental normal de 12 horas luz y 12 horas de oscuridad.
- Salinidad de los estanques: Se mantendrá un registro diario de la salinidad de los estanques, según POE 102: Procedimiento de registro de salinidad.
- Concentración de oxígeno: Se mantendrá un nivel de oxígeno entre 6 y 10 mg/l, siendo el ideal 10 mg/L. Se mantendrá un registro diario de la concentración de oxígeno disuelto en estanques, según POE 104: Procedimiento de registro de concentración de oxígeno.
- Control del flujo de agua de los estanques: Se mantendrá un flujo de agua de aproximadamente 5 lt/min.
- Limpieza de estanques: Se realizará una limpieza diaria de los estanques bajo las rejillas y día por medio en las paredes laterales y de fondo a las 15 hrs.

4.5.- Dietas a utilizar en el estudio.

4.5.1.- Dieta no medicada:

La dieta no medicada esta formulada de acuerdo a las necesidades nutricionales de cada especie de pez y a una razón de 1,2% PV.

4.5.2.- Dieta medicada:

Se utilizará una dieta idéntica a la anterior pero con una concentración conocida de Diflubenzurón, que equivaldrá a una concentración ingerida equivalente a 6 mg/Kg PV/día.

4.5.3.- Programa de alimentación:

La alimentación será 1 vez por día independiente de la dieta que se esté utilizando (no medicada o medicada). La dosis diaria a entregar será calculada para cada estanque en base a los antecedentes de número de peces del día y peso promedio de la semana. La dosis calculada será pesada utilizando balanza semianalítica marca Quiris con sensibilidad de 0.1 g., posteriormente se dividirá en 20 raciones las que serán entregadas manualmente por un alimentador asignado para esta experiencia en intervalos de 3 minutos finalizando la entrega de las 20 dosis en la totalidad del grupo experimental al cabo de 1 hora. La aplicación del tratamiento farmacológico se iniciará diariamente a las 12:00 AM durante 14 días.

4.6.- Retiro de individuos del estudio.



Aquellos individuos que presenten evidencias de trastornos clínico-patológicos serán retirados del estudio y sacrificados, según POE 202: Procedimiento de sacrificio de peces. Los choritos muertos serán retirados diariamente.

4.7.- Destino de alimento medicado y animales experimentales del estudio.

Con el fin de evitar la contaminación medioambiental todo el material medicado y restos de animales y choritos serán incinerados.

5.- Programación.

- Día -7 a 0 :Aclimatación de choritos y peces con alimento normal
- Día 0 : muestreo 10 choritos
- Día 1 a 14 : alimentación con alimento medicado
- Día 4 de tratamiento : muestreo 50 choritos
- Día 7 de tratamiento : muestreo 50 choritos
- Día 11 de tratamiento : muestreo 50 choritos
- Día 14 de tratamiento : muestreo 50 choritos
- Día 1 postratamiento : muestreo 50 choritos
- Día 2 postratamiento : muestreo 50 choritos
- Día 3 postratamiento : muestreo 50 choritos
- Día 7 postratamiento : muestreo 50 choritos

6.- Mediciones, observaciones, resultados y registros.

Se mantendrá una Bitácora de Estudio donde se registrarán diariamente observaciones como apetito, letargia, entre otros. Adicionalmente, se monitoreará diariamente a todo el grupo experimental por sintomatología clínica anormal.

Los registros de temperatura, pH, salinidad y oxígeno disuelto de los estanques se obtendrán de acuerdo a los POE correspondientes y mantendrán en fichas en cada estanque de experimentación por todo el estudio.

7.- Obtención de las curvas de depleción.

En el Laboratorio de IFOP-Puerto Montt, se analizará la concentración de Diflubenzurón (Dif) a pools de 5 choritos (10 pools por tiempo de muestreo) de las muestras obtenidas. Posteriormente se obtendrán las curvas de depleción graficando el logaritmo natural (Ln) de concentración de Diflubenzurón vs el tiempo en días, y se obtendrá la ecuación de la recta. Para que la experiencia sea válida se deben cuantificar al menos 3 puntos de la recta. Es necesario que la regresión lineal, cumpla con ciertos requisitos: homogeneidad de las varianzas del Ln de concentración de Dif obtenido en cada día de muestreo, linealidad de Ln de concentración de Dif obtenido vs tiempo (se puede ver visualmente en el gráfico), distribución normal de errores



(se puede ver con un gráfico de residuales). Con las curvas de depleción se calculará el tiempo de vida media ($T_{1/2}$) de Dif en las partes blandas del chorrito.

8.- Informe.

Finalizado el estudio, se confeccionará un informe de estudio que resumirá los resultados obtenidos.

9.- Manejo de la información generada.

Durante el desarrollo del estudio, la Bitácora de Estudio y todo registro bruto se mantendrá dentro del Modulo Experimental de Especies Hidrobiológicas, IFOP Hueihue y con acceso restringido. Finalizado el estudio, todo registro será mantenido y archivado en dependencias de IFOP, Puerto Montt.

10.- Eventos inesperados.

Cualquier evento inesperado del desarrollo del estudio será documentado en la Bitácora de Estudio y se informará inmediatamente al Director del Estudio.

11.- Procedimientos Estándares Operacionales.

Se ocuparán Procedimientos Estándares Operacionales descritos en el presente protocolo.

12.- Personal participante.

Director del Estudio: Luis Norambuena S.

Investigador Principal del Estudio: Luis Norambuena S.

Investigadores a cargo del Modulo Experimental de Especies Hidrobiológicas:
Mylena Menanteau y Loreto Ovalle

Personal Técnico en Modulo Experimental de Especies Hidrobiológicas: Dany Alvarez

13.- Bibliografía.

Borja, À., 2002. Los impactos ambientales de la acuicultura y la sostenibilidad de esta actividad. Boletín ISSN: 0074-0195. Instituto Español de Oceanografía. Bol. Inst. Esp. Oceanogr. 18 (1-4), 41 - 49.

Buschmann, A., Fortt, A., 2005. Efectos ambientales de la acuicultura intensiva y alternativas para un desarrollo sustentable. Ambiente y Desarrollo. 21, 58-64.



Hormazabal, V., Steffenak, I., Yndestad, M., 1996. Simultaneous extraction and determination of florfenicol and the metabolite florfenicol amine in sediment by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* 724, 364-366.

Lalumera, G.M., Calamari, D., Galli, P., Castiglioni, S., Crosa, G., Fanelli, R., 2004. Preliminary investigation on the environmental occurrence and effects of antibiotics used in aquaculture in Italy. *Chemosphere.* 54, 661-668.

Pouliquen, H., Morvan, M.L., 2005. Determination of Florfenicol in Freshwater, sediments and bryophyte *fontinalis antipyretica* by HPLC with Fluorescence. *Chromatographia.* 62, 225-231.

Pouliquen, H., Delépe, R., Thorin, Ch., Haury, J., Larhantec-Verdier, M., Morvan, M., Le Bris, H., 2009. Comparison of water, sediment, and plants for the monitoring of antibiotics: a case study on a river dedicated to fish farming. *Environ. Toxicol. Chem.* 28, 496-502.

Riviere, J. 2011. *Comparative Pharmacokinetics: Principles, Techniques, and Applications*, Second Edition, 442 p.

Riviere, J. and Mason, S. 2011. Tissue residues and withdrawal times. In: *Comparative Pharmacokinetics: Principles, Techniques, and Applications*, Second Edition, Edited by Jim E. Riviere, 413-424.

Sernapesca. 2011. *Anuario Estadístico de Pesca 2011*. Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura. Ministerio de Economía Fomento y Turismo. Sistemas de información y estadísticas pesqueras. Gobierno de Chile.

Uriarte, I. 2008. Estado actual del cultivo de moluscos bivalvos en Chile. Taller Técnico Regional de la FAO 20-24 de Agosto de 2007. Puerto Montt, Chile. *FAO Actas de Pesca y Acuicultura Nº12*. Roma. pp 61-75.

A N E X O 2

Productos Antiparasitarios para control de Caligidosis en Salmónidos. Registro del Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), actualizado al 5 de marzo de 2015.



PRODUCTOS ANTIPARASITARIOS PARA CONTROL DE CALIGIDOSIS EN SALMONIDEOS CON REGISTRO DEL SERVICIO AGRICOLA Y GANADERO (SAG)

Actualizado al 02-Mar-15

N° Registro SAG	Nombre comercial	Principio activo	Familia	Concentración	Forma Farmaceutica y Via Empleo	Dosis de principio activo y tiempo aplicación	Titular	Período de resguardo
655	Slice® 0,2%	Benzoato de Emamectina	Avermectinas	0,2% 2,0 mg/g - 2,0 g/kg	Polvo uso oral, en el alimento	50 µg/ kg peso x 7 días	Intervet Chile Ltda.	60 días antes de cosecha
725	Calbiofarm®	Benzoato de Emamectina	Avermectinas	0,2% 2,0 mg/g - 2,0 g/kg	Polvo uso oral, en el alimento	50 µg/ kg peso x 7 días	Farmacología en Acuicultura Veterinaria FAV S.A.	60 días antes de cosecha
1289	No registra	Benzoato de Emamectina	Avermectinas	0,2% 2,0 mg/g - 2,0 g/kg	Polvo uso oral, en el alimento	51 µg/ kg peso x 7 días	Diagnotec Comercial S.A.	60 días antes de cosecha
1333	No registra	Benzoato de Emamectina	Avermectinas	0,2% 2,0 mg/g - 2,0 g/kg	Polvo uso oral, en el alimento	50 µg/ kg peso x 7 días	Intervet Chile Ltda.	60 días antes de cosecha
1381	Quinafish®	Benzoato de Emamectina	Avermectinas	0,2% 2,0 mg/g - 2,0 g/kg	Polvo uso oral, en el alimento	50 µg/ kg peso x 7 días	Centrovet Ltda.	60 días antes de cosecha
2068	Calishot®	Diflubenzurón	Benzoilureas	80% 800 mg/g - 800 g/kg	Polvo uso oral, en el alimento	6 mg/kg peso x 14 días	Farmacología en Acuicultura Veterinaria FAV S.A.	300 grados día
2079	AMX®	Deltametrina	Piretroides	1% 10 mg/ml	Solución externa para inmersión	2 mg/mt ³ - 0,2 ml/mt ³ x 30 - 40 min	Pharmaq A.S Chile Ltda.	10 grados día
2085	Betamax®	Cipermetrina	Piretroides	5% 50 mg/ml	Solución externa para inmersión	15 mg/mt ³ - 15 ml/mt ³ x 30 min	Novartis Chile S.A	30 grados día
2093	Deltafav®	Deltametrina	Piretroides	1% 10 mg/ml	Solución externa para inmersión	3 mg/mt ³ - 0,3 ml/mt ³ x 40 min	Farmacología en Acuicultura Veterinaria FAV S.A.	20 grados día
2189	Bylice®	Azametifos 50%	Organo fosforado	50% 500 mg/g - 500 g/kg	Polvo para suspensión externa	100 µg/lit - 100 mg/mt ³ x 30 - 60 min	Bayer S.A.	10 grados día
2240	CalFree	Azametifos 50%	Organo fosforado	50% 500 mg/g - 500 g/kg	Polvo para solución externa	100 µg/lit - 100 mg/mt ³ x 30 min	Farmacología en Acuicultura Veterinaria FAV S.A.	20 grados día

Nota:

Todos los productos antiparasitarios se encuentran registrados para su comercialización bajo la modalidad de **Venta con Receta Retenida y Control de Saldo**

MJM/mjm



INSTITUTO DE FOMENTO PESQUERO / DIVISIÓN INVESTIGACIÓN EN ACUICULTURA

A N E X O 3

Publicaciones científicas revisadas de bioacumulación de productos terapéuticos de uso en acuicultura en mitílidos y de detección de antiparasitarios.



Publicaciones científicas revisadas de Bioacumulación de Productos Terapéuticos de Uso en Acuicultura en Mitílicos

- Bachelot M, Li Z, Munaron D, Le Gall P, Casellas C, Fenet H, Gomez E. 2012. Organic UV filter concentrations in marine mussels from French coastal regions. *Sci Total Environ.* 2012 Mar 15; 420:273-9.
- Chen HG, Jia XP, Cai WG, Lin Q, Ma SW. 2011. Antioxidant responses and bioaccumulation in green-lipped mussels (*Perna viridis*) under acute tributyltin chloride exposure. *Bull Environ Contam Toxicol.* 2011 Nov; 87(5):506-11.
- Fabbri D, Baravelli V, Giannotti K, Donnini F, Fabbri E. 2006. Bioaccumulation of cyclopenta[cd]pyrene and benzo[ghi]fluoranthene by mussels transplanted in a coastal lagoon. *Chemosphere.* Aug; 64(7):1083-92.
- Fang JK, Wu RS, Zheng GJ, Lam PK, Shin PK. 2010. Seasonality of bioaccumulation of trace organics and lysosomal integrity in green-lipped mussel *Perna viridis*. *Sci Total Environ.* 2010 Feb 15;408(6):1458-65.
- Gowland B, Webster L, Fryer R, Davies I, Moffat C, Stagg R. 2002. Uptake and effects of the cypermethrin-containing sea lice treatment Excis in the marine mussel, *Mytilus edulis*. *Environmental Pollution* 120 (2002) 805-811.
- Katagi T. 2010. Bioconcentration, bioaccumulation, and metabolism of pesticides in aquatic organisms. *Rev Environ Contam Toxicol.* 2010;204:1-132.
- A. Mazzola, G. Sarà. 2001. The effect of fish farming organic waste on food availability for bivalve molluscs (Gaeta Gulf, Central Tyrrhenian, MED): stable carbon isotopic analysis. *Aquaculture* Volume 192, Issues 2-4, 15 January 2001, Pages 361-379.
- Nesto N, Romano S, Moschino V, Mauri M, Da Ros L. 2007. Bioaccumulation and biomarker responses of trace metals and micro-organic pollutants in mussels and fish from the Lagoon of Venice, Italy. *Mar Pollut Bull.* 2007;55(10-12):469-84.
- Ricciardi F, Matozzo V, Marin MG. 2008. Effects of 4-nonylphenol exposure in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and crabs (*Carcinus aestuarii*) with particular emphasis on vitellogenin induction. *Mar Pollut Bull.* 2008;57(6-12):365-72.
- Skarphedinsdottir H, Gunnarsson K, Gudmundsson GA, Nfon E. 2010. Bioaccumulation and biomagnification of organochlorines in a marine food web at a pristine site in Iceland. *Arch Environ Contam Toxicol.* 2010 Apr;58(3):800-9.
- Yakan SD, Henkelmann B, Schramm K-W, Okay OS. 2011. Bioaccumulation depuration kinetics and effects of benzo(a)anthracene on *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Pollution Bulletin* 63 (2011) 471-476.



Publicaciones científicas revisadas de Detección de Antiparasitarios

- Armenta S., Quintás G., Garrigues S., De la Guardia M. 2005. A validated and fast procedure for FTIR determination of Cypermethrin and Chlorpyrifos. *Talanta* Volume 67, Issue 3, 15 September 2005, Pages 634–639
- Aulakh, J.S., Malik, A.K. & Mahjan, R.K. 2005. Solid phase microextraction – high pressure liquid chromatographic determination of nabam, thiram and azamethiphos in water samples with UV detection: preliminary data. *Talanta*, 66, 266–270.
- Balinova. A., 1998. Multiresidue determination of pesticides in plants by high-performance liquid chromatography following gel permeation chromatographic clean-up. *Journal of Chromatography A*. Volume 823, Issues 1–2, 9 October 1998, Pages 11–16.
- Bedendo Gizelle Cristina, Isabel Cristina Sales Fontes Jardim, Eduardo Carasek. 2012. Multiresidue determination of pesticides in industrial and fresh orange juice by hollow fiber microporous membrane liquid–liquid extraction and detection by liquid chromatography–electrospray-tandem mass spectrometry. *Talanta*. Volume 88, 15 January 2012, Pages 573–580.
- Boonchiangma S, Ngeontae W, Srijaranai S. 2012. Determination of six pyrethroid insecticides in fruit juice samples using dispersive liquid-liquid microextraction combined with high performance liquid chromatography. *Talanta*.
- Brondi Silvia H. G. Adriana N. Macedo and Ana R. A. Nogueira. Evaluation of QuEChERS Method for Analysis of Cypermethrin Residue in Cow's Milk. 2nd Latin American Pesticide Residue Workshop-L APRW 2009. SP-PP-2009.00278.
- Carro A.M., García-Rodríguez D, Gonzalez-Siso P, Lorenzo RA. 2012. Determination of chemotherapeutic agents in fish and shellfish by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Sep Sci*. 35(21):2866-74
- Chalányová M., Hutta M., Pagác M. 2010. On-line flow-through extraction-preconcentration-large volume injection-RP LC for trace determination of pyrethroids in Slovak soil. *J Sep Sci*. 2010 Feb;33.(2):134-42.
- Carneiro Raphaella P. , Fabiano A.S. Oliveira, Fernando D. Madureira, Gilsara Silva, Wesley R. de Souza, Renata Pereira Lopes. 2013. Development and method validation for determination of 128 pesticides in bananas by modified QuEChERS and UHPLC–MS/MS analysis. *Food Control*, Volume 33, Issue 2, October 2013, Pages 413–423.
- De La Colina, C.; Báez, M.E.; Pena, A.; Romero, E; Dios, G. 1994. Simultaneous determination of various pesticides in water by solid-phase extraction/HPLC with photodiode array detection. *Science of the Total Environment*: 153 1-6.



- Dommarco R. , A Santilio, L Fornarelli, M Rubbiani. 1998. Simultaneous quantitative determination of thirteen urea pesticides at sub-ppb levels on a Zorbax SB-C₁₈ column. *Journal of Chromatography A*. Volume 825, Issue 2, 6 November 1998, Pages 200–204
- Ferrer I. , V Pichon, M.-C Hennion, D Barceló. 1997. Automated sample preparation with extraction columns by means of anti-isoproturon immunosorbents for the determination of phenylurea herbicides in water followed by liquid chromatography–diode array detection and liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. Volume 777, Issue 1, 8 August 1997, Pages 91–98.
- García Gil, M.D.; Martínez Galera, M.; Barranco Martínez, D.; Gisbert Gallego, J. 2006. Determination of benzoylureas in ground water samples by fully automated on-line pre-concentration and liquid chromatography–fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*. Vol. 1103 Issue 2, p271-277
- Gilbert-López Bienvenida, Juan F. García-Reyes, Ana Lozano, Amadeo R. Fernández-Alba, Antonio Molina-Díaz. 2010. Large-scale pesticide testing in olives by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry using two sample preparation methods based on matrix solid-phase dispersion and QuEChERS. *Journal of Chromatography A*. Volume 1217, Issue 39, 24 September 2010, Pages 6022–6035
- Guoqiang Chen, Pengying Cao, Renjiang Liu. 2011. A multi-residue method for fast determination of pesticides in tea by ultra performance liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry combined with modified QuEChERS sample preparation procedure. *Food Chemistry*. Volume 125, Issue 4, 15 April 2011, Pages 1406–1411.
- Jianhua Cheng, Miao Liu, Yong Yu, Xiupin Wang, Hanqi Zhang, Lan Ding, Haiyan Jin. 2009. Determination of pyrethroids in porcine tissues by matrix solid-phase dispersion extraction and high-performance liquid chromatography. *Meat Science* Volume 82, Issue 4, August 2009, Pages 407–412.
- Jiaheng Zhang, Zhe Liang, Songqing Li, Yubo Li, Bing Peng, Wenfeng Zhou, Haixiang Gao. 2012. In-situ metathesis reaction combined with ultrasound-assisted ionic liquid dispersive liquid–liquid microextraction method for the determination of phenylurea pesticides in water samples. *Talanta*. Volume 98, 30 August 2012, Pages 145–151
- Kyu Bong Kim, Michael G. Bartlett, Sathanandam S. Anand, James V. Bruckner, Hyo Jung Kim. 2006. Rapid determination of the synthetic pyrethroid insecticide, deltamethrin, in rat plasma and tissues by HPLC. *Journal of Chromatography B*, Volume 834, Issues 1–2, 13 April 2006, Pages 141–148
- Lesueur, C. P. Knittl, M. Gartner, A. Mentler, M. Fuerhacker. 2008. Analysis of 140 pesticides from conventional farming foodstuff samples after extraction with the modified QuEChERS method. *Food Control*. Volume 19, Issue 9, September 2008, Pages 906–914



- López-López T. , M.D. Gil-García, J.L. Martínez-Vidal, M. Martínez-Galera. 2001. Determination of pyrethroids in vegetables by HPLC using continuous on-line post-elution photoirradiation with fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta* 447 (2001) 101–111
- Luvizotto-Santos R., Marques Cordeiro P.J., Vieira E.M. 2009. Análisis of Diflubenzuron in Tilapia Filet by HPLC-DAD. *Journal of Chromatographic Science*, Vol 47, 785-788
- Martínez-Galera M. , T López-López, M.D Gil-García, J.L Martínez-Vidal, P Parrilla Vázquez.2001. Determination of benzoylureas in tomato by high-performance liquid chromatography using continuous on-line post-elution photoirradiation with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*. Volume 918, Issue 1, 18 May 2001, Pages 79–85.
- Mayer-Helm Bernhard, Ludwig Hofbauer, Jutta Müller. 2008. Method development for the determination of selected pesticides on tobacco by high-performance liquid chromatography–electrospray ionisation–tandem mass spectrometry. *Talanta*. Volume 74, Issue 5, 15 February 2008, Pages 1184–1190.
- Miliadis George E. , Nicholas G Tsiropoulos, Pipina G Aplada-Sarlis.1999. High-performance liquid chromatographic determination of benzoylurea insecticides residues in grapes and wine using liquid and solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A*. Volume 835, Issues 1–2, 12 March 1999, Pages 113–120
- Muhammad Faqir, Mian Muhammad Awais, Masood Akhtar and Muhammad Irfan Anwar. 2013. Quantitative structure activity relationship and risk analysis of some pesticides in the goat milk. *Iranian Journal of Environmental Health Sciences & Engineering* 2013, 10:4
- Nisharaj N.R., Thomas S, P.A. Mary Helen P.A., Jaya Sree S., Suku Sh. 2012. Biodegradation of Cypermethrin. *Intl. J. Agric. Env. Biotech.* 5(1) : 1-4, March 2012
- Park Ji-Yeon, Jeong-Heui Choi, A.M. Abd El-Aty, Bo Mi Kim, Jae-Ho Oh, Jung-Ah Do, Ki Sung Kwon, Ki-Hoon Shim, Ok-Ja Choi, Sung Chul Shin, Jae-Han Shim. 2011. Simultaneous multiresidue analysis of 41 pesticide residues in cooked foodstuff using QuEChERS: Comparison with classical method. *Food Chemistry*, Volume 128, Issue 1, 1 September 2011, Pages 241–253
- Pfenning Allen P., José E. Roybal, Sherri B. Turnipseed, Steve A. Gonzales, And Jeffrey A. Hurlbut. 1999. Determination of Residues of Azamethiphos in Salmon Tissue by Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. *Journal Of Aoac International* Vol. 82, N°. 5, 1224-1228
- Rawn Dorothea F. K., Tom Krakalovich, Donald S. Forsyth & Veronica Roscoe. 2009. Analysis of fin and non-fin fish products for azamethiphos and dichlorvos residues from the Canadian retail market. *International Journal of Food Science and Technology* 2009, 44, 1510–1516
- Rawn Dorothea F. K., Judy Judge, Veronica Roscoe. 2010. Application of the QuEChERS method for the analysis of pyrethrins and pyrethroids in fish tissues. *Anal Bioanal Chem* (2010) 397:2525–2531



- Rodríguez E., R.J. Barrio, A. Goicolea, Z. Gómez de Balugera. 1999. Determination of diflubenzuron and its main metabolites in forestry matrices by liquid chromatography with on-line diode-array and electrochemical detection. *Analytica Chimica Acta*. Volume 384, Issue 1, 22 March 1999, Pages 63–70
- Roscoe Veronica, Judy Judge, Dorothea F. K. Rawn. 2008. Application of the QuEChERS extraction method for the analysis of pyrethrin and pyrethroid pesticides in fin and non-fin fish. Presentation: Western Canada Trace Organic Workshop, 2008
- Saraji M, Tansazan N. 2009. Application of dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of phenylurea herbicides in water samples by HPLC-diode array detection. *J Sep Sci*. 2009 Dec;32(23-24):4186-92
- Tfouni S.A.V., Furlani R.P.Z., Carreiro L.B., Loredo I.S.D., Gomes A.G., Alves L.A., Mata R.S.S., Fonseca A.M.D., Rocha R.M.S. 2013. Determination of diflubenzuron residues in milk and cattle tissues. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.65, n.1, p.301-307, 2013.
- Sung Woo Lee, Jeong-Heui Choi, Soon-Kil Cho, Hyun-A Yu, A.M. Abd El-Aty, Jae-Han Shim. 2011. Development of a new QuEChERS method based on dry ice for the determination of 168 pesticides in paprika using tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. Volume 1218, Issue 28, 15 July 2011, Pages 4366–4377
- Tomšej T., J. Hajsšlová. 1995. Determination of benzoylurea insecticides in apples by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. Volume 704, Issue 2, 9 June 1995, Pages 513–517
- Tsochatzis ED, Menkissoglu-Spirodi U, Karpouzias DG, Tzimou-Tsitouridou R. 2010. A multi-residue method for pesticide residue analysis in rice grains using matrix solid-phase dispersion extraction and high-performance liquid chromatography-diode array detection. *Anal Bioanal Chem*. Jul;397(6):2181-90.
- Xi Yu, Ying Sun, Chunzhu Jiang, Xiumin Sun, Yan Gao, Yuanpeng Wang, Hanqi Zhang, Daqian Song. 2012. Magnetic solid-phase extraction of five pyrethroids from environmental water samples followed by ultrafast liquid chromatography analysis. *Talanta*, Volume 98, 30 August 2012, Pages 257–264
- Qing Xiang Zhou, Guo Hong Xie, Jun Ping Xiao, Wei Dong Wang, Yu Jie Ding. 2008. Sensitive determination of fenprothrin, cyhalothrin and deltamethrin in environmental water samples using multiwalled carbon nanotubes cartridge *prior* to HPLC. *Chinese Chemical Letters*, Volume 19, Issue 1, January 2008, Pages 95–98.
- Yan Ding, Catherine A. White, S. Muralidhara, James V. Bruckner, Michael G. Bartlett. 2004. Determination of deltamethrin and its metabolite 3-phenoxybenzoic acid in male rat plasma by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, Volume 810, Issue 2, 25 October 2004, Pages 221–227



- Zhou Q, Wang G, Xie G. 2013. Dispersive liquid-phase microextraction in combination with HPLC for the enrichment and rapid determination of benzoylurea pesticides in environmental water samples. *J Sep Sci.* 2013 Jul; 36(14):2323-9.
- Zanella R., Munaretto J.S., Martins M.L. 2013. Determination of Pesticide Multiresidues in Apple, Pear and Grape using modified QuEChERS and analysis by LC-QTOF MS. Agilent Technologies Inc. 2013. 5991 1872EN
- Zuccari Bissacot D. and Vassilieff I. 1997. HPLC Determination of Flumethrin, Deltamethrin, Cypermethrin, and Cyhalothrin Residues in the Milk and Blood of Lactating Dairy Cows *Journal of Analytical Toxicology*, Vol. 21, September 1997

A N E X O 4

Procedimiento de detección y cuantificación de antiparasitarios en Mitílidos.

		REVISIÓN N° 0
Departamento de Salud Hidrobiológica División de Investigación en Acuicultura	Procedimiento “Detección y cuantificación de Azametifos en Mitílicos”	Página 1 de 6

“PROCEDIMIENTO “DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE AZAMETIFOS EN MITÍLIDOS”

1. Objetivo

El objetivo de este procedimiento es determinar residuos de Azametifos en mitílicos.

2. Alcance y campo de aplicación

Este método se aplica a muestras de mitílicos.

3. Responsabilidades

3.1 Es responsabilidad del Analista la correcta aplicación de este procedimiento.

4. Referencias

4.1 **Zanella R, Munaretto JS, Martins ML. 2013.** Determination of Pesticide Multiresidues in apple, Pear and Grape using modified Quechers and analysis by LC-QTOF MS. Agilent Technologies Inc. Application Note. 2013. February 7. 5991-1872EN

4.2 **ALLEN P. PFENNING, JOSÉ E. ROYBAL, SHERRI B. TURNIPSEED, STEVE A. GONZALES, and JEFFREY A. HURLBUT. 1999.** Determination of Residues of Azamethiphos in Salmon Tissue by Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. JOURNAL OF AOAC INTERNATIONAL VOL. 82, NO. 5, 1999

5. Principio o fundamento

El principio analítico consiste en la extracción de los productos farmacéuticos en mitílicos, utilizando la metodología Quechers utilizando Acetonitrilo, sulfato de magnesio y cloruro de sodio en la etapa de microextracción líquida. Como clean-up se utiliza el proceso de extracción en fase sólida dispersiva, utilizando sulfato de magnesio anhidro, PSA y C-18. El extracto obtenido es identificado y cuantificado utilizando un sistema de cromatografía líquida de alta presión (HPLC), con detector de Fluorescencia.

Preparado por: Luis Norambuena S.
Fecha: 03.02.2014
Firma

Aprobado por: Sergio Contreras L.
Fecha 04.02.2014
Firma:

		REVISIÓN N° 0
Departamento de Salud Hidrobiológica División de Investigación en Acuicultura	Procedimiento “Detección y cuantificación de Azametifos en Mitílicos”	Página 2 de 6

6. Definiciones

- 6.1 Estándares certificados: son elementos químicos de alta pureza en polvo con certificado de calidad para curva de calibración y preparación de fortificados.
- 6.2 Solución estándar concentrada (Std [] Aza): Solución de concentración conocida o establecida, preparada a partir del estándar certificado para preparar volumétricamente estándares de trabajo (solución intermedia), para uso diario
- 6.3 Solución intermedia (SI-Aza): solución conocida o establecida, preparada a partir de las soluciones estándar madre, que contiene: Azametifos (Aza).

7. Aparatos y materiales

- 7.1 Equipo de HPLC que consta de:
- 7.1.1 Bomba cuaternaria Shimadzu modelo LC-10AT o similar.
 - 7.1.2 Autosampler Shimadzu modelo SIL-10AF o similar.
 - 7.1.3 Detector de Fluorescencia Shimadzu modelo RF-10Axl o similar.
 - 7.1.4 Horno de columna Shimadzu modelo CTO-10AS o similar.
- 7.2 Vórtex
- 7.3 Baño de ultrasonido
- 7.4 Centrífuga
- 7.5 Balanza Analítica
- 7.6 Tubo tipo falcon de 50 ml, de polipropileno, fondo cónico.
- 7.7 Tubo 15 ml dSPE (900mg MgSO₄, 150mg PSA, 150mg C18) Restek cat 26226 o similar.
- 7.8 Matraz aforado 100 ml.
- 7.9 Matraz aforado 25 ml.
- 7.10 Matraz aforado 10 ml.
- 7.11 Micropipeta de 20-200 ul.
- 7.12 Micropipeta de 200-1000 ul.
- 7.13 Micropipeta de repetición Handystep o similar.
- 7.14 Viales HPLC 1,8 ml.
- 7.15 Puntas para micropipeta de 100 a 1000 ul.
- 7.16 Puntas para micropipeta de 20 a 200 ul.
- 7.17 PD tips de 10 y 25 ml para micropipeta de repetición.
- 7.18 Filtro 0.22µm - PDVF.

8. Reactivos y Soluciones

8.1 Reactivos

Preparado por: Luis Norambuena S. Fecha: 03.02.2014 Firma	Aprobado por: Sergio Contreras L. Fecha 04.02.2014 Firma:
---	---

		REVISIÓN N° 0
Departamento de Salud Hidrobiológica División de Investigación en Acuicultura	Procedimiento “Detección y cuantificación de Azametifos en Mitílicos”	Página 3 de 6

- 8.1.1 Acetonitrilo HPLC Merck o similar.
- 8.1.2 Agua HPLC Merck o similar.
- 8.1.3 Metanol HPLC Merck o similar.
- 8.1.4 Azametifos Dr. Ehrenstorfer código 10340000, o similar.
- 8.1.5 Q-sep 4g MgSO₄, 1g NaCl Restek cat. 23992 o similar.

8.2 Soluciones

- 8.2.1 Estándar concentrado de Azametifos: El analista debe pesar en forma exacta aproximadamente 25 mg de estándar certificado en matraz aforado de 25 ml y disolver en Acetonitrilo grado HPLC. El estándar se guarda a 4°C protegido de la luz. Para el cálculo de concentración se debe tener en cuenta la pureza del estándar certificado.
- 8.2.2 Solución intermedia de Azametifos: El analista debe tomar una alícuota de estándar concentrado de Azametifos en un matraz aforado de 10 ml y aforarlo con Acetonitrilo grado HPLC. La alícuota se debe calcular de acuerdo de la concentración del estándar concentrado, de manera que quede el analito a una concentración aproximada de 5 ug/ml.

9. Procedimiento o descripción de la actividad

9.1 Extracción de residuos

- 9.1.1 Pesar 10,000 gramos \pm 0,3 gramos de mitílicos previamente homogeneizados en un tubo tipo falcon de 50 ml.
- 9.1.2 Agregar 10 ml de Anetonitrilo (ACN).
- 9.1.3 Tapar y homogeneizar en vortex vigorosamente durante 60 segundos, para lograr disgregación total de la muestra.
- 9.1.4 Agregue al tubo un sachet de Q100 de Restek (4 g MgSO₄, 1 g NaCl), asegúrese que se transfieran todas las sales.
- 9.1.5 Tapar y homogeneizar en vórtex vigorosamente durante 60 segundos.
- 9.1.6 Centrifugue por 5 minutos a 4000 rpm, 4°C.
- 9.1.7 Clean up
 - 9.1.7.1 Clean up dSPE
 - 9.1.7.1.1 Transfiera 6 ml del sobrenadante a un tubo de 15 ml cat Restek 26226 (con 900 mg de MgSO₄, 150 mg PSA, 150 mg C-18).

Preparado por: Luis Norambuena S.
Fecha: 03.02.2014
Firma

Aprobado por: Sergio Contreras L.
Fecha 04.02.2014
Firma:

		REVISIÓN N° 0
Departamento de Salud Hidrobiológica División de Investigación en Acuicultura	Procedimiento “Detección y cuantificación de Azametifos en Mitílicos”	Página 4 de 6

9.1.7.1.2 Tapar y homogeneizar en vórtex vigorosamente por 30 segundos.

9.1.7.1.3 Centrifugue por 1-2 minutos a 3000 rpm. 4°C.

9.1.7.1.4 Transfiera la muestra a un vial para analizar por HPLC (Se debe inyectar diluyendo 1:4 con agua HPLC)

9.2 Preparación de Fortificados

9.2.1 Preparación de muestras blanco y fortificados.

9.2.1.1 Buscar una contramuestra negativa (Plana cromatográficamente) para Azametifos.

9.2.1.2 Pesar 10,000 gramos \pm 0,3 gramos en un tubo tipo falcon de 50 ml.

9.2.1.3 Adicionar una cantidad conocida de antiparasitario cercano al límite de cuantificación. Deje descansar por al menos 1 hora, antes de realizar la extracción

9.3 Preparación Curva Estándar

Para la elaboración de la curva de calibración de estándares, se preparan diluciones de al menos 5 concentraciones dentro del rango de trabajo, a partir de la solución intermedia disolviendo en ACN/Agua HPLC (1/3).

9.4 Preparación de Condiciones cromatográficas para el ensayo

9.4.1 Las condiciones para realizar este ensayo son las siguientes:

9.4.1.1 Columna: Accucore C18 de 150 mm. x 4,6 mm. 4 μ m.

9.4.1.2 Longitud de onda: excitación: 230 nm
Emisión: 345 nm

9.4.1.3 Flujo: 1,0 ml/min.

9.4.1.4 Volumen de inyección: 50 μ l.

9.4.1.5 Temperatura del Horno (Columna): 40 °C.

9.4.1.6 Tiempo de corrida: a 10 min.

9.4.2 Composición de la fase móvil (isocrática)

71% Agua

29% Acetonitrilo

Preparado por: Luis Norambuena S.
Fecha: 03.02.2014
Firma

Aprobado por: Sergio Contreras L.
Fecha 04.02.2014
Firma:

		REVISIÓN N° 0
		Página 5 de 6
Departamento de Salud Hidrobiológica División de Investigación en Acuicultura	Procedimiento “Detección y cuantificación de Azametifos en Mitílicos”	

9.5 Cálculo de Curva de Calibración

Una vez que los estándares fueron inyectados, se procede a confeccionar una curva de calibración de concentración de los analitos vs área obtenida, se calcula el r^2 (debe ser sobre un 0,99), la pendiente y el intercepto deben estar dentro de los rangos establecidos.

9.6 Cálculo de recuperación de muestras fortificadas para Azametifos.

Se analizan las muestras blanco fortificadas según 9.1.2 a 9.1.7, obteniéndose un extracto en vial el cual es inyectado en el cromatógrafo y calculado comparativamente la cantidad agregada vs. Cantidad obtenida, según curva de calibración diaria.

9.7 Calculo de Resultados

Una vez que las muestras fueron inyectadas y todos los procesos de control de calidad fueron aceptados, se interpretan los cromatogramas intrapolando las áreas de los Peak de Azametifos en una tabla Excel previamente generada, la cual incluye pendiente e intercepto de la curva , como así también el peso de la muestra en específico. La cuantificación del analito se realiza de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{ppb Azametifos} = \frac{(A - C) \times D \times 10}{m \times p \times r}$$

Donde:

A = área del peak de Azametifos en la muestra.

C = intercepto de la curva de estándar para Azametifos.

m = pendiente de la curva de estándar para Azametifos.

p = peso (g) de la muestra.

r = recuperación promedio obtenida de validación.

D = dilución final del extracto (4).

10= ACN utilizado en la extracción

9.8 Estándares de Calidad

9.8.1 Se ha establecido que antes de dar inicio al proceso cromatográfico se debe cumplir lo siguiente:

9.8.1.1 El monitoreo de la línea base debe presentar estabilidad.

Preparado por: Luis Norambuena S.
Fecha: 03.02.2014
Firma

Aprobado por: Sergio Contreras L.
Fecha 04.02.2014
Firma:

		REVISIÓN N° 0
		Página 6 de 6
Departamento de Salud Hidrobiológica División de Investigación en Acuicultura	Procedimiento “Detección y cuantificación de Azametifos en Mitílidos”	

9.8.1.2 Los valores de la pendiente e intercepto de la curva deberán estar dentro de los rangos establecidos. De no ser así, se deberá realizar una nueva curva de calibración. Si los valores están dentro de los rangos, se podrá utilizar, de otra forma se confeccionará otra curva (incluyendo los datos de las 2 curvas del día) y se asignarán nuevos rangos de aceptación.

9.8.1.3 El coeficiente de variación de los resultados de las tres inyecciones de los estándares no deberá exceder el 5 %.

9.8.2 Para aceptar un resultado se ha establecido que se deben cumplir todos los criterios mencionados a continuación:

9.8.2.1 El porcentaje de recuperación del analito en los fortificados del límite de cuantificación deberá estar en el rango de +/- 2DS del valor promedio actualmente en uso (para el cálculo de recuperación se utilizará la curva de calibración del día).

9.8.2.2 Los cromatogramas obtenidos a partir de: fase móvil y blanco de muestra, deben ser negativos.

9.8.2.3 En el caso de obtenerse algún Out Layer en el grupo de fortificados, los resultados serán aceptados, si y solo si, los cromatogramas no presenten señal. De otra forma será repetido el batch.

9.8.3 Control general de batch de muestras

9.8.3.1 Curva de calibración estándar de Azametifos. Un estándar debe ser inyectado por triplicado.

9.8.3.2 Un blanco (muestra negativa a Azametifos).

9.8.3.3 Dos fortificados a concentración aproximada del límite de cuantificación del analito.

9.8.3.4 Un vial con fase móvil.

9.8.3.5 20 muestras.

9.8.3.6 Estándar de Azametifos de la curva de calibración.

9.8.3.7 Dos fortificados al límite de cuantificación.

9.8.3.8 Fase móvil.

9.8.3.9 20 muestras.

10. Expresión de resultados

La expresión de resultados es ppb (ng/g) de Azametifos

Preparado por: Luis Norambuena S. Fecha: 03.02.2014 Firma	Aprobado por: Sergio Contreras L. Fecha 04.02.2014 Firma:
---	---

		REVISIÓN N° 0
		Página 1 de 8
Departamento de Salud Hidrobiológica División de Investigación en Acuicultura	Procedimiento “Detección y cuantificación de Cipermetrina y Deltametrina en Mitílicos”	

PROCEDIMIENTO “DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE CIPERMETRINA Y DELTAMETRINA EN MITÍLIDOS”

1. Objetivo

El objetivo de este procedimiento es determinar residuos de Cipermetrina y Deltametrina en mitílicos.

2. Alcance y campo de aplicación

Este método se aplica a muestras de mitílicos.

3. Responsabilidades

3.1 Es responsabilidad del Analista la correcta aplicación de este procedimiento.

4. Referencias

- 4.1 **Silvia H. G. Brondi, Adriana N. Macedo and Ana R. A. Nogueira. 2009.** Evaluation of QuEChERS Method for Analysis of Cypermethrin Residue in Cow's Milk. 2nd Latin American Pesticide Residue Workshop-L APRW 2009. SP-PP-2009.00278.
- 4.2 **Veronica Roscoe, Judy Judge, Dorothea F. K. Rawn. 2008.** Application of the QuEChERS extraction method for the analysis of pyrethrin and pyrethroid pesticides in fin and non-fin fish. Presentation: Western Canada Trace Organic Workshop, 2008.
- 4.3 **Boonchiangma S, Ngeontae W, Srijaranai S. 2012.** Determination of six pyrethroid insecticides in fruit juice samples using dispersive liquid-liquid microextraction combined with high performance liquid chromatography. *Talanta*. 2012 Jan 15;88:209-15. doi: 10.1016/j.talanta.2011.10.033. Epub 2011 Oct 31.

5. Principio o fundamento

El principio analítico consiste en la extracción de los productos farmacéuticos en mitílicos, utilizando la metodología Quechers utilizando Acetonitrilo, sulfato de magnesio y cloruro de sodio en la etapa de microextracción líquida. Como clean-up se utiliza el proceso de extracción en fase sólida dispersiva, utilizando sulfato de magnesio anhidro, PSA y C-18. Adicionalmente se realizó un segundo clean-up, realizando extracción en fase sólida utilizando cartuchos oasis de HLB. El extracto

Preparado por: Luis Norambuena S.
Fecha: 14.04.2014
Firma

Aprobado por: Sergio Contreras L.
Fecha 15.04.2014
Firma:

		REVISIÓN N° 0
Departamento de Salud Hidrobiológica División de Investigación en Acuicultura	Procedimiento “Detección y cuantificación de Cipermetrina y Deltametrina en Mitílidos”	Página 2 de 8

obtenido es identificado y cuantificado utilizando un sistema de cromatografía líquida de alta presión (HPLC), con detector DAD.

6. Definiciones

- 6.1 Estándares certificados: son elementos químicos de alta pureza en polvo con certificado de calidad para curva de calibración y preparación de fortificados.
- 6.2 Solución estándar concentrada (Std [] Ciper. Std [] Delta): Solución de concentración conocida o establecida, preparada a partir de los estándares certificados para preparar volumétricamente estándares de trabajo (solución intermedia), para uso diario
- 6.3 Solución intermedia (SI-Ciper - Delta): solución conocida o establecida, preparada a partir de las soluciones estándar concentrada, que contiene: Cipermetrina (Ciper) y Deltametrina (Delta).

7. Aparatos y materiales

- 7.1 Equipo de HPLC que consta de:
 - 7.1.1 Bomba cuaternaria Shimadzu modelo LC-10AT o similar.
 - 7.1.2 Autosampler Shimadzu modelo SIL-10AF o similar.
 - 7.1.3 Detector UV visible con arreglo de diodos Shimadzu modelo SPD 20A o similar.
 - 7.1.4 Horno de columna Shimadzu modelo CTO-10AS o similar.
- 7.2 Vórtex
- 7.3 Baño de ultrasonido
- 7.4 Centrífuga
- 7.5 Balanza Analítica
- 7.6 Tubo tipo falcon de 50 ml, de polipropileno, fondo cónico.
- 7.7 Tubo 15 ml dSPE (900mg MgSO₄, 150mg PSA, 150mg C18) Restek cat 26226 o similar.
- 7.8 Columna de SPE Oasis HLB 1cc/30 mg cod WAT094225 o similar.
- 7.9 Matraz aforado 100 ml.
- 7.10 Matraz aforado 25 ml.
- 7.11 Matraz aforado 10 ml.
- 7.12 Micropipeta de 20-200 ul.
- 7.13 Micropipeta de 200-1000 ul.
- 7.14 Micropipeta de repetición Handystep o similar.
- 7.15 Viales HPLC 1,8 ml.
- 7.16 Puntas para micropipeta de 100 a 1000 ul.
- 7.17 Puntas para micropipeta de 20 a 200 ul.
- 7.18 PD tips de 10 y 25 ml para micropipeta de repetición.

Preparado por: Luis Norambuena S.
Fecha: 14.04.2014
Firma

Aprobado por: Sergio Contreras L.
Fecha 15.04.2014
Firma:

		REVISIÓN N° 0
		Página 3 de 8
Departamento de Salud Hidrobiológica División de Investigación en Acuicultura	Procedimiento “Detección y cuantificación de Cipermetrina y Deltametrina en Mitílicos”	

7.19 Filtro 0.22µm - PDVF.

8. Reactivos y Soluciones

8.1 Reactivos

- 8.1.1 Acetonitrilo HPLC Merck o similar.
- 8.1.2 Agua HPLC Merck o similar.
- 8.1.3 Metanol HPLC Merck o similar.
- 8.1.4 Cipermetrina técnica Dr. Ehrenstorfer código C11890000, o similar.
- 8.1.5 Deltametrina, Dr Ehrenstorfer código C12120000 similar.
- 8.1.6 Q-sep 4g MgSO₄, 1g NaCl Restek cat. 23992 o similar.

8.2 Soluciones

- 8.2.1 Estándar concentrado de Cipermetrina: El analista debe disolver 100 mg de estándar en matraz aforado de 100 ml de Acetonitrilo grado HPLC. La solución se debe guardar protegida de la luz a 4°C. Se debe guardar una alícuota de 5 ml protegida de la luz a -20°C. Para el cálculo de concentración se debe tener en cuenta la pureza del estándar certificado.
- 8.2.2 Estándar concentrado de Deltametrina: El analista debe pesar en forma exacta aproximadamente 25 mg de estándar certificado en matraz aforado de 25 ml y disolver en Acetonitrilo grado HPLC. El estándar se guarda a 4°C protegido de la luz. Para el cálculo de concentración se debe tener en cuenta la pureza del estándar certificado.
- 8.2.3 Solución intermedia de Cipermetrina-Deltametrina: El analista debe tomar una alícuota de estándar concentrado de Cipermetrina y Deltametrina en un matraz aforado de 25 ml y aforarlo con Acetonitrilo grado HPLC. La alícuota se debe calcular de acuerdo de la concentración de los estándares concentrados, de manera que queden ambos analitos a una concentración aproximada de 5 ug/ml.

9. Procedimiento o descripción de la actividad

9.1 Extracción de residuos

- 9.1.1 Pesar 10,000 gramos ± 0,3 gramos de mitílicos previamente homogeneizados en un tubo tipo falcon de 50 ml.
- 9.1.2 Agregar 10 ml de Anetonitrilo (ACN).

Preparado por: Luis Norambuena S.
Fecha: 14.04.2014
Firma

Aprobado por: Sergio Contreras L.
Fecha 15.04.2014
Firma:

		REVISIÓN N° 0
Departamento de Salud Hidrobiológica División de Investigación en Acuicultura	Procedimiento “Detección y cuantificación de Cipermetrina y Deltametrina en Mitílidos”	Página 4 de 8

9.1.3 Tapar y homogeneizar en vortex vigorosamente durante 60 segundos, para lograr disgregación total de la muestra.

9.1.4 Agregue al tubo un sachet de Q100 de Restek (4 g MgSO₄, 1 g NaCl), asegúrese que se transfieran todas las sales.

9.1.5 Tapar y homogeneizar en vórtex vigorosamente durante 60 segundos.

9.1.6 Centrifugue por 5 minutos a 4000 rpm.

9.1.7 Clean up

9.1.7.1 Clean up dSPE

9.1.7.1.1 Transfiera 6 ml del sobrenadante a un tubo de 15 ml cat Restek 26226 (con 900 mg de MgSO₄, 150 mg PSA, 150 mg C-18).

9.1.7.1.2 Tapar y homogeneizar en vórtex vigorosamente por 30 segundos.

9.1.7.1.3 Centrifugue por 1-2 minutos a 3000 rpm.

9.1.7.1.4 Transfiera 4 ml del sobrenadante a un tubo tipo falcon de 15 ml y agregue 4 ml de agua tipo HPLC

9.1.7.2 Clean up por columnas HLB

9.1.7.2.1 Acondicionado: aplique y succione 1 ml de metanol.

9.1.7.2.2 Equilibrado: aplique y succione 1 ml de agua.

9.1.7.2.3 Carga: aplique y succione la muestra previamente preparada (9.1.7.1.4), el flujo no debe ser mayor a 2 ml/min).

9.1.7.2.4 Lavado: Aplique y succione 1 ml de agua/Metanol (10/90). Elimine todos los eluidos.

9.1.7.2.5 Elución: Aplique y succione 1 ml de agua/ACN (10/90). Este se debe diluir 1,5 veces con Agua HPLC (0.8 ml mx + 0.4 ml de agua), se filtra e inyecta en el HPLC.

9.2 Preparación de Fortificados

9.2.1 Preparación de muestras blanco y fortificados.

9.2.1.1 Buscar una contramuestra negativa (Plana cromatográficamente) para Ciper-Delta.

Preparado por: Luis Norambuena S.
Fecha: 14.04.2014
Firma

Aprobado por: Sergio Contreras L.
Fecha 15.04.2014
Firma:

		REVISIÓN N° 0
Departamento de Salud Hidrobiológica División de Investigación en Acuicultura	Procedimiento “Detección y cuantificación de Cipermetrina y Deltametrina en Mitílidos”	Página 5 de 8

9.2.1.2 Pesar 10,000 gramos \pm 0,3 gramos en un tubo tipo falcon de 50 ml.

9.2.1.3 Adicionar una cantidad conocida de antiparasitario cercano al límite de cuantificación. Deje descansar por al menos 1 hora, antes de realizar la extracción

9.3 Preparación Curva Estándar

Para la elaboración de la curva de calibración de estándares, se preparan diluciones de al menos 5 concentraciones dentro del rango de trabajo, a partir de la solución intermedia disolviendo en ACN/Agua HPLC (1/1).

9.4 Preparación de Condiciones cromatográficas para el ensayo

9.4.1 Las condiciones para realizar este ensayo son las siguientes:

9.4.1.1 Columna: Accucore C18 de 150 mm. x 4,6 mm. 4 um.

9.4.1.2 Longitud de onda de monitoreo: 210 nm.

9.4.1.3 Flujo: 1,0 ml/min.

9.4.1.4 Volumen de inyección: 50 μ l.

9.4.1.5 Temperatura del Horno (Columna): 40 °C.

9.4.1.6 Tiempo de corrida: 32 min.

9.4.2 Composición de la fase móvil

34% Agua

54% Acetonitrilo

12% Metanol

9.4.2.1 Gradiente:

Tiempo (min)	% Agua	% Metanol	% Acetonitrilo
0.1	34 %.	12 %	54 %
23	34 %	12%	54%
23.1	8 %	12 %	80 %
28	8 %	12 %	80 %
28.1	34 %	12 %	54 %

9.5 Cálculo de Curva de Calibración

Una vez que los estándares fueron inyectados, se procede a confeccionar una curva de calibración de concentración de los analitos vs área obtenida,

Preparado por: Luis Norambuena S.
Fecha: 14.04.2014
Firma

Aprobado por: Sergio Contreras L.
Fecha 15.04.2014
Firma:

		REVISIÓN N° 0
		Página 6 de 8
Departamento de Salud Hidrobiológica División de Investigación en Acuicultura	Procedimiento “Detección y cuantificación de Cipermetrina y Deltametrina en Mitílidos”	

se calcula el r^2 (debe ser sobre un 0,99), la pendiente y el intercepto deben estar dentro de los rangos establecidos.

9.6 Cálculo de recuperación de muestras fortificadas para Cipermetrina y Deltametrina.

Se analizan las muestras blanco fortificadas según 9.1.2 a 9.1.7, obteniéndose un extracto en vial el cual es inyectado en el cromatógrafo y calculado comparativamente la cantidad agregada vs. Cantidad obtenida, según curva de calibración diaria.

9.7 Calculo de Resultados

Una vez que las muestras fueron inyectadas y todos los procesos de control de calidad fueron aceptados, se interpretan los cromatogramas interpolando las áreas de los Peak de ácido Cipermetrina y Deltametrina en una tabla Excel previamente generada, la cual incluye pendiente e intercepto de la curva, como así también el peso de la muestra en específico.

La cuantificación de los analitos se realiza de acuerdo a las siguientes fórmulas:

$$\text{ppb Cipermetrina} = \frac{(A - C) \times D \times 10}{m \times p \times r \times F}$$

Donde:

A = área del peak de cipermetrina en la muestra.

C = intercepto de la curva de estándar para cipermetrina.

m = pendiente de la curva de estándar para cipermetrina.

p = peso (g) de la muestra.

r = recuperación promedio obtenida de validación.

D = volumen de resuspensión de muestra en ml.

10 = ACN utilizado en la extracción.

F = factor de enriquecimiento (2.7)

$$\text{ppb Deltametrina} = \frac{(A - C) \times D \times 10}{m \times p \times r \times F}$$

Donde:

A = área del Peak de Deltametrina en la muestra

C = intercepto de la curva de estándar para Deltametrina.

Preparado por: Luis Norambuena S.
Fecha: 14.04.2014
Firma

Aprobado por: Sergio Contreras L.
Fecha 15.04.2014
Firma:

		REVISIÓN N° 0
		Página 7 de 8
Departamento de Salud Hidrobiológica División de Investigación en Acuicultura	Procedimiento “Detección y cuantificación de Cipermetrina y Deltametrina en Mitílidos”	

m = pendiente de la curva de estándar para Deltametrina.

p = peso (g) de la muestra

r = recuperación promedio obtenida de validación

D = volumen de resuspensión de muestra en ml.

9.8 Estándares de Calidad

9.8.1 Se ha establecido que antes de dar inicio al proceso cromatográfico se debe cumplir lo siguiente:

9.8.1.1 El monitoreo de la línea base debe presentar estabilidad.

9.8.1.2 Los valores de la pendiente e intercepto de la curva deberán estar dentro de los rangos establecidos. De no ser así, se deberá realizar una nueva curva de calibración. Si los valores están dentro de los rangos, se podrá utilizar, de otra forma se confeccionará otra curva (incluyendo los datos de las 2 curvas del día) y se asignarán nuevos rangos de aceptación.

9.8.1.3 El coeficiente de variación de los resultados de las tres inyecciones de los estándares no deberá exceder el 5 %.

9.8.2 Para aceptar un resultado se ha establecido que se deben cumplir todos los criterios mencionados a continuación:

9.8.2.1 El porcentaje de recuperación del analito en los fortificados del límite de cuantificación deberá estar en el rango de +/- 2DS del valor promedio actualmente en uso (para el cálculo de recuperación se utilizará la curva de calibración del día).

9.8.2.2 Los cromatogramas obtenidos a partir de: fase móvil y blanco de muestra, deben ser negativos.

9.8.2.3 En el caso de obtenerse algún Out Layer en el grupo de fortificados, los resultados serán aceptados, si y solo si, los cromatogramas no presenten señal. De otra forma será repetido el batch.

9.8.3 Control general de batch de muestras

9.8.3.1 Curva de calibración estándar de Cipermetrina y Deltametrina. Un estándar debe ser inyectado por triplicado.

9.8.3.2 Un blanco (muestra negativa a Cipermetrina y Deltametrina).

Preparado por: Luis Norambuena S.
Fecha: 14.04.2014
Firma

Aprobado por: Sergio Contreras L.
Fecha 15.04.2014
Firma:

		REVISIÓN N° 0
Departamento de Salud Hidrobiológica División de Investigación en Acuicultura	Procedimiento “Detección y cuantificación de Cipermetrina y Deltametrina en Mitílidos”	Página 8 de 8

9.8.3.3 Dos fortificados a concentración aproximada del límite de cuantificación del analito.

9.8.3.4 Un vial con fase móvil.

9.8.3.5 20 muestras.

9.8.3.6 Estándar de Cipermetrina y Deltametrina de la curva de calibración.

9.8.3.7 Dos fortificados al límite de cuantificación.

9.8.3.8 Fase móvil.

9.8.3.9 20 muestras.

10. Expresión de resultados

La expresión de resultados es ppb (ng/g) de Cipermetrina y ppb (ng/g) de Deltametrina.

Preparado por: Luis Norambuena S. Fecha: 14.04.2014 Firma	Aprobado por: Sergio Contreras L. Fecha 15.04.2014 Firma:
---	---

		REVISIÓN N° 0
Departamento de Salud Hidrobiológica División de Investigación en Acuicultura	Procedimiento “Detección y cuantificación de Diflubenzuron en Mitílicos”	Página 1 de 6

PROCEDIMIENTO “DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE DIFLUBENZURON EN MITÍLIDOS”

1. Objetivo

El objetivo de este procedimiento es determinar residuos de Diflubenzuron en mitílicos.

2. Alcance y campo de aplicación

Este método se aplica a muestras de mitílicos.

3. Responsabilidades

3.1 Es responsabilidad del Analista la correcta aplicación de este procedimiento.

4. Referencias

4.1 **S.A.V. Tfouni, R.P.Z. Furlani, L.B. Carreiro, I.S.D. Loredo, A.G. Gomes, L.A. Alves, R.S.S. Mata, A.M.D. Fonseca, R.M.S. Rocha. 2013.** Determination of diflubenzuron residues in milk and cattle tissues. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.65, n.1, p.301-307.

4.2 **Ricardo Luvizotto-Santos, Paulo Jorge Marquez Cordeiro, Eny Maria Vieira. 2009.** Análisis of Diflubenzuron in Tilapia Filet by HPLC-DAD. Journal of Chromatographic Science, Vol 47, 785-788.

5. Principio o fundamento

El principio analítico consiste en la extracción de los productos farmacéuticos en mitílicos, utilizando la metodología Quechers utilizando Acetonitrilo, sulfato de magnesio y cloruro de sodio en la etapa de microextracción líquida. Como clean-up se utiliza el proceso de extracción en fase sólida dispersiva, utilizando sulfato de magnesio anhidro, PSA y C-18. El extracto obtenido es identificado y cuantificado utilizando un sistema de cromatografía líquida de alta presión (HPLC), con detector DAD.

Preparado por: Luis Norambuena S.
Fecha: 03.02.2014
Firma

Aprobado por: Sergio Contreras L.
Fecha 04.02.2014
Firma:

		REVISIÓN N° 0
Departamento de Salud Hidrobiológica División de Investigación en Acuicultura	Procedimiento “Detección y cuantificación de Diflubenzuron en Mitílicos”	Página 2 de 6

6. Definiciones

- 6.1 Estándares certificados: son elementos químicos de alta pureza en polvo con certificado de calidad para curva de calibración y preparación de fortificados.
- 6.2 Solución estándar concentrada (Std [] Dif): Solución de concentración conocida o establecida, preparada a partir del estándar certificado para preparar volumétricamente estándares de trabajo (solución intermedia), para uso diario
- 6.3 Solución intermedia (SI-Dif): solución conocida o establecida, preparada a partir de las soluciones estándar concentrada, que contiene: Diflubenzuron (Dif).

7. Aparatos y materiales

- 7.1 Equipo de HPLC que consta de:
- 7.1.1 Bomba cuaternaria Shimadzu modelo LC-10AT o similar.
 - 7.1.2 Autosampler Shimadzu modelo SIL-10AF o similar.
 - 7.1.3 Detector Uv-visible con arreglo de diodos Shimadzu modelo SPD 20A o similar.
 - 7.1.4 Horno de columna Shimadzu modelo CTO-10AS o similar.
- 7.2 Vórtex
- 7.3 Baño de ultrasonido
- 7.4 Centrifuga
- 7.5 Balanza Analítica
- 7.6 Tubo tipo falcon de 50 ml, de polipropileno, fondo cónico.
- 7.7 Tubo 15 ml dSPE (900mg MgSO₄, 150mg PSA, 150mg C18) Restek cat 26226 o similar.
- 7.8 Matraz aforado 100 ml.
- 7.9 Matraz aforado 25 ml.
- 7.10 Matraz aforado 10 ml.
- 7.11 Micropipeta de 20-200 ul.
- 7.12 Micropipeta de 200-1000 ul.
- 7.13 Micropipeta de repetición Handystep o similar.
- 7.14 Viales HPLC 1,8 ml.
- 7.15 Puntas para micropipeta de 100 a 1000 ul.
- 7.16 Puntas para micropipeta de 20 a 200 ul.
- 7.17 PD tips de 10 y 25 ml para micropipeta de repetición.
- 7.18 Filtro 0.22µm - PDVF.

8. Reactivos y Soluciones

8.1 Reactivos

Preparado por: Luis Norambuena S. Fecha: 03.02.2014 Firma	Aprobado por: Sergio Contreras L. Fecha 04.02.2014 Firma:
---	---

		REVISIÓN N° 0
Departamento de Salud Hidrobiológica División de Investigación en Acuicultura	Procedimiento “Detección y cuantificación de Diflubenzuron en Mitílicos”	Página 3 de 6

- 8.1.1 Acetonitrilo HPLC Merck o similar.
- 8.1.2 Agua HPLC Merck o similar.
- 8.1.3 Metanol HPLC Merck o similar.
- 8.1.4 Diflubenzuron Pestanal Fluka código 45446-250MG , o similar.
- 8.1.5 Q-sep 4g MgSO₄, 1g NaCl Restek cat. 23992 o similar.

8.2 Soluciones

- 8.2.1 Estándar concentrado de Diflubenzuron: El analista debe pesar en forma exacta aproximadamente 50 mg de estándar certificado en matraz aforado de 50 ml y disolver en Metanol grado HPLC. El estándar se guarda a 4°C protegido de la luz. Para el cálculo de concentración se debe tener en cuenta la pureza del estándar certificado.
- 8.2.2 Solución intermedia de Diflubenzurón: El analista debe tomar una alícuota de estándar concentrado de Diflubenzurón en un matraz aforado de 10 ml y aforarlo con Metanol grado HPLC. La alícuota se debe calcular de acuerdo de la concentración del estándar concentrados, de manera que quede el analito a una concentración aproximada de 5 ug/ml.

9. Procedimiento o descripción de la actividad

9.1 Extracción de residuos

- 9.1.1 Pesar 10,000 gramos \pm 0,3 gramos de mitílicos previamente homogeneizados en un tubo tipo falcon de 50 ml.
- 9.1.2 Agregar 10 ml de Acetonitrilo (ACN).
- 9.1.3 Tapar y homogeneizar en vortex vigorosamente durante 60 segundos, para lograr disgregación total de la muestra.
- 9.1.4 Agregue al tubo un sachet de Q100 de Restek (4 g MgSO₄, 1 g NaCl), asegúrese que se transfieran todas las sales.
- 9.1.5 Tapar y homogeneizar en vórtex vigorosamente durante 60 segundos.
- 9.1.6 Centrifugue por 5 minutos a 4000 rpm a 4°C.
- 9.1.7 Clean up
 - 9.1.7.1 Clean up dSPE
 - 9.1.7.1.1 Transfiera 6 ml del sobrenadante a un tubo de 15 ml cat Restek 26226 (con 900 mg de MgSO₄, 150 mg PSA, 150 mg C-18).

Preparado por: Luis Norambuena S. Fecha: 03.02.2014 Firma	Aprobado por: Sergio Contreras L. Fecha 04.02.2014 Firma:
---	---

		REVISIÓN N° 0
Departamento de Salud Hidrobiológica División de Investigación en Acuicultura	Procedimiento “Detección y cuantificación de Diflubenzuron en Mitílidos”	Página 4 de 6

9.1.7.1.2 Tapar y homogeneizar en vórtex vigorosamente por 30 segundos.

9.1.7.1.3 Centrifugue por 5 minutos a 3000 rpm, 4°C.

9.1.7.1.4 Transfiera la muestra a un vial para analizar por HPLC (Se debe inyectar diluyendo 1:2 con agua HPLC)

9.2 Preparación de Fortificados

9.2.1 Preparación de muestras blanco y fortificados.

9.2.1.1 Buscar una contramuestra negativa (Plana cromatográficamente) para Diflubenzurón.

9.2.1.2 Pesar 10,000 gramos \pm 0,3 gramos en un tubo tipo falcon de 50 ml.

9.2.1.3 Adicionar una cantidad conocida de antiparasitario cercano al límite de cuantificación. Deje descansar por al menos 1 hora, antes de realizar la extracción

9.3 Preparación Curva Estándar

Para la elaboración de la curva de calibración de estándares, se preparan diluciones de al menos 5 concentraciones dentro del rango de trabajo, a partir de la solución intermedia disolviendo en ACN/Agua HPLC (1/1).

9.4 Preparación de Condiciones cromatográficas para el ensayo

9.4.1 Las condiciones para realizar este ensayo son las siguientes:

9.4.1.1 Columna: Accucore C18 de 150 mm. x 4,6 mm. 4 μ m.

9.4.1.2 Longitud de onda de monitoreo: 258 nm.

9.4.1.3 Flujo: 1,0 ml/min.

9.4.1.4 Volumen de inyección: 50 μ l.

9.4.1.5 Temperatura del Horno (Columna): 40 °C.

9.4.1.6 Tiempo de corrida: 10 minutos.

9.4.2 Composición de la fase móvil (isocrática)

Agua/Metanol/Acetonitrilo (45%/5%/50%)

9.5 Cálculo de Curva de Calibración

Preparado por: Luis Norambuena S.
Fecha: 03.02.2014
Firma

Aprobado por: Sergio Contreras L.
Fecha 04.02.2014
Firma:

		REVISIÓN N° 0
Departamento de Salud Hidrobiológica División de Investigación en Acuicultura	Procedimiento “Detección y cuantificación de Diflubenzuron en Mitílicos”	Página 5 de 6

Una vez que los estándares fueron inyectados, se procede a confeccionar una curva de calibración de concentración de los analitos vs área obtenida, se calcula el r^2 (debe ser sobre un 0,99), la pendiente y el intercepto deben estar dentro de los rangos establecidos.

9.6 Cálculo de recuperación de muestras fortificadas para Diflubenzuron.

Se analizan las muestras blanco fortificadas según 9.1.2 a 9.1.7, obteniéndose un extracto en vial el cual es inyectado en el cromatógrafo y calculado comparativamente la cantidad agregada vs. Cantidad obtenida, según curva de calibración diaria.

9.7 Calculo de Resultados

Una vez que las muestras fueron inyectadas y todos los procesos de control de calidad fueron aceptados, se interpretan los cromatogramas intrapolando las áreas de los Peak de Diflubenzuron en una tabla Excel previamente generada, la cual incluye pendiente e intercepto de la curva , como así también el peso de la muestra en específico. La cuantificación del analito se realiza de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{ppb Diflubenzuron} = \frac{(A - C) \times D \times 10}{m \times p \times r}$$

Donde:

A = área del peak de Diflubenzuron en la muestra.

C = intercepto de la curva de estándar para Diflubenzuron.

m = pendiente de la curva de estándar para Diflubenzuron.

p = peso (g) de la muestra.

r = recuperación promedio obtenida de validación.

D = dilución final del extracto (2).

10= ACN utilizado en la extracción

9.8 Estándares de Calidad

9.8.1 Se ha establecido que antes de dar inicio al proceso cromatográfico se debe cumplir lo siguiente:

9.8.1.1 El monitoreo de la línea base debe presentar estabilidad.

9.8.1.2 Los valores de la pendiente e intercepto de la curva deberán estar dentro de los rangos establecidos. De no ser así, se deberá

Preparado por: Luis Norambuena S.
Fecha: 03.02.2014
Firma

Aprobado por: Sergio Contreras L.
Fecha 04.02.2014
Firma:

		REVISIÓN N° 0
		Página 6 de 6
Departamento de Salud Hidrobiológica División de Investigación en Acuicultura	Procedimiento “Detección y cuantificación de Diflubenzuron en Mitílidos”	

realizar una nueva curva de calibración. Si los valores están dentro de los rangos, se podrá utilizar, de otra forma se confeccionará otra curva (incluyendo los datos de las 2 curvas del día) y se asignarán nuevos rangos de aceptación.

9.8.1.3 El coeficiente de variación de los resultados de las tres inyecciones de los estándares no deberá exceder el 5 %.

9.8.2 Para aceptar un resultado se ha establecido que se deben cumplir todos los criterios mencionados a continuación:

9.8.2.1 El porcentaje de recuperación del analito en los fortificados del límite de cuantificación deberá estar en el rango de +/- 2DS del valor promedio actualmente en uso (para el cálculo de recuperación se utilizará la curva de calibración del día).

9.8.2.2 Los cromatogramas obtenidos a partir de: fase móvil y blanco de muestra, deben ser negativos.

9.8.2.3 En el caso de obtenerse algún Out Layer en el grupo de fortificados, los resultados serán aceptados, si y solo si, los cromatogramas no presenten señal. De otra forma será repetido el batch.

9.8.3 Control general de batch de muestras

9.8.3.1 Curva de calibración estándar de Diflubenzuron. Un estándar debe ser inyectado por triplicado.

9.8.3.2 Un blanco (muestra negativa a Diflubenzuron).

9.8.3.3 Dos fortificados a concentración aproximada del límite de cuantificación del analito.

9.8.3.4 Un vial con fase móvil.

9.8.3.5 20 muestras.

9.8.3.6 Estándar de Diflubenzuron de la curva de calibración.

9.8.3.7 Dos fortificados al límite de cuantificación.

9.8.3.8 Fase móvil.

9.8.3.9 20 muestras.

10. Expresión de resultados

La expresión de resultados es ppb (ng/g) de Diflubenzuron.

Preparado por: Luis Norambuena S. Fecha: 03.02.2014 Firma	Aprobado por: Sergio Contreras L. Fecha 04.02.2014 Firma:
---	---

A N E X O 5

Resultados experimentales de validación de Azametifós.



Resultados Experimentales de validación de Azametifos en choritos

Contenido

1.- Especificidad	03
2.- Linealidad	03
3- Recuperación de Azametifos	05
4.- Exactitud	07
5.- Precisión	07
5.1.- Repetibilidad deAzametifos	07
5.2.- Precisión intermedia de Azametifos	09
6.- Límite de detección y cuantificación	11
6.1.- Límite de detección de Azametifos	11
6.1.1.- Verificación del límite de detección	11
6.2.- Límite de cuantificación de Azametifos	12
7.- Robustez	12





1.- Especificidad:

A partir de los datos de la curva de calibración, se determina el tiempo de retención del analito, la desviación estándar y el coeficiente de variación de éste. Los resultados se indican en la tabla N° 1.

Tabla N° 1: Tiempos de retención de Azametifos

Fecha	conc. ng/ml	T R
11/02/2014	20	5,83
12/02/2014	20	5,58
13/02/2014	20	5,74
11/02/2014	40	5,84
12/02/2014	40	5,59
13/02/2014	40	5,73
11/02/2014	100	5,84
12/02/2014	100	5,58
13/02/2014	100	5,74
11/02/2014	200	5,84
12/02/2014	200	5,58
13/02/2014	200	5,75
11/02/2014	400	5,85
12/02/2014	400	5,59
13/02/2014	400	5,76
	Promedio	5,7
	D.S.	0,1
	% C.V.	1,9

Los cromatogramas se pueden observar en el Anexo 5.1.

Al realizar la extracción de 10 muestras blanco el día 11 de abril de 2014, se demuestra que no hay interferentes de importancia en los tiempos de retención. Los cromatogramas de las muestras blanco se pueden observar en el Anexo 5.2.

2.- Linealidad:

Se evaluó la linealidad del método desarrollado, confeccionando una curva de calibración de 5 puntos durante 3 días diferentes. Las concentraciones aproximadas del analito fue de 20, 40, 100, 200 y 400 ng/ml. Los resultados de las áreas obtenidas, las curvas de calibración estándar (con la ecuación de la recta y coeficiente de correlación) y el gráfico de residuales se presentan para el analito en la tabla 2 y figuras 1, 2



Tabla N° 2: 3reas de curva de calibraci3n de Azametifos:

Fecha	conc. ng/ml	3rea obtenida	3rea promedio	3rea D.S.	3rea % C.V.
11/02/2014	20	110.026	119.951	8640	7
12/02/2014	20	125.795			
13/02/2014	20	124.032			
11/02/2014	40	233.086	226.172	12132	5
12/02/2014	40	212.164			
13/02/2014	40	233.267			
11/02/2014	100	544.743	540.346	18074	3
12/02/2014	100	555.816			
13/02/2014	100	520.480			
11/02/2014	200	1.091.492	1.105.048	42412	4
12/02/2014	200	1.152.581			
13/02/2014	200	1.071.072			
11/02/2014	400	2.254.861	2.215.598	100174	5
12/02/2014	400	2.290.193			
13/02/2014	400	2.101.740			

Figura N° 1

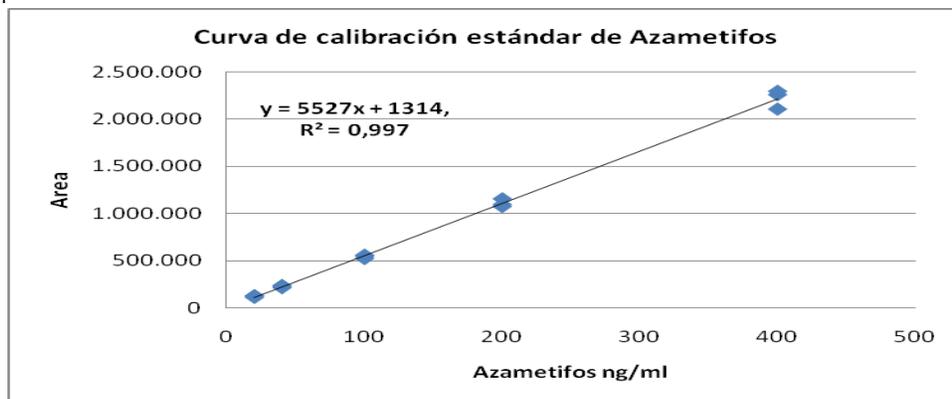
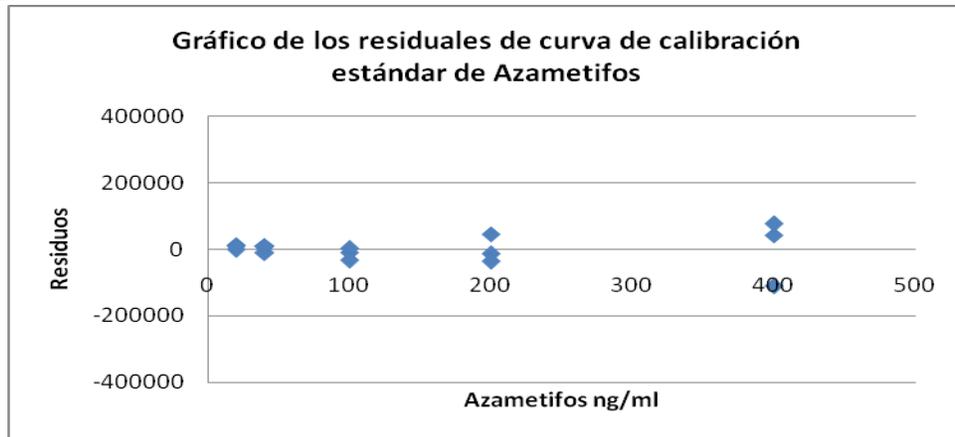




Figura N° 2:



Los cromatogramas se pueden observar en Anexo 5.1 cromatogramas de curva de calibración de Azametifos.

3.- Recuperación:

Los resultados de recuperación de Azametifos en los tres días se presentan en la tabla N° 3. Se presenta el valor promedio de recuperación (que se utilizará para el cálculo de las muestras problema), el coeficiente de variación y la desviación estándar para la confección de una carta control de recuperación tipo Shewhart (con el que se controlarán posteriormente los ensayos, para demostrar que la técnica está bajo control estadístico).



Tabla N°3: Recuperación de Azametifos:

Fecha	Nº for	conc intentada ng/g	conc obtenida ng/g	% rec
11/02/2014	1	100,0	78,7	78,7
	2	100,0	89,6	89,6
	3	100,0	89,5	89,5
	4	100,0	78,2	78,2
	5	100,0	91,9	91,9
	6	100,0	92,8	92,8
	7	200,0	166,8	83,4
	8	200,0	167,4	83,7
	9	200,0	151,7	75,9
	10	200,0	167,5	83,7
	11	200,0	145,6	72,8
	12	200,0	144,4	72,2
	13	400,0	289,3	72,3
	14	400,0	326,6	81,7
	15	400,0	334,5	83,6
	16	400,0	274,8	68,7
	17	400,0	310,6	77,6
	18	400,0	330,7	82,7
12/02/2014	1	100,0	91,0	91,0
	2	100,0	93,8	93,8
	3	100,0	79,6	79,6
	4	100,0	95,2	95,2
	5	100,0	80,6	80,6
	6	100,0	96,5	96,5
	7	200,0	164,2	82,1
	8	200,0	165,6	82,8
	9	200,0	165,4	82,7
	10	200,0	161,6	80,8
	11	200,0	161,9	81,0
	12	200,0	168,5	84,2
	13	400,0	326,1	81,5
	14	400,0	336,2	84,1
	15	400,0	338,1	84,5
	16	400,0	318,7	79,7
	17	400,0	335,7	83,9
	18	400,0	334,0	83,5
13/02/2014	1	100,0	96,3	96,3
	2	100,0	74,1	74,1
	3	100,0	84,1	84,1
	4	100,0	83,5	83,5
	5	100,0	85,1	85,1
	6	100,0	75,9	75,9
	7	200,0	150,4	75,2
	8	200,0	155,5	77,8
	9	200,0	143,0	71,5
	10	200,0	152,0	76,0
	11	200,0	150,9	75,5
	12	200,0	146,6	73,3
	13	400,0	312,1	78,0
	14	400,0	297,4	74,4
	15	400,0	322,7	80,7
	16	400,0	306,6	76,6
	17	400,0	289,6	72,4
	18	400,0	312,6	78,2
Prom				81,4
DS				6,7
CV				8,2
prom + 2DS				94,7
prom - 2DS				68,1
prom + 3DS				101,4
prom - 3DS				61,4



Los cromatogramas de recuperación, se pueden observar en los anexos 5.3, 5.4 y 5.5.

4.- Exactitud o veracidad:

No aplica

5.- Precisión:

5.1.- Repetibilidad:

Los resultados de recuperación de Azametifos en los tres días se presentan en las tablas N° 4, 5 y 6. Se presenta el valor promedio de recuperación, la desviación estándar y el coeficiente de variación, de cada nivel de fortificación y del día.

Tabla N° 4: recuperación de Azametifos 11-02-2014

N° for	conc intentada ng/g	área	pendiente	intercepto	conc obtenida ng/g	% rec	prom	ds	cv
1	100,0	110.121	5527	1315	78,7	78,7			
2	100,0	125.059			89,6	89,6			
3	100,0	124.942			89,5	89,5			
4	100,0	109.313			78,2	78,2			
5	100,0	128.309			91,9	91,9			
6	100,0	129.564			92,8	92,8	86,8	6,6	7,6
7	200,0	231.725			166,8	83,4			
8	200,0	232.661			167,4	83,7			
9	200,0	210.993			151,7	75,9			
10	200,0	232.739			167,5	83,7			
11	200,0	202.565			145,6	72,8			
12	200,0	200.892			144,4	72,2	78,6	5,6	7,1
13	400,0	401.034			289,3	72,3			
14	400,0	452.623			326,6	81,7			
15	400,0	463.482			334,5	83,6			
16	400,0	380.992			274,8	68,7			
17	400,0	430.481			310,6	77,6			
18	400,0	458.301			330,7	82,7	77,8	6,1	7,8
					prom	81,1			
					ds	7,1			
					cv	8,8			



Tabla N° 5: recuperación de Azametifos 12-02-2014

N° for	conc intentada ng/g	área	pendiente	intercepto	conc obtenida ng/g	% rec	prom	ds	cv
1	100,0	126.995	5527	1315	91,0	91,0			
2	100,0	130.872			93,8	93,8			
3	100,0	111.368			79,6	79,6			
4	100,0	132.915			95,2	95,2			
5	100,0	112.642			80,6	80,6			
6	100,0	134.613			96,5	96,5	89,4	7,5	8,3
7	200,0	228.133			164,2	82,1			
8	200,0	230.138			165,6	82,8			
9	200,0	229.905			165,4	82,7			
10	200,0	224.632			161,6	80,8			
11	200,0	225.074			161,9	81,0			
12	200,0	234.115			168,5	84,2	82,3	1,3	1,6
13	400,0	451.835			326,1	81,5			
14	400,0	465.885			336,2	84,1			
15	400,0	468.455			338,1	84,5			
16	400,0	441.704			318,7	79,7			
17	400,0	465.220			335,7	83,9			
18	400,0	462.843			334,0	83,5	82,9	1,9	2,3
					prom	84,9			
					ds	5,4			
					cv	6,4			



Tabla N° 6: recuperación de Azametifos 13-02-2014

Nº for	conc intentada ng/g	área	pendiente	intercepto	conc obtenida ng/g	% rec	prom	ds	cv
1	100,0	134.434	5527	1315	86,1	86,1			
2	100,0	103.676			74,1	74,1			
3	100,0	117.517			84,1	84,1			
4	100,0	116.751			83,5	83,5			
5	100,0	118.942			85,1	85,1			
6	100,0	106.222			75,9	75,9	83,2	7,9	9,5
7	200,0	209.173			150,4	75,2			
8	200,0	216.181			155,5	77,8			
9	200,0	198.839			143,0	71,5			
10	200,0	211.337			152,0	76,0			
11	200,0	209.847			150,9	75,5			
12	200,0	203.824			146,6	73,3	74,9	2,2	2,9
13	400,0	432.540			312,1	78,0			
14	400,0	412.299			297,4	74,4			
15	400,0	447.234			322,7	80,7			
16	400,0	424.933			306,6	76,6			
17	400,0	401.509			289,6	72,4			
18	400,0	433.287			312,6	78,2	76,7	3,0	3,9
					prom	78,3			
					ds	6,0			
					cv	7,7			

Los cromatogramas de recuperación se pueden observar en los anexos 5.3, 5.4 y 5.5.

5.2 Precisión intermedia:

Los resultados de la precisión intermedia de Azametifos, se presentan en la tabla 7.



Tabla Nº 7: Precisión intermedia de Azametifos 13-02-2014.

Fecha	Nº for	conc intentada ng/g	área	pendiente	intercepto	conc obtenida ng/g	% rec	prom	ds	cv
11-Feb	1	100,0	110.121	5527	1315	78,7	78,7			
11-Feb	2	100,0	125.059			89,6	89,6			
11-Feb	3	100,0	124.942			89,5	89,5			
11-Feb	4	100,0	109.313			78,2	78,2			
11-Feb	5	100,0	128.309			91,9	91,9			
11-Feb	6	100,0	129.564			92,8	92,8			
12-Feb	1	100,0	126.995			91,0	91,0			
12-Feb	2	100,0	130.872			93,8	93,8	86,5	7,4	8,5
12-Feb	3	100,0	111.368			79,6	79,6			
12-Feb	4	100,0	132.915			95,2	95,2			
12-Feb	5	100,0	112.642			80,6	80,6			
12-Feb	6	100,0	134.613			96,5	96,5			
13-Feb	1	100,0	1344.34			96,3	96,3			
13-Feb	2	100,0	103.676			74,1	74,1			
13-Feb	3	100,0	117.517			84,1	84,1			
13-Feb	4	100,0	116.751			83,5	83,5			
13-Feb	5	100,0	118.942			85,1	85,1			
13-Feb	6	100,0	106.222			75,9	75,9			
11-Feb	7	200,0	231.725			166,8	83,4			
11-Feb	8	200,0	232.661			167,4	83,7			
11-Feb	9	200,0	210.993			151,7	75,9			
11-Feb	10	200,0	232.739			167,5	83,7			
11-Feb	11	200,0	202.565			145,6	72,8			
11-Feb	12	200,0	200.892			144,4	72,2			
12-Feb	7	200,0	228.133			164,2	82,1			
12-Feb	8	200,0	230.138			165,6	82,8	78,6	4,6	5,8
12-Feb	9	200,0	229.905			165,4	82,7			
12-Feb	10	200,0	224.632			161,6	80,8			
12-Feb	11	200,0	225.074			161,9	81,0			
12-Feb	12	200,0	234.115			168,5	84,2			
13-Feb	7	200,0	209.173			150,4	75,2			
13-Feb	8	200,0	216.181			155,5	77,8			
13-Feb	9	200,0	198.839			143,0	71,5			
13-Feb	10	200,0	211.337			152,0	76,0			
13-Feb	11	200,0	209.847			150,9	75,5			
13-Feb	12	200,0	203.824			146,6	73,3			
11-Feb	13	400,0	401.034			289,3	72,3			
11-Feb	14	400,0	452.623			326,6	81,7			
11-Feb	15	400,0	463.482			334,5	83,6			
11-Feb	16	400,0	380.992			274,8	68,7			
11-Feb	17	400,0	430.481			310,6	77,6			
11-Feb	18	400,0	458.301			330,7	82,7			
12-Feb	13	400,0	451.835			326,1	81,5			
12-Feb	14	400,0	465.885			336,2	84,1	79,3	5,0	6,3
12-Feb	15	400,0	468.455			352,6	88,1			
12-Feb	16	400,0	441.704			318,7	79,7			
12-Feb	17	400,0	465.220			335,7	83,9			
12-Feb	18	400,0	462.843			334,0	83,5			
13-Feb	13	400,0	432.540			312,1	78,0			
13-Feb	14	400,0	412.299			297,4	74,4			
13-Feb	15	400,0	447.234			322,7	80,7			
13-Feb	16	400,0	424.933			306,6	76,6			
13-Feb	17	400,0	401.509			289,6	72,4			
13-Feb	18	400,0	433.287			312,6	78,2			



Los cromatogramas se pueden observar en los anexos 5.3, 5.4 y 5.5.

6.- Límite de detección y cuantificación:

6.1.- El límite de detección (LD) de Azametifos se presenta en la tabla N°8.

Tabla 8 LD y LC de Azametifos.

Fecha	conc intentada ng/g	area obtenida
11/02/2014	100,0	110121
11/02/2014	100,0	125059
11/02/2014	100,0	124942
11/02/2014	100,0	109313
11/02/2014	100,0	128309
11/02/2014	100,0	129564
12/02/2014	100,0	126995
12/02/2014	100,0	130872
12/02/2014	100,0	111368
12/02/2014	100,0	132951
12/02/2014	100,0	112642
12/02/2014	100,0	134613
13/02/2014	100,0	134434
13/02/2014	100,0	103676
13/02/2014	100,0	117517
13/02/2014	100,0	116751
13/02/2014	100,0	118942
13/02/2014	100,0	106272
	DS	10201,123
	pendiente	5527
	intercepto	1315
	recuperación	0,814
	LD	28,8
	LC	89,5

6.1.1.- Verificación del Límite de detección: Se verifica el Límite de detección de Azametifos, realizando análisis de 10 muestras blanco, fortificadas a 50 ppb del analito. Los resultados se presentan en la tabla N° 9.

Los cromatogramas se pueden ver en el anexo 5.6.



Tabla 9 Verificación LD de Azametifos

Nº for	conc intentada ng/g	área	pendiente	intercepto	Recuperación	conc obtenida ng/g
1	50,0	54.099	5527	1315	0,81	46,9
2	50,0	57.937				50,3
3	50,0	59.051				51,3
4	50,0	60.695				52,8
5	50,0	57.000				49,5
6	50,0	69.751				60,8
7	50,0	56.211				48,8
8	50,0	52.947				45,9
9	50,0	63.179				55,0
10	50,0	60.981				53,0
					prom	51,5
					ds	4,3
					cv	8,4

6.2.-El límite de cuantificación (LC) de Azametifos se presenta en la tabla Nº 8.

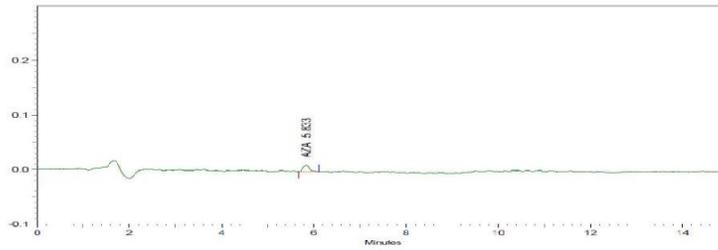
7.- Robustez:

El coeficiente de variación total de la recuperación (CV% total) de 8.2%, da una indicación de la robustez del método



Cromatogramas de Curva de calibración estándar de Azametifós

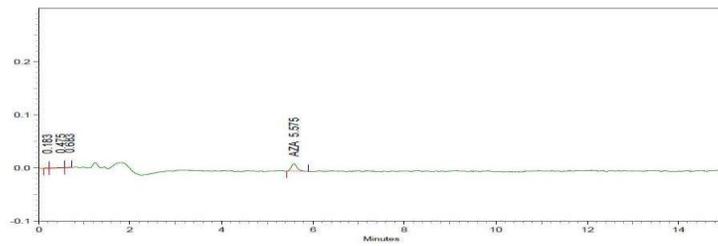
Estándar Azametifós (20 ppb) 11-2-2014



Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
AZA	5.833	110026	9854.30

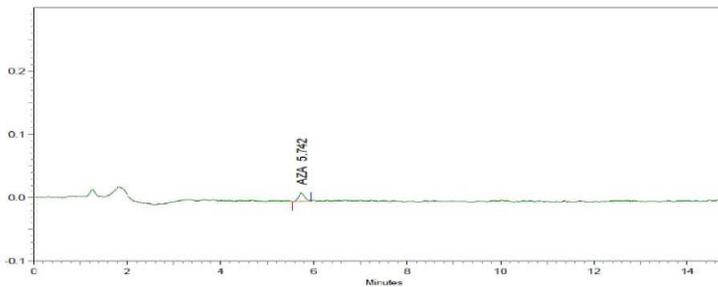
Estándar Azametifós (20 ppb) 12-2-2014



Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
AZA	5.575	125795	8572.47

Estándar Azametifós (20 ppb) 13-2-2014

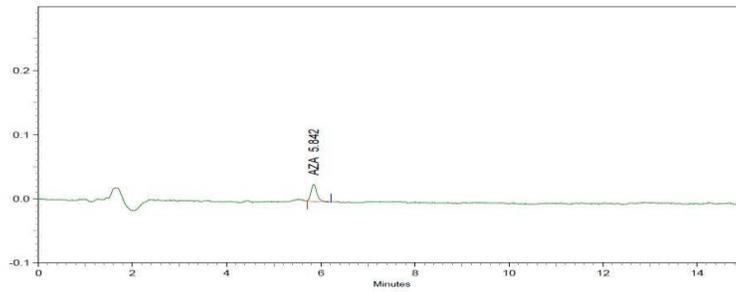


Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
AZA	5.742	124032	7603.59



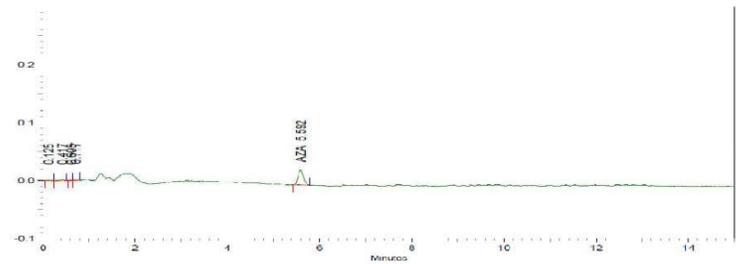
Est3ndar Azametif3s (40 ppb) 11-2-2014



Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
AZA	5.842	233086	10476.88

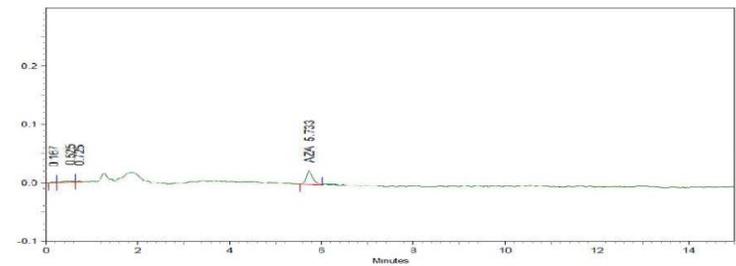
Est3ndar Azametif3s (40 ppb) 12-2-2014



Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
AZA	5.502	212164	9543.21

Est3ndar Azametif3s (40 ppb) 13-2-2014

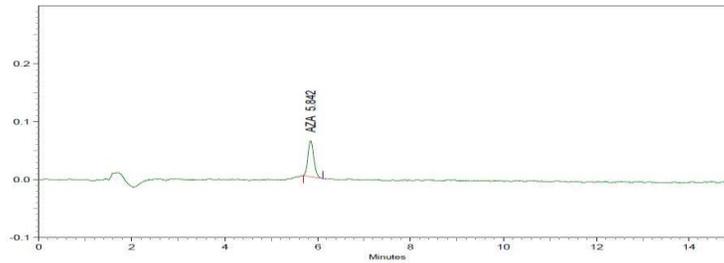


Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
AZA	5.753	233267	8125.75



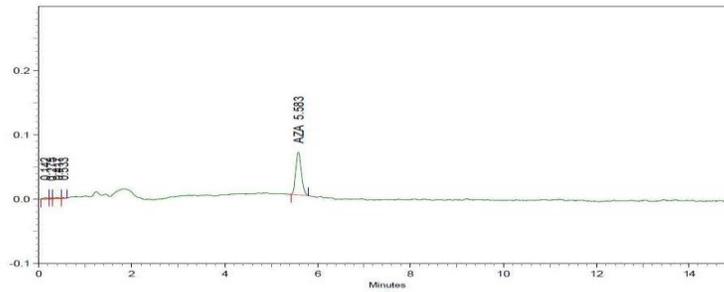
Est3ndar Azametif3s (100 ppb) 11-2-2014



Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
AZA	5.842	544743	9785.13

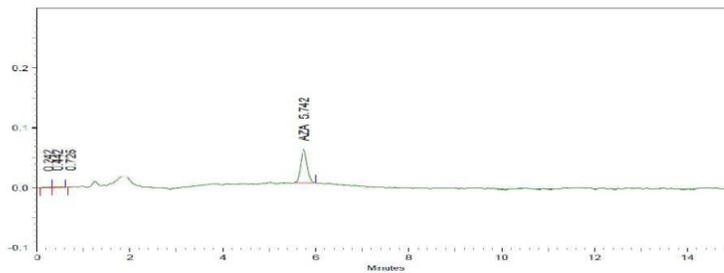
Est3ndar Azametif3s (100 ppb) 12-2-2014



Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
AZA	5.583	555816	9561.71

Est3ndar Azametif3s (100 ppb) 13-2-2014

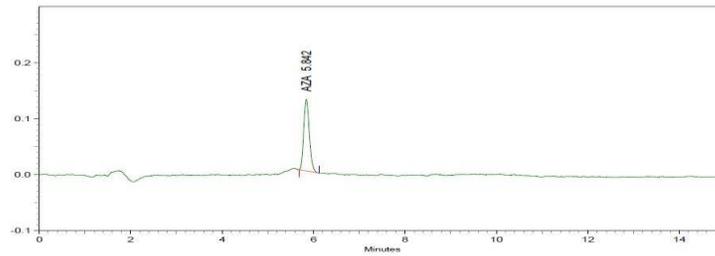


Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
AZA	5.742	520480	8171.62



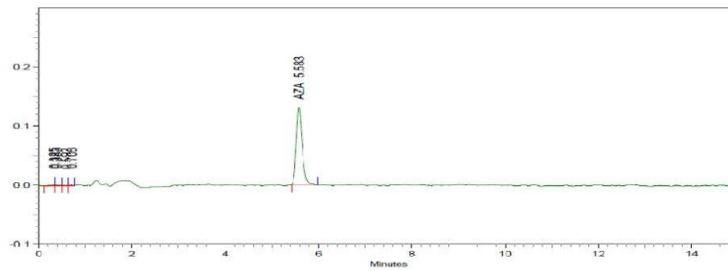
Estándar Azametifós (200 ppb) 11-2-2014



Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
AZA	5.842	1091492	10228.58

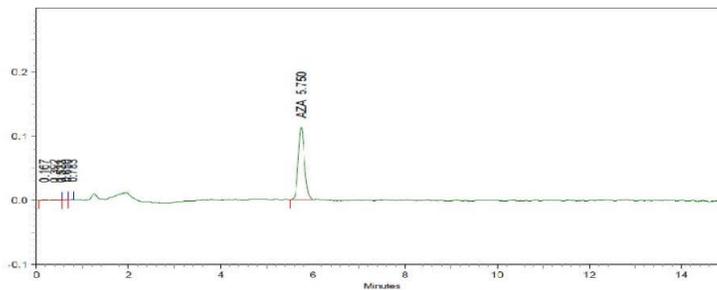
Estándar Azametifós (200 ppb) 12-2-2014



Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
AZA	5.583	1152581	9270.27

Estándar Azametifós (200 ppb) 13-2-2014

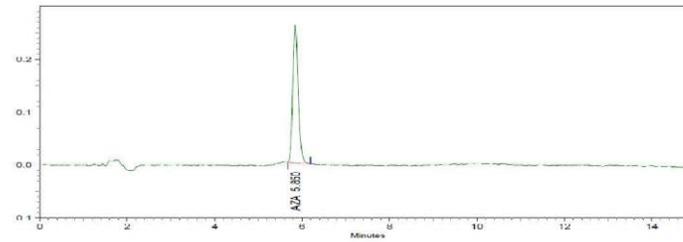


Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
AZA	5.750	1071072	8513.80



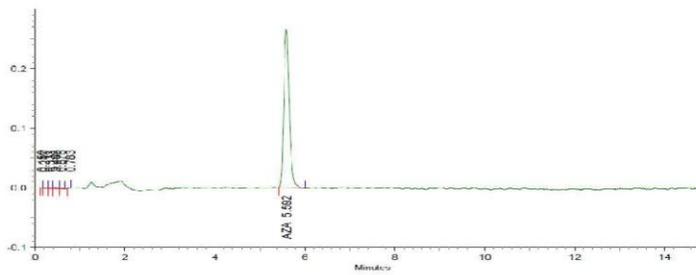
Est3ndar Azametif3s (400 ppb) 11-2-2014



Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
AZA	5.850	2251861	10210.22

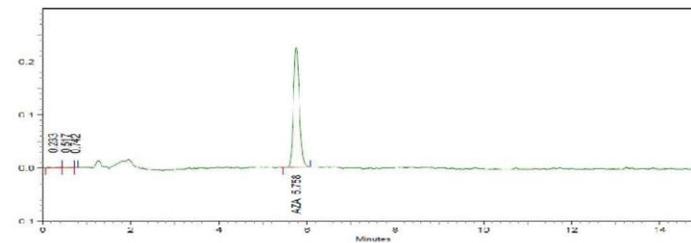
Est3ndar Azametif3s (400 ppb) 12-2-2014



Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
AZA	5.592	2290193	9503.73

Est3ndar Azametif3s (400 ppb) 13-2-2014



Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

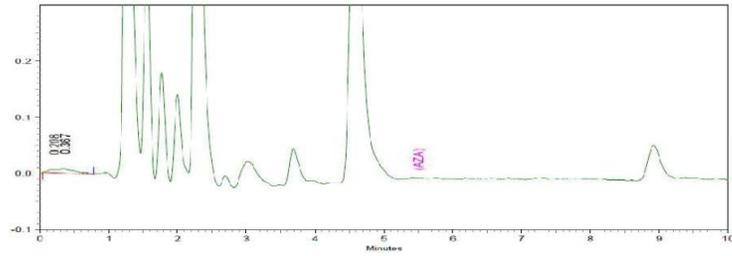
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
AZA	5.758	2101740	8657.55





Cromatogramas de Muestras blanco de Azmetif3s

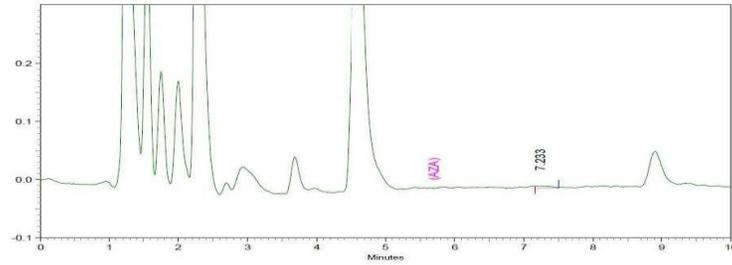
Blanco 1



Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
------	----------------	------	--------------------

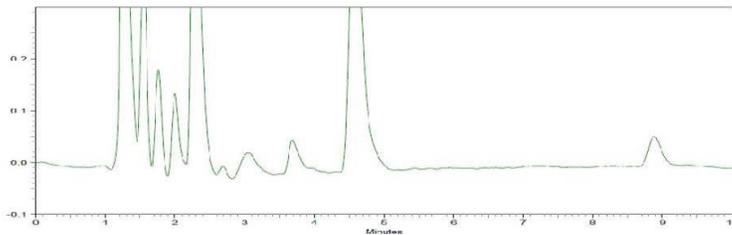
Blanco 2



Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
------	----------------	------	--------------------

Blanco 3

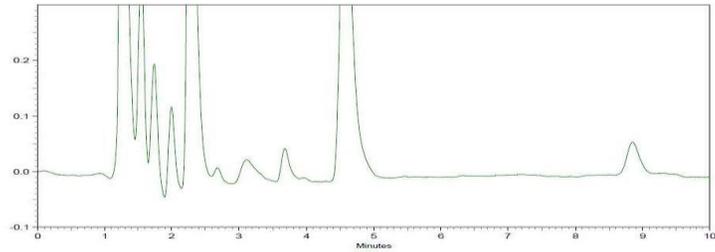


Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
------	----------------	------	--------------------



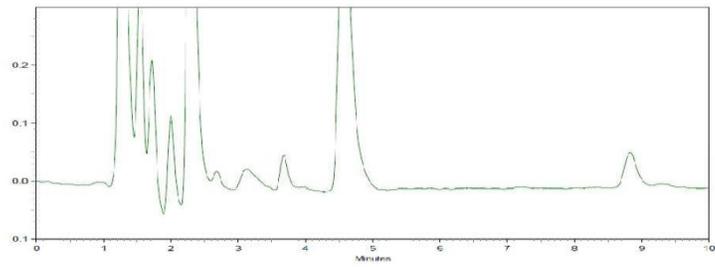
Blanco 4



Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
------	----------------	------	--------------------

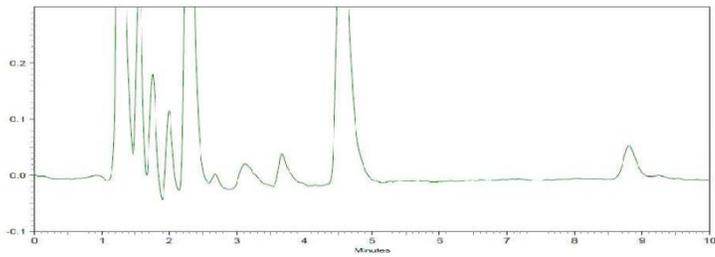
Blanco 5



Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
------	----------------	------	--------------------

Blanco 6

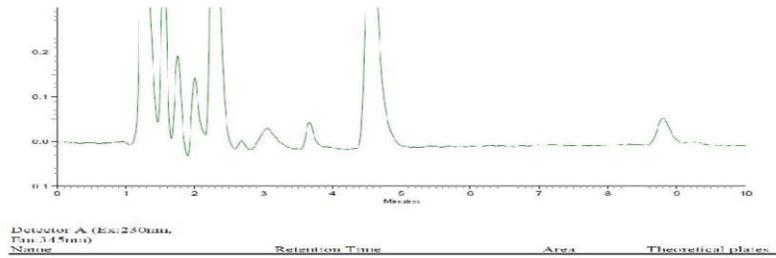


Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

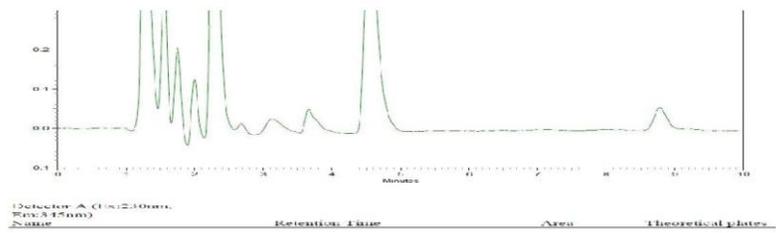
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
------	----------------	------	--------------------



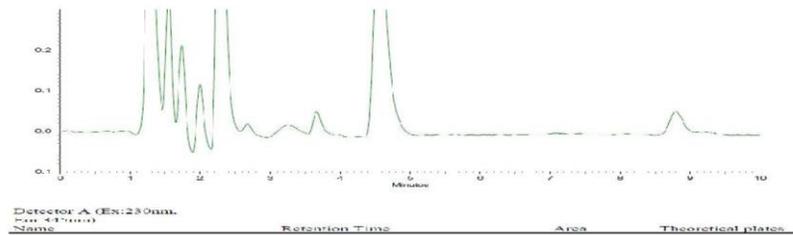
Blanco 7



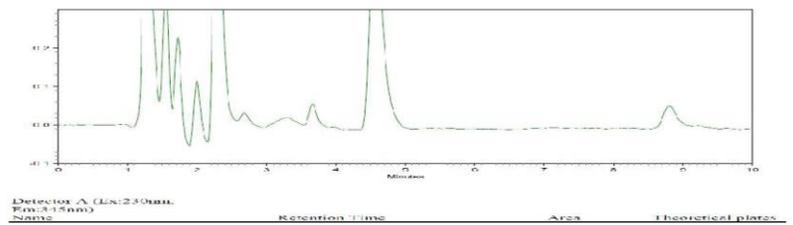
Blanco 8



Blanco 9



Blanco 10

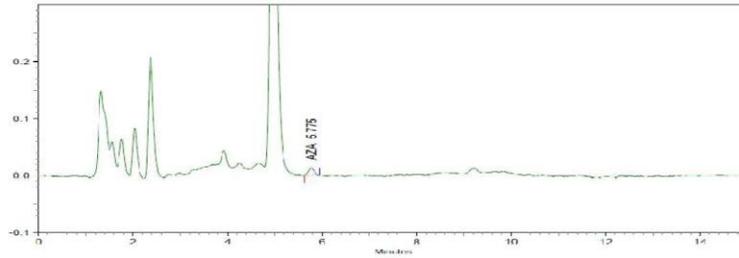






Cromatogramas de Fortificados de Azametif3s 11-2-2014

Fortificado 1 Azametif3s 11-2-2014



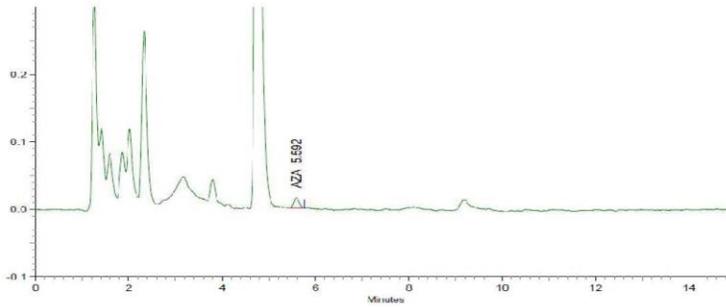
Detector A (Ex:230nm,

Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
------	----------------	------	--------------------

AZA	5.775	110121	8857.51
-----	-------	--------	---------

Fortificado 2 Azametif3s 11-2-2014



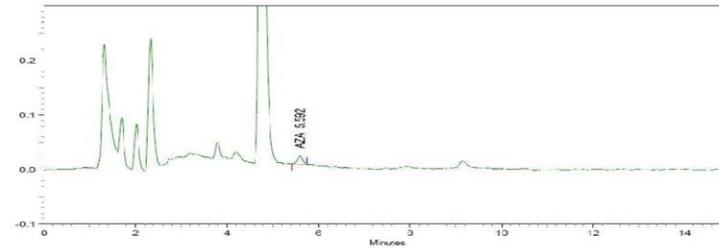
Detector A (Ex:230nm,

Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
------	----------------	------	--------------------

AZA	5.592	125059	9961.30
-----	-------	--------	---------

Fortificado 3 Azametif3s 11-2-2014



Detector A (Ex:230nm,

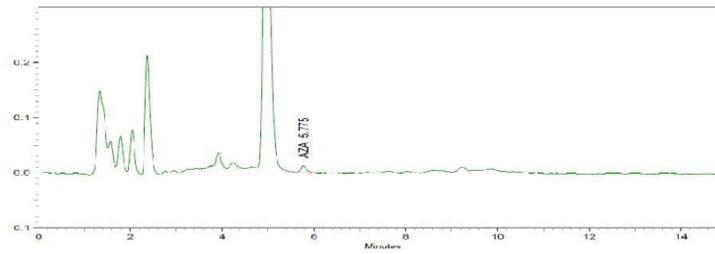
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
------	----------------	------	--------------------

AZA	5.592	124962	9992.07
-----	-------	--------	---------



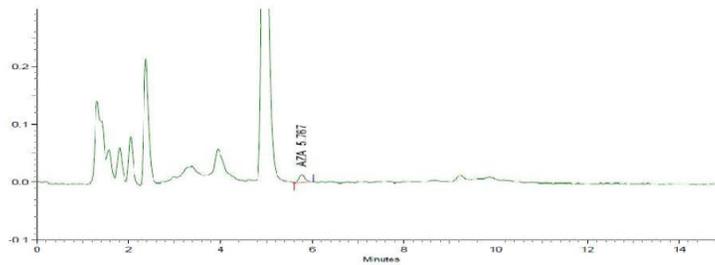
Fortificado 4 Azametif3s 11-2-2014



Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
AZA	5.775	109313	7302.59

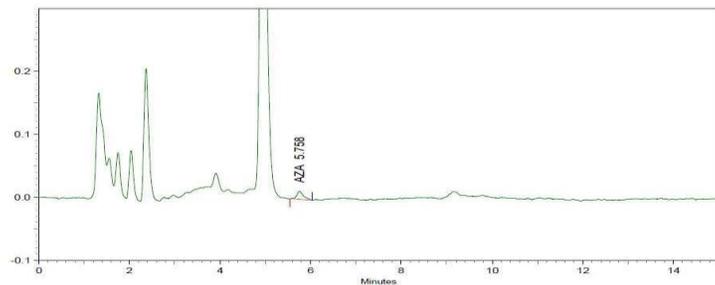
Fortificado 5 Azametif3s 11-2-2014



Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
AZA	5.767	128309	6384.17

Fortificado 6 Azametif3s 11-2-2014

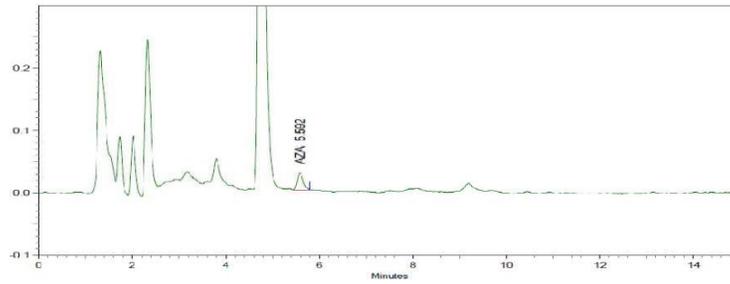


Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
AZA	5.758	129564	9082.07



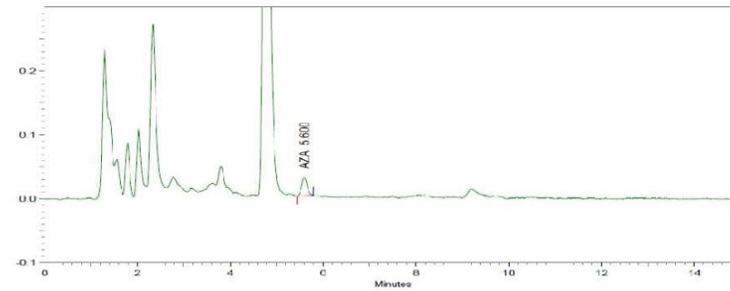
Fortificado 7 Azametif3s 11-2-2014



Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
AZA	5.592	231725	9735.33

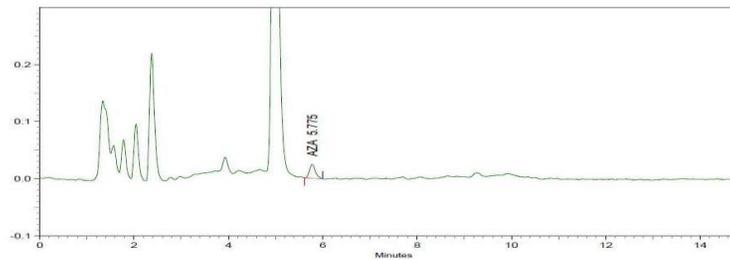
Fortificado 8 Azametif3s 11-2-2014



Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
AZA	5.600	232661	9598.78

Fortificado 9 Azametif3s 11-2-2014

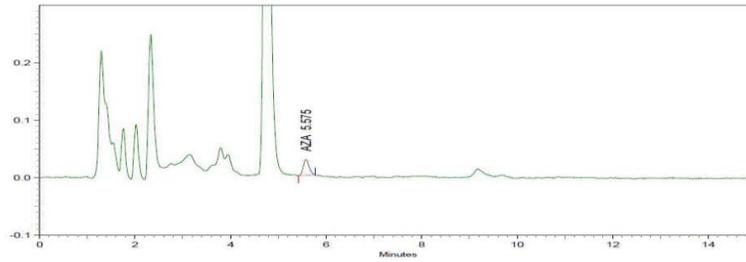


Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
AZA	5.775	210993	9345.97



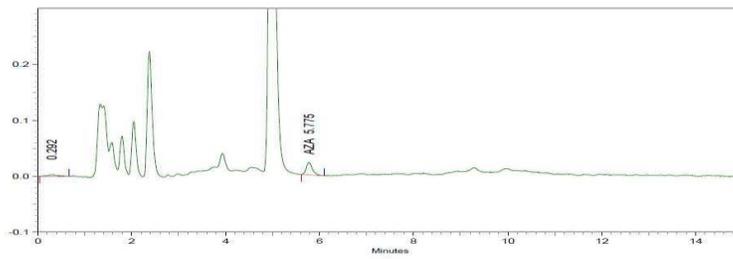
Fortificado 10 Azametif3s 11-2-2014



Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
AZA	5.575	232739	9166.76

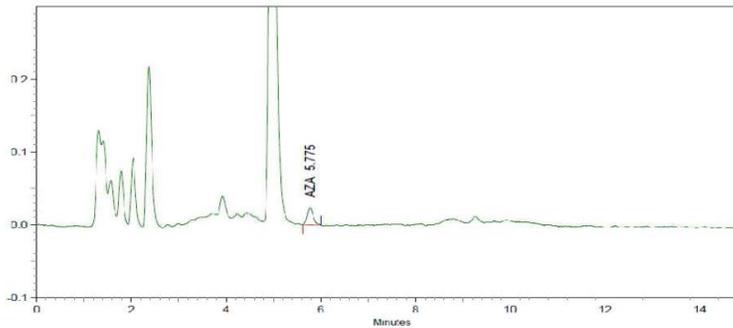
Fortificado 11 Azametif3s 11-2-2014



Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
AZA	5.775	202565	10073.30

Fortificado 12 Azametif3s 11-2-2014

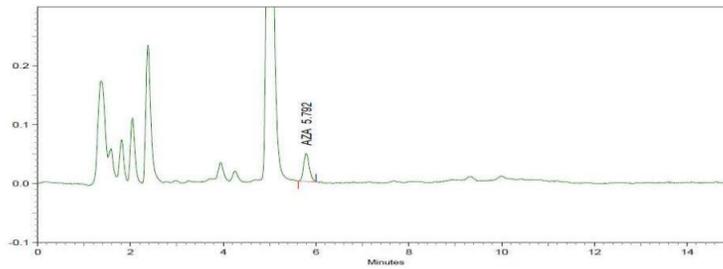


Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
AZA	5.775	200892	9674.86



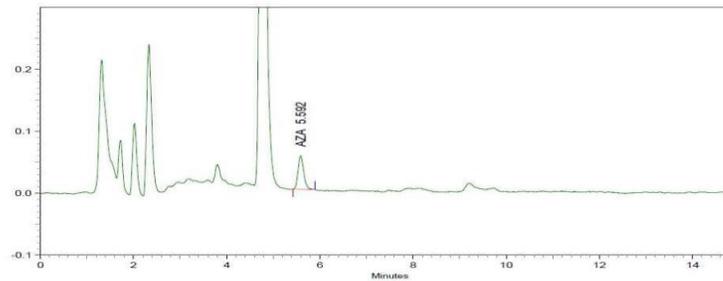
Fortificado 13 Azametifós 11-2-2014



Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
AZA	5.792	401034	10306.66

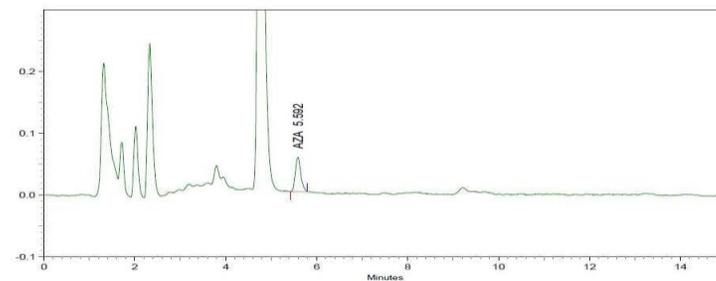
Fortificado 14 Azametifós 11-2-2014



Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
AZA	5.592	452623	9714.96

Fortificado 15 Azametifós 11-2-2014

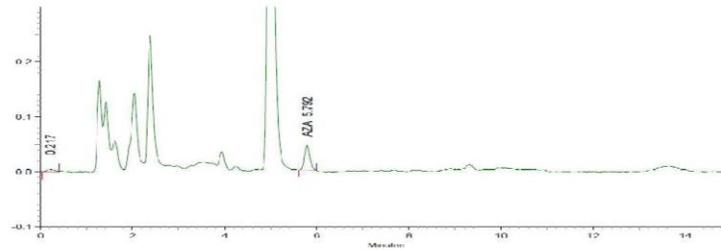


Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
AZA	5.592	463482	9760.20



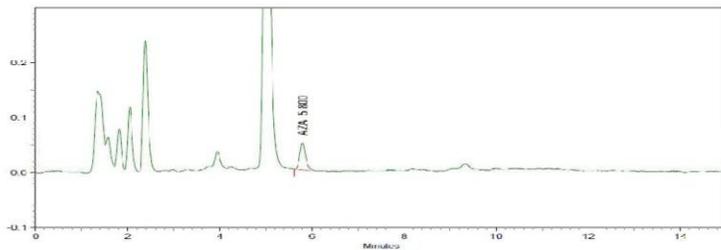
Fortificado 16 Azametif3s 11-2-2014



Detector A (Lx:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
AZA	5.792	380992	10773.35

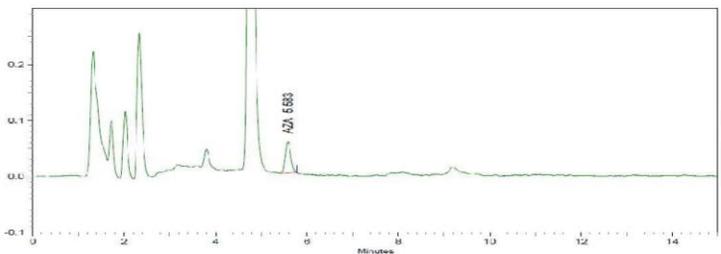
Fortificado 17 Azametif3s 11-2-2014



Detector A (Lx:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
AZA	5.800	430481	10364.37

Fortificado 18 Azametif3s 11-2-2014



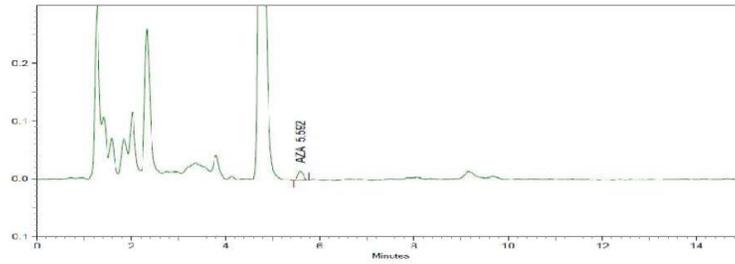
Detector A (Lx:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
AZA	5.582	458301	9817.00



Cromatogramas de Fortificados de Azametifós 12-2-2014

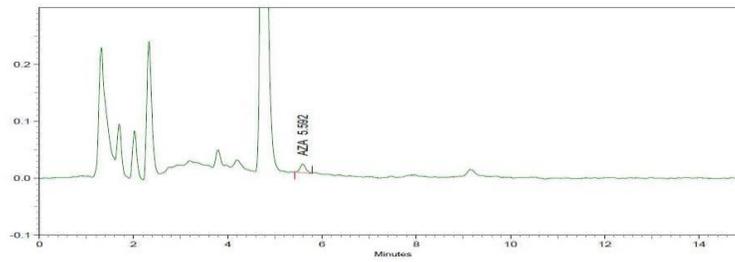
Fortificado 1 Azametifós 12-2-2014



Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
AZA	5.592	126995	9992.66

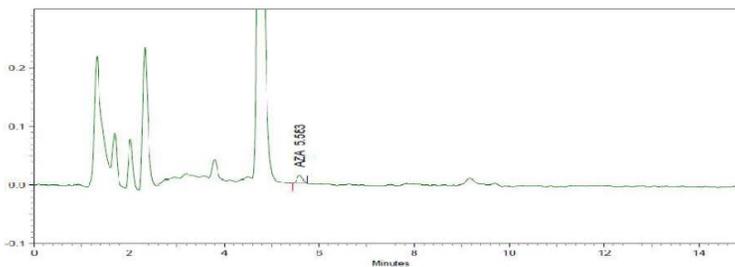
Fortificado 2 Azametifós 12-2-2014



Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
AZA	5.592	130872	9614.84

Fortificado 3 Azametifós 12-2-2014

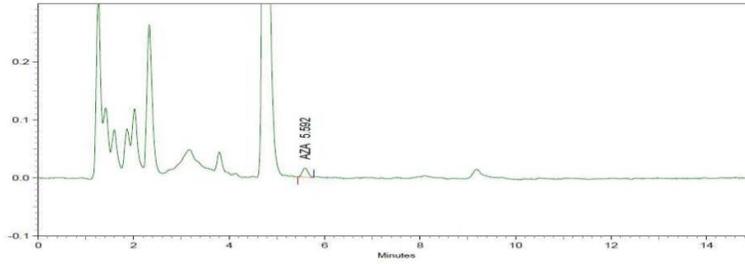


Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
AZA	5.593	111368	10685.32



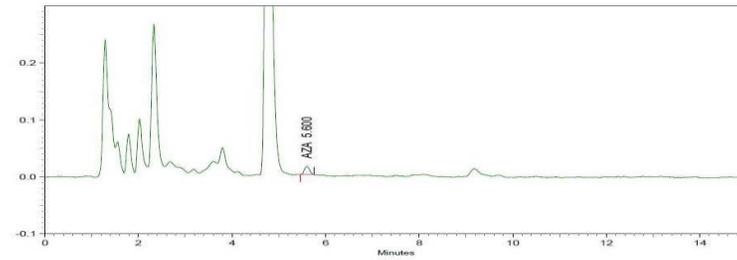
Fortificado 4 Azametif3s 12-2-2014



Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
AZA	5.592	132915	9470.27

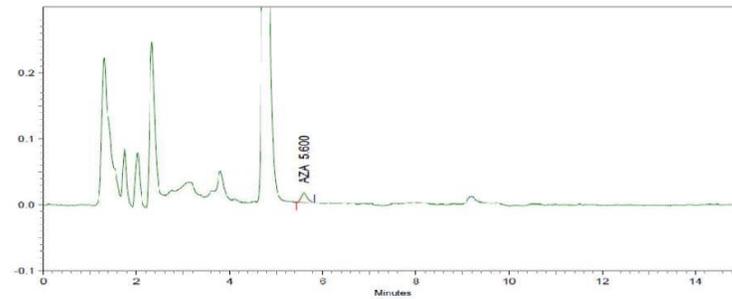
Fortificado 5 Azametif3s 12-2-2014



Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
AZA	5.600	112642	10670.99

Fortificado 6 Azametif3s 12-2-2014

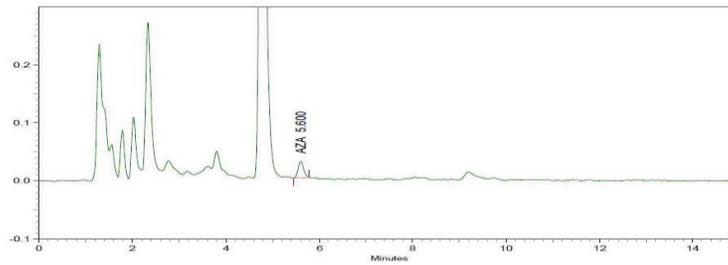


Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
AZA	5.600	134613	8513.15



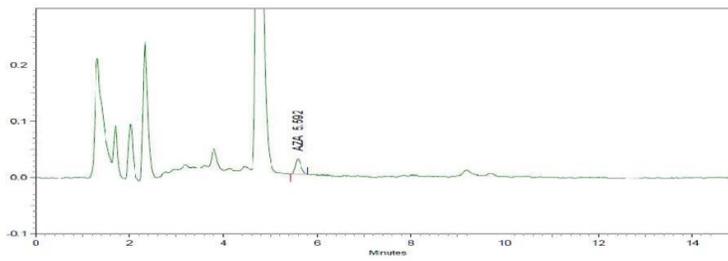
Fortificado 7 Azametif3s 12-2-2014



Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
AZA	5.600	228133	9740.75

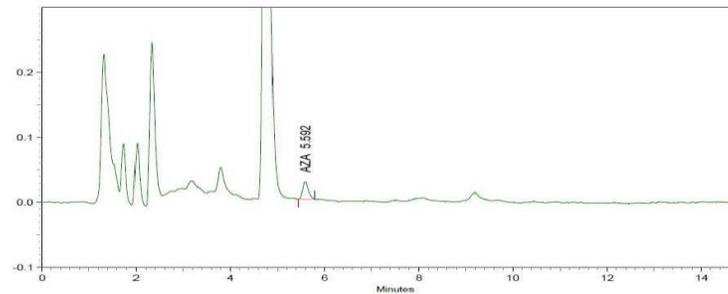
Fortificado 8 Azametif3s 12-2-2014



Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
AZA	5.592	230138	9378.69

Fortificado 9 Azametif3s 12-2-2014

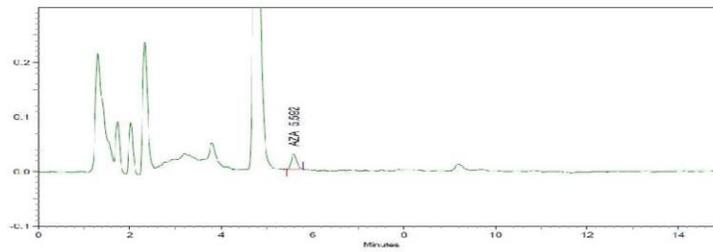


Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
AZA	5.592	229905	9783.48



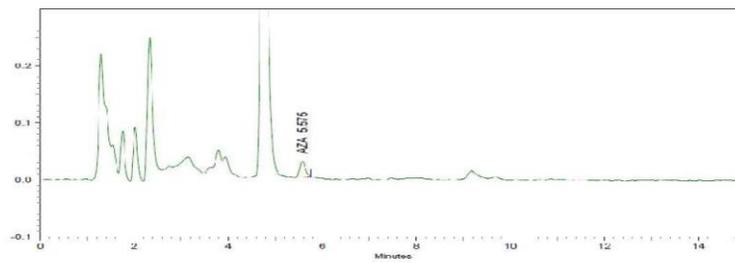
Fortificado 10 Azametif3s 12-2-2014



Detector A (Ex:230nm, Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
AZA	5.592	224632	10468.45

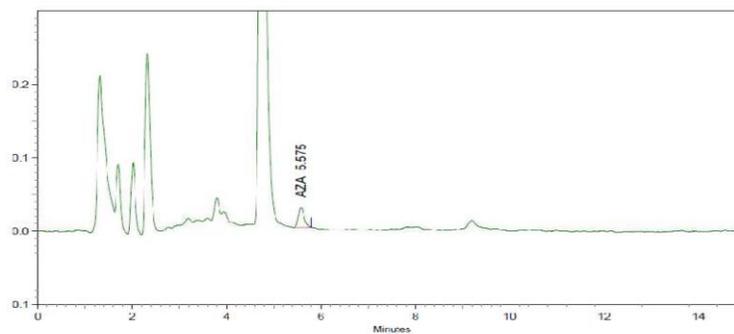
Fortificado 11 Azametif3s 12-2-2014



Detector A (Ex:230nm, Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
AZA	5.575	225074	9420.99

Fortificado 12 Azametif3s 12-2-2014

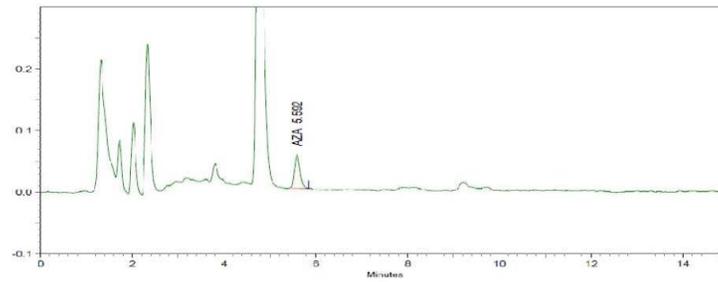


Detector A (Ex:230nm, Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
AZA	5.575	234115	9002.26



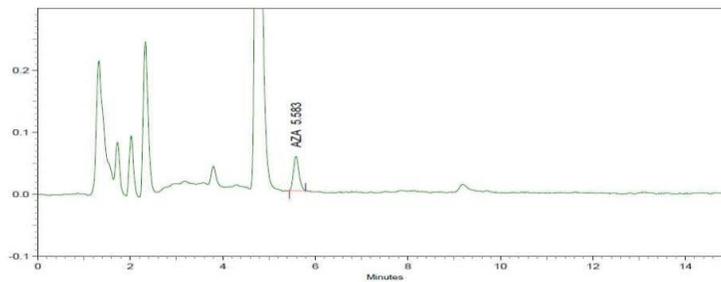
Fortificado 13 Azametifós 12-2-2014



Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
AZA	5.592	151835	9716.18

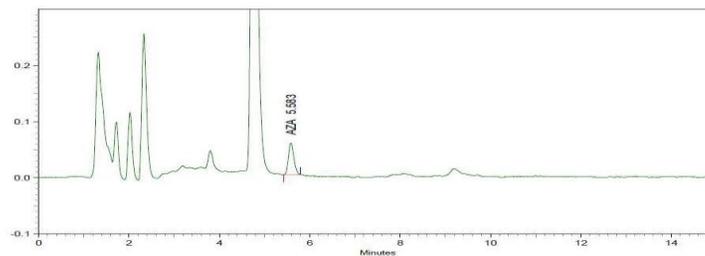
Fortificado 14 Azametifós 12-2-2014



Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
AZA	5.583	465885	9522.86

Fortificado 15 Azametifós 12-2-2014

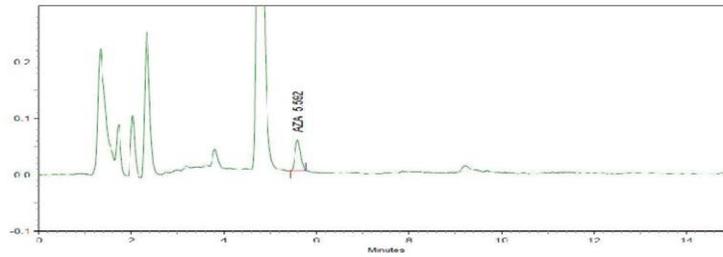


Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
AZA	5.583	468455	9667.51



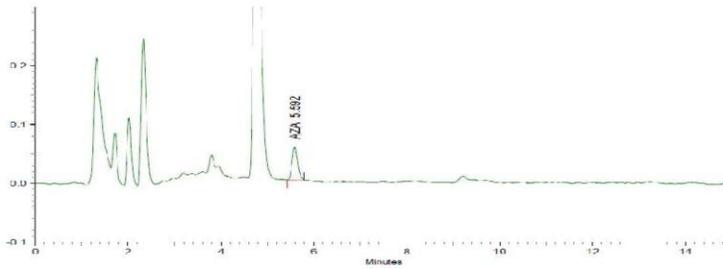
Fortificado 16 Azametif3s 12-2-2014



Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
AZA	5.592	441704	10080.23

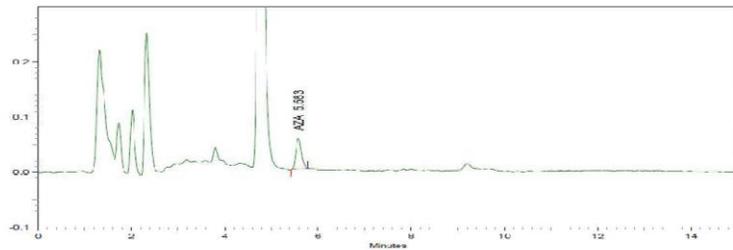
Fortificado 17 Azametif3s 12-2-2014



Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
AZA	5.592	465220	9736.03

Fortificado 18 Azametif3s 12-2-2014



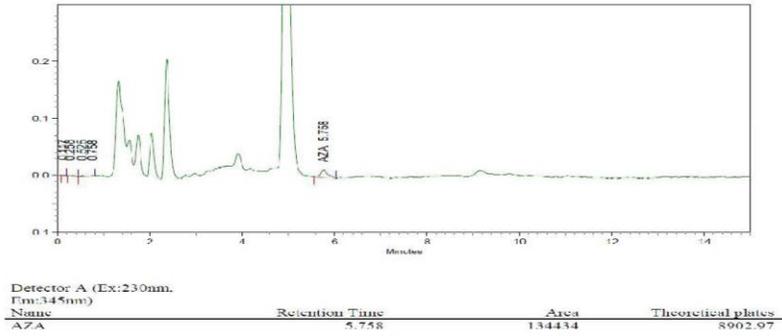
Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
AZA	5.583	462843	9696.37

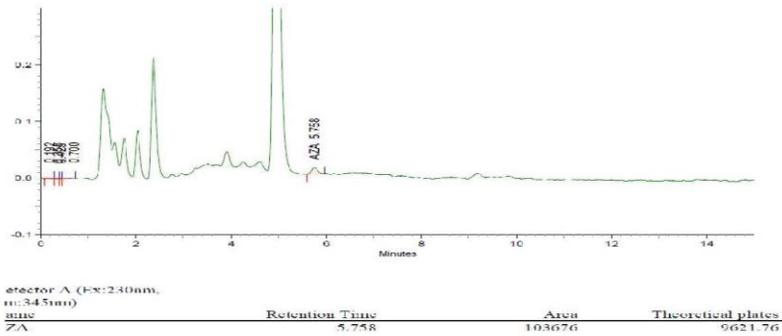


Cromatogramas de Fortificados de Azametif3s 13-2-2014

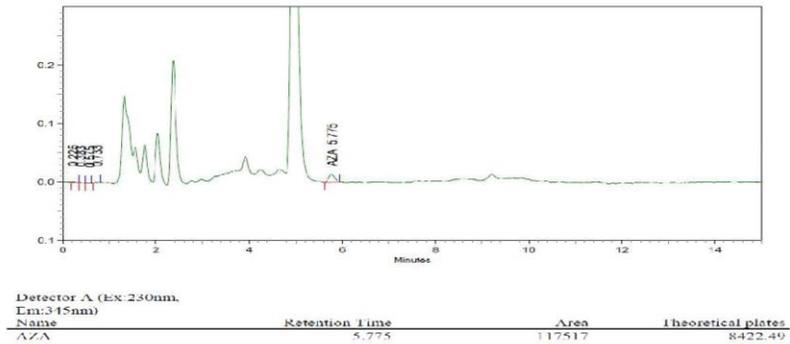
Fortificado 1 Azametif3s 13-2-2014



Fortificado 2 Azametif3s 13-2-2014

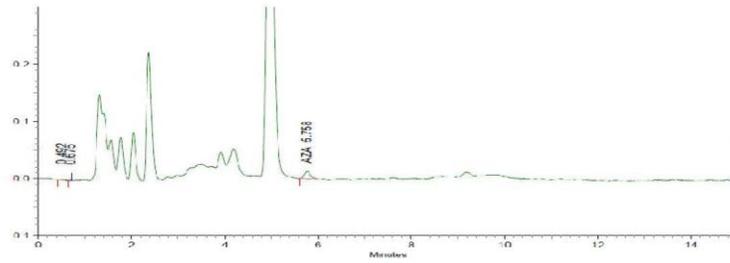


Fortificado 3 Azametif3s 13-2-2014





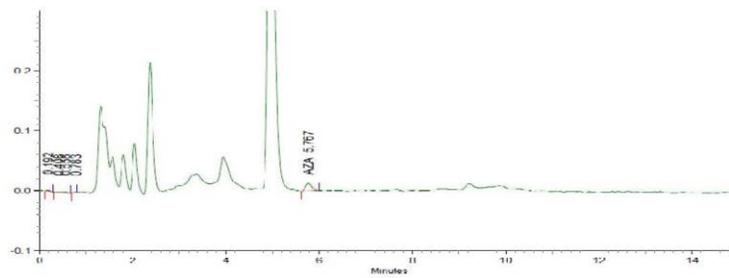
Fortificado 4 Azametif3s 13-2-2014



Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)
Name

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
AZA	5.758	116751	9842.31

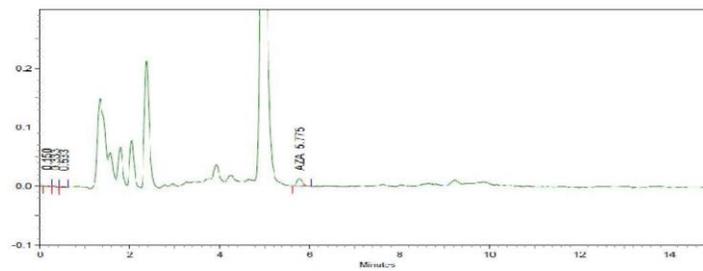
Fortificado 5 Azametif3s 13-2-2014



Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)
Name

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
AZA	5.767	118942	9705.97

Fortificado 6 Azametif3s 13-2-2014

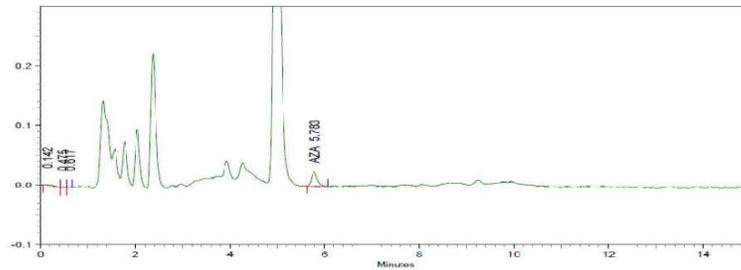


Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)
Name

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
AZA	5.775	106222	10689.26



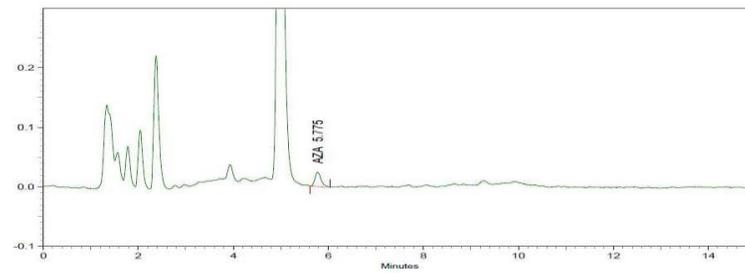
Fortificado 7 Azametif3s 13-2-2014



Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
AZA	5.783	209173	10861.99

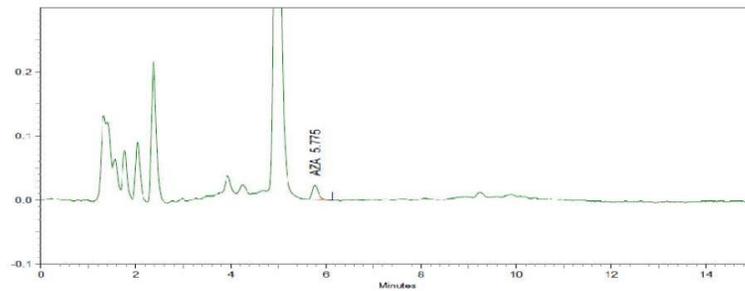
Fortificado 8 Azametif3s 13-2-2014



Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
AZA	5.775	216181	9210.47

Fortificado 9 Azametif3s 13-2-2014

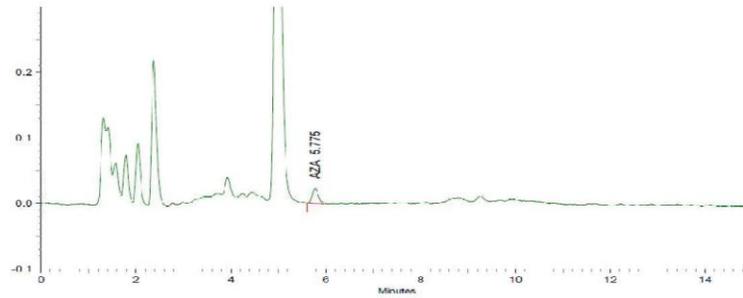


Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
AZA	5.775	198839	10317.22



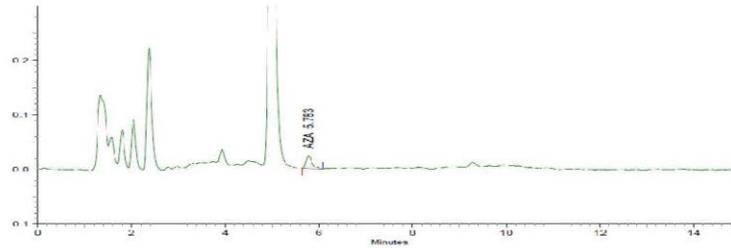
Fortificado 10 Azametifós 13-2-2014



Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
AZA	5.775	211337	9391.17

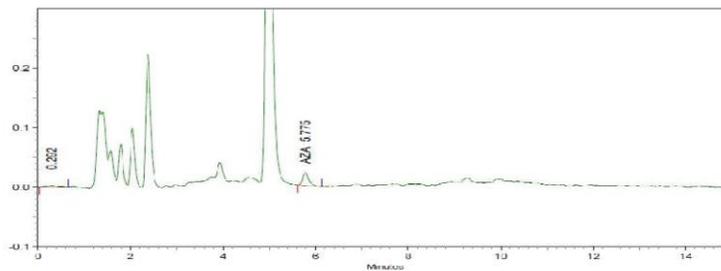
Fortificado 11 Azametifós 13-2-2014



Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
AZA	5.783	209847	10275.56

Fortificado 12 Azametifós 13-2-2014

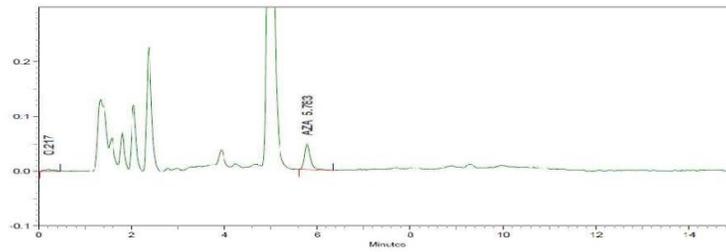


Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
AZA	5.775	203824	10053.56



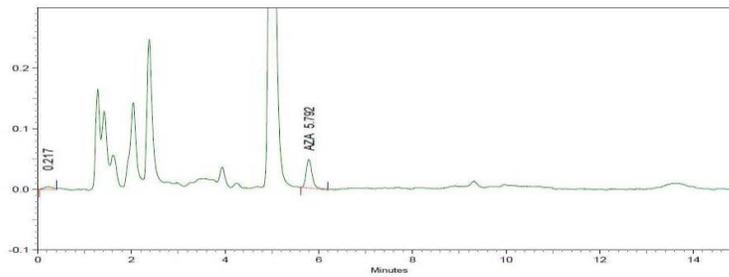
Fortificado 13 Azametif3s 13-2-2014



Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
AZA	5.783	432540	10121.53

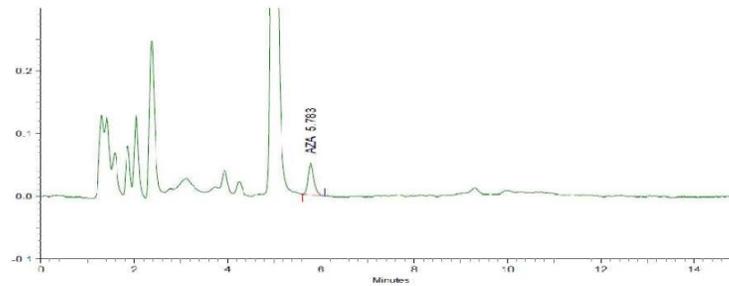
Fortificado 14 Azametif3s 13-2-2014



Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
AZA	5.792	412299	10385.87

Fortificado 15 Azametif3s 13-2-2014

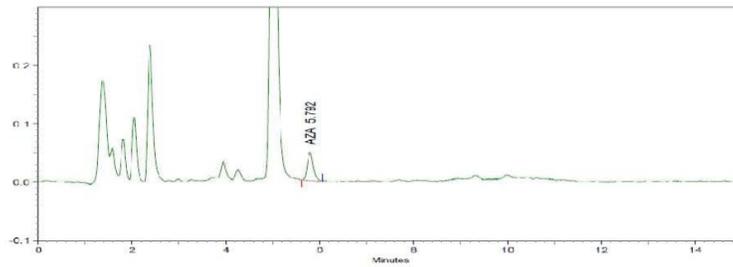


Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
AZA	5.783	447234	10080.46



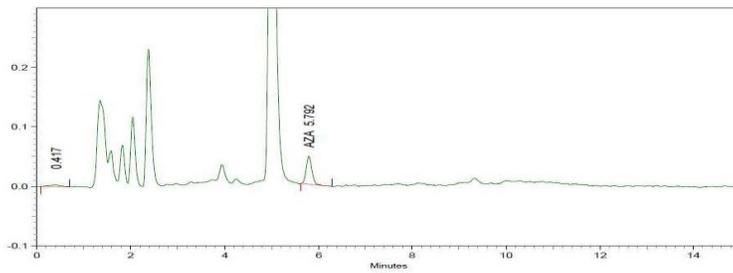
Fortificado 16 Azametif3s 13-2-2014



Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
AZA	5.792	424993	9975.77

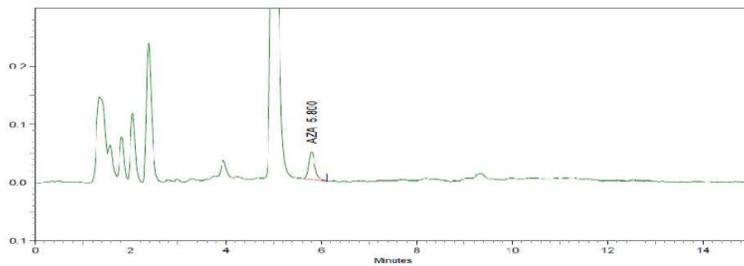
Fortificado 17 Azametif3s 13-2-2014



Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
AZA	5.792	401509	10507.06

Fortificado 18 Azametif3s 13-2-2014



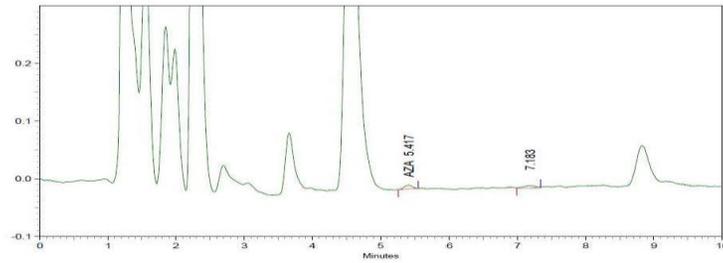
Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
AZA	5.800	433287	10337.63



Cromatogramas de Fortificados de Azametifós 50 ppb

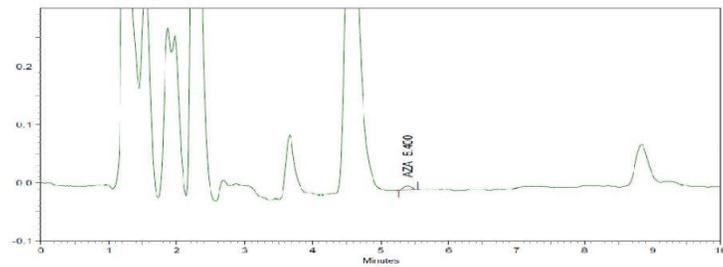
Fortificado 1 Azametifós 11-4-2014



Detector A (Ex:230nm, Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
AZA	5.417	54099	9187.58

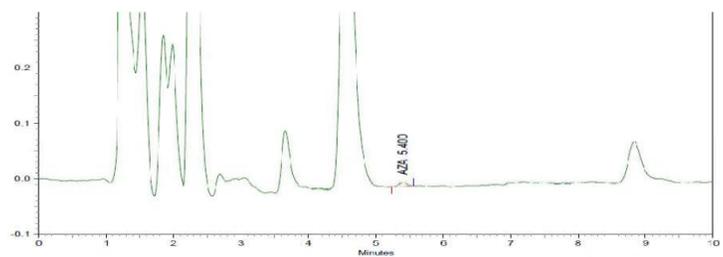
Fortificado 2 Azametifós 11-4-2014



Detector A (Ex:230nm, Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
AZA	5.400	57957	8900.55

Fortificado 3 Azametifós 11-4-2014

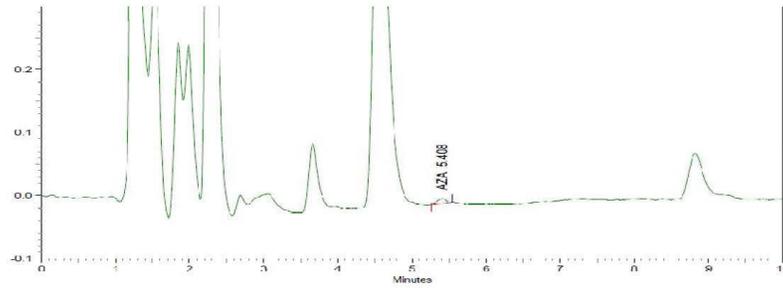


Detector A (Ex:230nm, Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
AZA	5.400	59051	9158.31



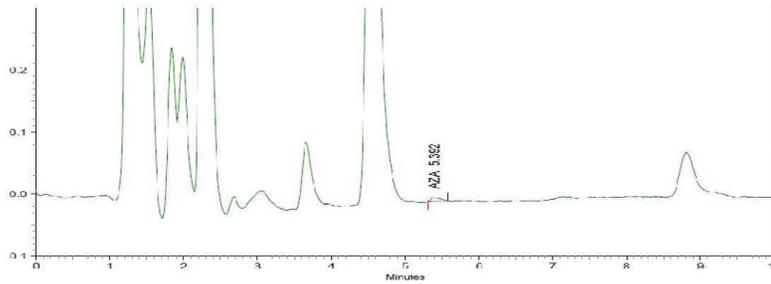
Fortificado 4 Azametifós 11-4-2014



Detector A (Ex:230nm, Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
AZA	5.408	60695	8380.83

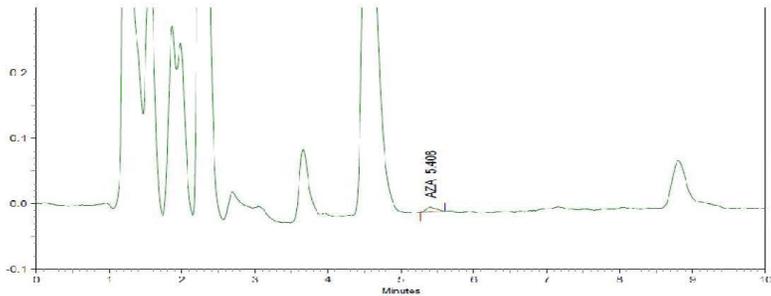
Fortificado 5 Azametifós 11-4-2014



Detector A (Ex:230nm, Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
AZA	5.392	57000	7066.98

Fortificado 6 Azametifós 11-4-2014

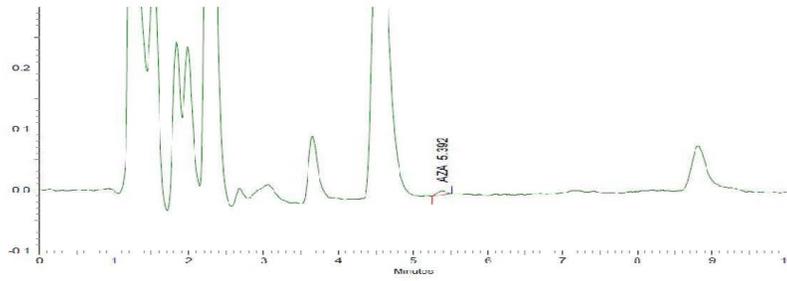


Detector A (Ex:230nm, Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
AZA	5.408	69751	0.00



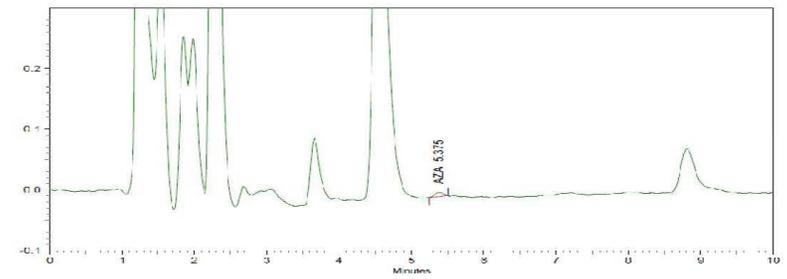
Fortificado 7 Azametif3s 11-4-2014



Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
AZA	5.392	56211	7936.74

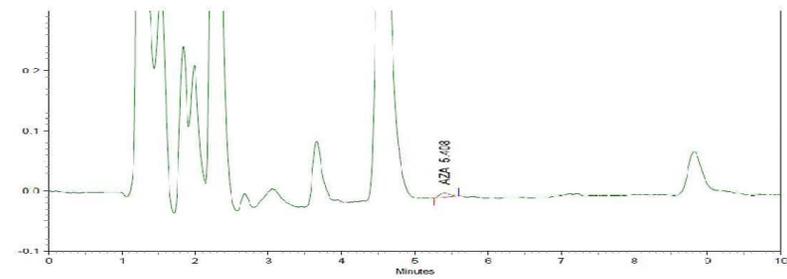
Fortificado 8 Azametif3s 11-4-2014



Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
AZA	5.375	52947	9550.07

Fortificado 9 Azametif3s 11-4-2014

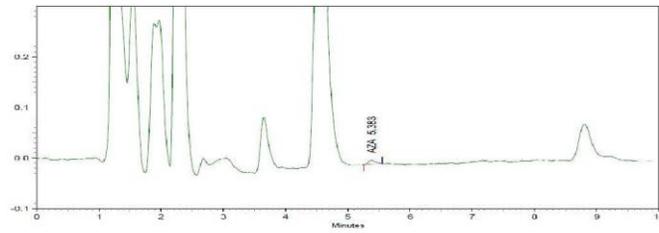


Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
AZA	5.408	63179	7620.93



Fortificado 10 Azametif3s 11-4-2014



Detector A (Lx:230nm,
Fu:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
AZA	5.383	60981	7781.65

A N E X O 6

Resultados experimentales de validación de Diflubenzurón.



Resultados experimentales de validación de Diflubenzuron en choritos

Contenido

1.- Especificidad	03
2.- Linealidad	03
3- Recuperación de Diflubenzuron	05
4.- Exactitud	06
5.- Precisión	06
5.1.- Repetibilidad de Diflubenzuron	06
5.2.- Precisión intermedia de Diflubenzuron	09
6.- Límite de detección y cuantificación	11
6.1.- Límite de detección de Diflubenzuron	11
6.1.1.- Verificación del límite de detección	11
6.2.- Límite de cuantificación de Diflubenzuron	12
7.- Robustez	12





1.- Especificidad

A partir de los datos de la curva de calibración, se determina el tiempo de retención del analito, la desviación estándar y el coeficiente de variación de éste. Los resultados se indican en la tabla N° 1.

Tabla N° 1: Tiempos de retención de Diflubenzuron

Fecha	conc. ng/ml	T R
11/02/2014	192	7,56
12/02/2014	192	7,79
13/02/2014	192	7,51
11/02/2014	384	7,55
12/02/2014	384	7,77
13/02/2014	384	7,54
11/02/2014	960	7,62
12/02/2014	960	7,74
13/02/2014	960	7,52
11/02/2014	1920	7,55
12/02/2014	1920	7,68
13/02/2014	1920	7,49
11/02/2014	3840	7,54
12/02/2014	3840	7,74
13/02/2014	3840	7,47
Promedio		7,6
D.S.		0,1
% C.V.		1,4

Los cromatogramas se pueden observar en el Anexo 6.1.

Al realizar la extracción de 10 muestras blanco, se demuestra que no hay interferentes de importancia en los tiempos de retención. Los cromatogramas de las muestras blanco se pueden observar en el Anexo 6.2.

2.- Linealidad:

Se evaluó la linealidad del método desarrollado, confeccionando una curva de calibración de 5 puntos durante 3 días diferentes. Las concentraciones aproximadas del analito fue de 192, 384, 960 y 3840 ng/ml. Los resultados de las áreas obtenidas, las curvas de calibración estándar (con la ecuación de la recta y coeficiente de correlación) y el gráfico de residuales se presentan para el analito en la tabla 2 y figuras 1, 2



Tabla N° 2: áreas de curva de calibración de Diflubenzuron:

Fecha	conc. ng/ml	área obtenida	área promedio	área D.S.	área % C.V.
11/02/2014	192	15.025	15.858	732	5
12/02/2014	192	16.149			
13/02/2014	192	16.400			
11/02/2014	384	32.692	32.699	196	1
12/02/2014	384	32.507			
13/02/2014	384	32.898			
11/02/2014	960	79.087	81321	1982	2
12/02/2014	960	82.008			
13/02/2014	960	82.867			
11/02/2014	1920	164.527	161.202	2880	2
12/02/2014	1920	159.469			
13/02/2014	1920	159.610			
11/02/2014	3840	330.424	320.544	8710	3
12/02/2014	3840	313.976			
13/02/2014	3840	317.233			

Figura N° 1

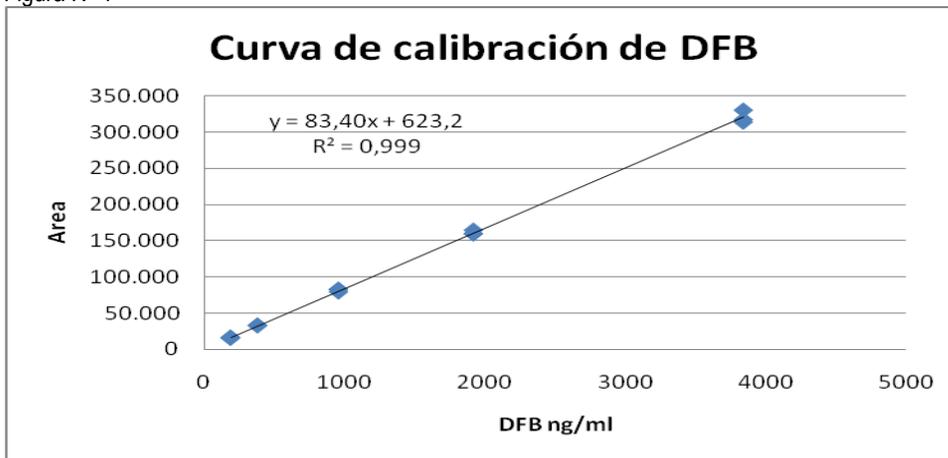
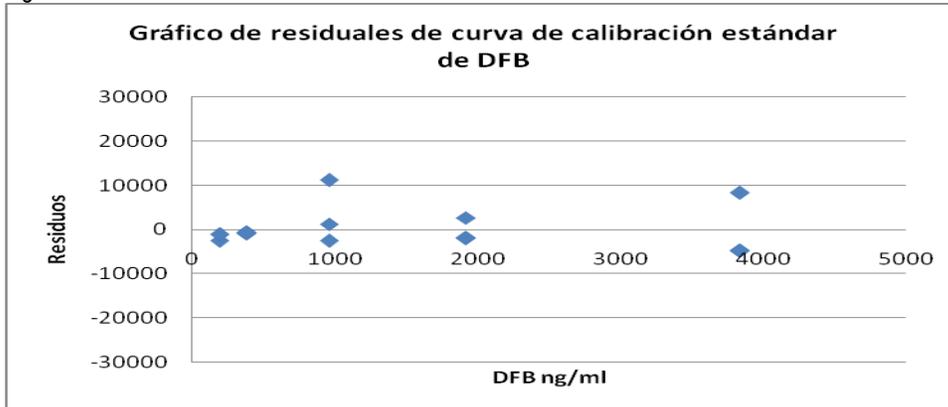




Figura N° 2:



Los cromatogramas se pueden observar en Anexo 6.1, cromatogramas de curva de calibración de Diflubenzuron.

3.- Recuperación:

Los resultados de recuperación de Diflubenzuron en los tres días se presentan en la tabla N° 3. Se presenta el valor promedio de recuperación (que se utilizará para el cálculo de las muestras problema), el coeficiente de variación y la desviación estándar para la confección de una carta control de recuperación tipo Shewhart (con el que se controlarán posteriormente los ensayos, para demostrar que la técnica está bajo control estadístico).

Tabla N°3: Recuperación de Diflubenzuron

Fecha	N° for	conc intentada ng/g	conc obtenida ng/g	% rec
11/02/2014	1	1000,0	1043,5	104,4
	2	1000,0	1079,8	108,0
	3	1000,0	1079,2	107,9
	4	1000,0	1080,6	108,1
	5	1000,0	1087,3	108,7
	6	1000,0	1180,1	118,0
	7	2000,0	2079,9	104,0
	8	2000,0	2154,2	107,7
	9	2000,0	2081,3	104,1
	10	2000,0	2091,2	104,6
	11	2000,0	2081,1	104,1
	12	2000,0	2000,8	100,0
	13	4000,0	4046,6	101,2
	14	4000,0	4045,8	101,1
	15	4000,0	4056,4	101,4
	16	4000,0	4029,7	100,7
	17	4000,0	4032,9	100,8
	18	4000,0	3804,6	95,1
12/02/2014	1	1000,0	1070,4	107,0
	2	1000,0	1043,6	104,4
	3	1000,0	1082,3	108,2
	4	1000,0	1077,2	107,7
	5	1000,0	1088,6	108,9
	6	1000,0	1117,3	111,7
	7	2000,0	2060,1	103,0
	8	2000,0	2093,1	104,7
	9	2000,0	2061,5	103,1
	10	2000,0	2029,9	101,5



	11	2000,0	2053,4	102,7
	12	2000,0	2004,9	100,2
	13	4000,0	4010,7	100,3
	14	4000,0	4029,3	100,7
	15	4000,0	4004,2	100,1
	16	4000,0	3989,5	99,7
	17	4000,0	3974,9	99,4
	18	4000,0	3925,8	98,1
13/02/2014	1	1000,0	1097,5	109,7
	2	1000,0	1109,0	110,9
	3	1000,0	1096,0	109,6
	4	1000,0	1137,5	113,7
	5	1000,0	1062,7	106,3
	6	1000,0	1106,8	110,7
	7	2000,0	2136,0	106,8
	8	2000,0	2084,4	104,2
	9	2000,0	2070,8	103,5
	10	2000,0	2129,5	106,5
	11	2000,0	2094,6	104,7
	12	2000,0	2076,3	103,8
	13	4000,0	4287,5	107,2
	14	4000,0	4289,1	107,2
	15	4000,0	4234,9	105,9
	16	4000,0	4263,7	106,6
	17	4000,0	4175,6	104,4
	18	4000,0	4123,3	103,1
Prom				104,9
DS				4,2
CV				4,0
prom + 2DS				113,3
prom - 2DS				96,5
prom + 3DS				117,6
prom - 3DS				92,3

Los cromatogramas de recuperación, se pueden observar en los anexos 6.3, 6.4 y 6.5.

4.- Exactitud o veracidad:

No aplica

5.- Precisión:

5.1.- Repetibilidad:

Los resultados de recuperación de Diflubenzuron en los tres días se presentan en las tablas N° 4, 5 y 6. Se presenta el valor promedio de recuperación, la desviación estándar y el coeficiente de variación, de cada nivel de fortificación y del día.



Tabla N° 4: Recuperación de Diflubenzuron 11-02-2014

N° for	conc intentada ng/g	área	pendiente	intercepto	conc obtenida ng/g	% rec	prom	ds	cv
1	1000,0	44.139	83,40	623.2	1043,5	104,4			
2	1000,0	45.651			1079,8	108,0			
3	1000,0	45.626			1079,2	107,9			
4	1000,0	45.683			1080,6	108,1			
5	1000,0	45.963			1087,3	108,7			
6	1000,0	49.834			1180,1	118,0	109,2	4,6	4,2
7	2000,0	87.356			2079,9	104,0			
8	2000,0	90.455			2154,2	107,7			
9	2000,0	87.413			2081,3	104,1			
10	2000,0	87.827			2091,2	104,6			
11	2000,0	87.406			2081,1	104,1			
12	2000,0	88.055			2000,8	100,0	104,1	2,4	2,3
13	4000,0	169.368			4046,6	101,2			
14	4000,0	169.332			4045,8	101,1			
15	4000,0	169.774			4056,4	101,4			
16	4000,0	168.662			4029,7	100,7			
17	4000,0	168.794			4032,9	100,8			
18	4000,0	159.276			3804,6	95,1	101,1	2,4	2,4
					prom	104,4			
					ds	4,9			
					cv	4,7			



Tabla N° 5: recuperación de Diflubenzuron 12-02-2014

N° for	conc intentada ng/g	área	pendiente	intercepto	conc obtenida ng/g	% rec	prom	ds	cv
1	1000,0	45.259	83,40	623,2	1070,4	107,0			
2	1000,0	44.140			1043,6	104,4			
3	1000,0	45.757			1082,3	108,2			
4	1000,0	45.544			1077,2	107,7			
5	1000,0	46.018			1088,6	108,9			
6	1000,0	47.216			1117,3	111,7	108,0	2,4	2,2
7	2000,0	86.530			2060,1	103,0			
8	2000,0	87.905			2093,1	104,7			
9	2000,0	86.588			2061,5	103,1			
10	2000,0	85.268			2029,9	101,5			
11	2000,0	86.249			2053,4	102,7			
12	2000,0	84.229			2004,9	100,2	102,5	1,5	1,5
13	4000,0	167.871			4010,7	100,3			
14	4000,0	168.647			4029,3	100,7			
15	4000,0	167.598			4004,2	100,1			
16	4000,0	166.986			3989,5	99,7			
17	4000,0	166.375			3974,9	99,4			
18	4000,0	164.330			3925,8	98,1	99,7	0,9	0,9
						prom	103,4		
						ds	3,9		
						cv	3,8		



Tabla N° 6: recuperación de Diflubenzuron 13-02-2014

N° for	conc intentada ng/g	área	pendiente	intercepto	conc obtenida ng/g	% rec	prom	ds	cv
1	1000,0	46.388	83,40	623,2	1097,5	109,7			
2	1000,0	46.868			1109,0	110,9			
3	1000,0	46.328			1096,0	109,6			
4	1000,0	48.056			1137,5	113,7			
5	1000,0	44.939			1062,7	106,3			
6	1000,0	46.777			1106,8	110,7	110,2	2,4	2,2
7	2000,0	89.693			2136,0	106,8			
8	2000,0	87.542			2084,4	104,2			
9	2000,0	86.977			2070,8	103,5			
10	2000,0	89.423			2129,5	106,5			
11	2000,0	87.969			2094,6	104,7			
12	2000,0	87.203			2076,3	103,8	104,9	1,4	1,3
13	4000,0	179.414			4287,5	107,2			
14	4000,0	179.480			4289,1	107,2			
15	4000,0	177.220			4234,9	105,9			
16	4000,0	178.420			4263,7	106,6			
17	4000,0	174.746			4175,6	104,4			
18	4000,0	172.563			4123,3	103,1	105,7	1,7	1,6
						prom	106,9		
						ds	3,0		
						cv	2,8		

Los cromatogramas de recuperación se pueden observar en los anexos 6.3, 6.4 y 6.5.

5.2 Precisión intermedia:

Los resultados de la precisión intermedia de Diflubenzuron, se presentan en la tabla 7.



Tabla N° 7: Precisión intermedia de Diflubenzuron 13-02-2014

Precisión intermedia DFB

Fecha	N° for	conc intentada ng/g	área	pendiente	intercepto	conc obtenida ng/g	% rec	prom	ds	cv
11-Feb	1	1000,0	44.139	83	623	1043,5	104,4			
11-Feb	2	1000,0	45.651			1079,8	108,0			
11-Feb	3	1000,0	45.626			1079,2	107,9			
11-Feb	4	1000,0	45.683			1080,6	108,1			
11-Feb	5	1000,0	45.963			1087,3	108,7			
11-Feb	6	1000,0	49.834			1180,1	118,0			
12-Feb	1	1000,0	45.259			1070,4	107,0			
12-Feb	2	1000,0	44.140			1043,6	104,4	109,1	3,2	3,0
12-Feb	3	1000,0	45.757			1082,3	108,2			
12-Feb	4	1000,0	45.544			1077,2	107,7			
12-Feb	5	1000,0	46.018			1088,6	108,9			
12-Feb	6	1000,0	47.216			1117,3	111,7			
13-Feb	1	1000,0	46.388			1097,5	109,7			
13-Feb	2	1000,0	46.868			1109,0	110,9			
13-Feb	3	1000,0	46.328			1096,0	109,6			
13-Feb	4	1000,0	48.056			1137,5	113,7			
13-Feb	5	1000,0	44.939			1062,7	106,3			
13-Feb	6	1000,0	46.777			1106,8	110,7			
11-Feb	7	2000,0	87.356			2079,9	104,0			
11-Feb	8	2000,0	90.455			2154,2	107,7			
11-Feb	9	2000,0	87.413			2081,3	104,1			
11-Feb	10	2000,0	87.827			2091,2	104,6			
11-Feb	11	2000,0	87.406			2081,1	104,1			
11-Feb	12	2000,0	84.055			2000,8	100,0			
12-Feb	7	2000,0	86.530			2060,1	103,0			
12-Feb	8	2000,0	87.905			2093,1	104,7	103,8	2,0	1,9
12-Feb	9	2000,0	86.588			2061,5	103,1			
12-Feb	10	2000,0	85.268			2029,9	101,5			
12-Feb	11	2000,0	86.249			2053,4	102,7			
12-Feb	12	2000,0	84.229			2004,9	100,2			
13-Feb	7	2000,0	89.693			2136,0	106,8			
13-Feb	8	2000,0	87.542			2084,4	104,2			
13-Feb	9	2000,0	86.977			2070,8	103,5			
13-Feb	10	2000,0	89.423			2129,5	106,5			
13-Feb	11	2000,0	87.969			2094,6	104,7			
13-Feb	12	2000,0	87.203			2076,3	103,8			
11-Feb	13	4000,0	169.368			4046,6	101,2			
11-Feb	14	4000,0	169.332			4045,8	101,1			
11-Feb	15	4000,0	169.774			4056,4	101,4			
11-Feb	16	4000,0	168.662			4029,7	100,7			
11-Feb	17	4000,0	168.794			4032,9	100,8			
11-Feb	18	4000,0	159.276			3804,6	95,1			
12-Feb	13	4000,0	167.871			4010,7	100,3			
12-Feb	14	4000,0	168.647			4029,3	100,7	101,8	3,3	3,2
12-Feb	15	4000,0	167.598			4004,2	100,1			
12-Feb	16	4000,0	166.986			3989,5	99,7			
12-Feb	17	4000,0	166.375			3974,9	99,4			
12-Feb	18	4000,0	164.330			3925,8	98,1			
13-Feb	13	4000,0	179.414			4287,5	107,2			
13-Feb	14	4000,0	179.480			4289,1	107,2			
13-Feb	15	4000,0	177.220			4234,9	105,9			
13-Feb	16	4000,0	178.420			4263,7	106,6			
13-Feb	17	4000,0	174.746			4175,6	104,4			
13-Feb	18	4000,0	172.563			44123,3	103,1			

Los cromatogramas se pueden observar en los anexos 6.3, 6.4 y 6.5.



6.- Límite de detección y cuantificación:

6.1.- El límite de detección (LD) de Diflubenzuron se presenta en la tabla N°8.

Tabla 8 LD y LC de Diflubenzuron.

Fecha	conc intentada ng/g	area obtenida
11/02/2014	1000,0	44139
11/02/2014	1000,0	45651
11/02/2014	1000,0	45626
11/02/2014	1000,0	45683
11/02/2014	1000,0	45963
11/02/2014	1000,0	49834
12/02/2014	1000,0	45259
12/02/2014	1000,0	44140
12/02/2014	1000,0	45757
12/02/2014	1000,0	45544
12/02/2014	1000,0	46018
12/02/2014	1000,0	47216
13/02/2014	1000,0	46388
13/02/2014	1000,0	46868
13/02/2014	1000,0	46328
13/02/2014	1000,0	48056
13/02/2014	1000,0	44939
13/02/2014	1000,0	46777
	DS	1350,027
	pendiente	83
	intercepto	623
	recuperación	1,000
	LD	91,9
	LC	308,8

6.1.1.- Verificación del Límite de detección: Se verifica el Límite de detección y cuantificación de Diflubenzuron, realizando análisis de 10 muestras blanco, fortificadas a 480 ppb del analito. Los resultados se presentan en la tabla N° 9.

Los cromatogramas se pueden ver en el anexo 6.6.



Tabla 9 Verificación del LD y LC de Diflubenzuron

Nº for	conc intentada ng/g	área	pendiente	intercepto	Recuperación	conc obtenida ng/g
1	480,0	21.393	83	623	1,00	498,1
2	480,0	18.149				420,3
3	480,0	19.225				446,1
4	480,0	19.359				449,3
5	480,0	20.696				481,4
6	480,0	22.814				532,2
7	480,0	19.341				448,9
8	480,0	20.321				472,4
9	480,0	22.140				516,0
10	480,0	20.499				476,6
prom						474,1
ds						34,5
cv						7,3

6.2.-El límite de cuantificación (LC) de Diflubenzuron se presenta en la tabla N° 8.

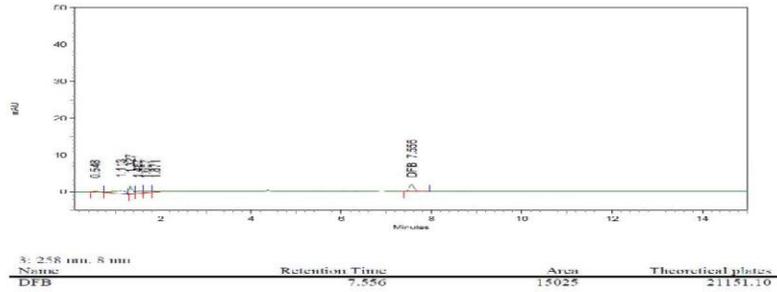
7.- Robustez:

El coeficiente de variación total de la recuperación (CV% total) de 4.0%, da una indicación de la robustez del método.

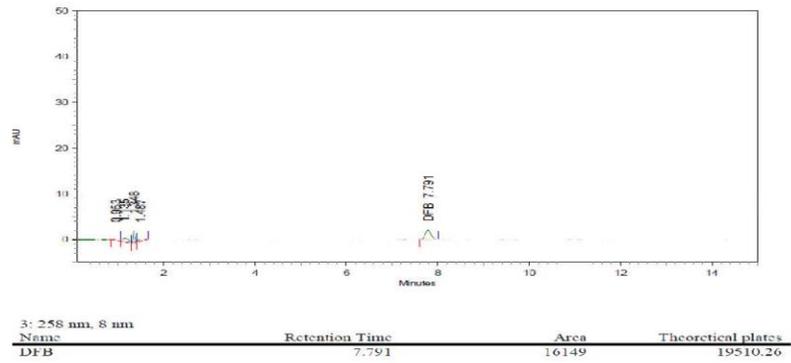


Cromatogramas de Curva de calibraci3n est3ndar de Diflubenzur3n

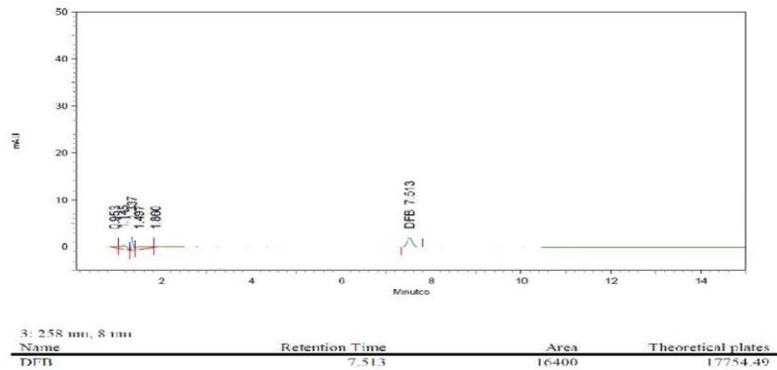
Est3ndar Diflubenzur3n (192 ppb) 11-2-2014



Est3ndar Diflubenzur3n (192 ppb) 12-2-2014

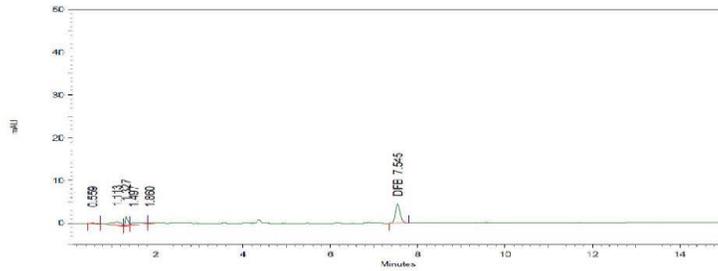


Est3ndar Diflubenzur3n (192 ppb) 13-2-2014



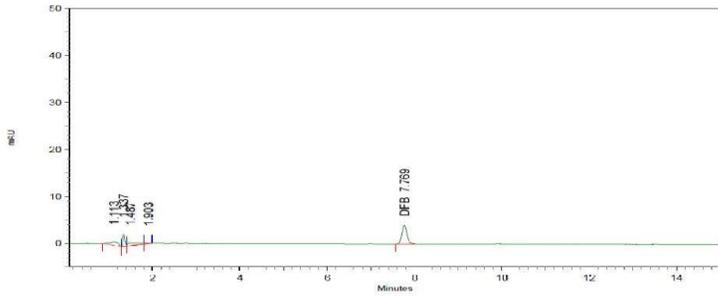


Est3andar Diflubenzur3n (384 ppb) 11-2-2014



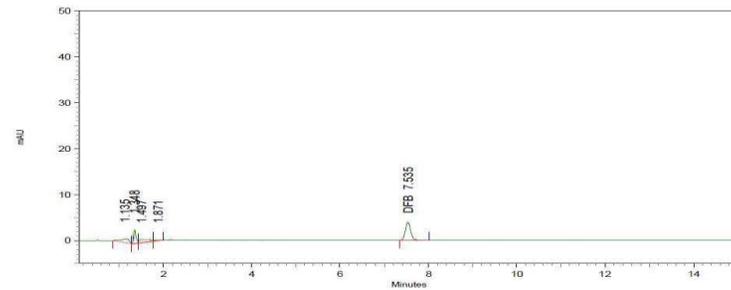
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.545	32692	21973.40

Est3andar Diflubenzur3n (384 ppb) 12-2-2014



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.769	32507	20177.54

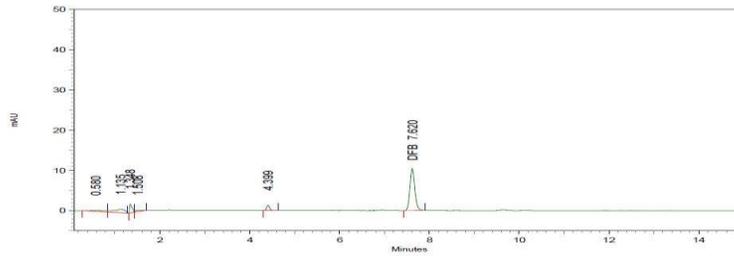
Est3andar Diflubenzur3n (384 ppb) 13-2-2014



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.535	32898	17575.17

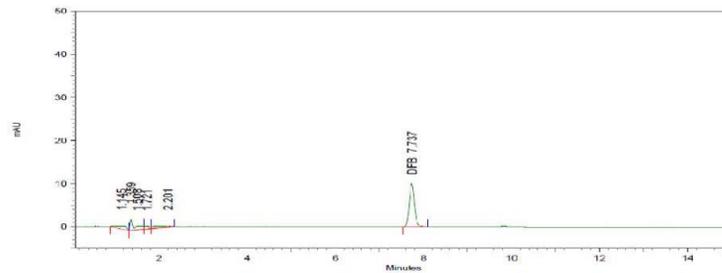


Estándar Diflubenzurón (960 ppb) 11-2-2014



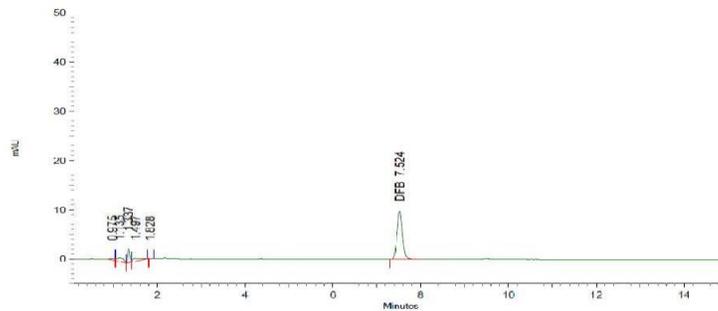
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.620	79087	22064.70

Estándar Diflubenzurón (960 ppb) 12-2-2014



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.737	82008	20455.01

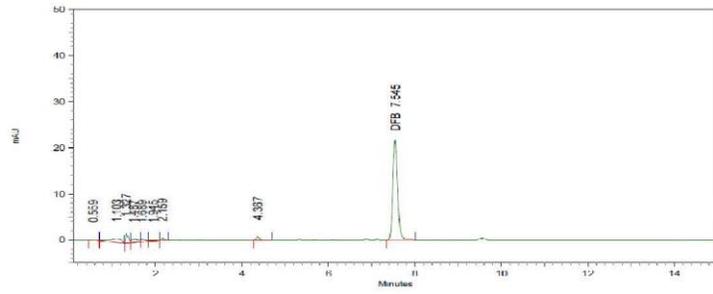
Estándar Diflubenzurón (960 ppb) 13-2-2014



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.524	82867	17020.69

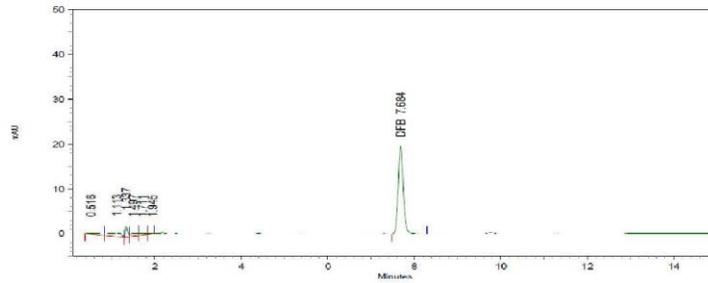


Estándar Diflubenzurón (1920 ppb) 11-2-2014



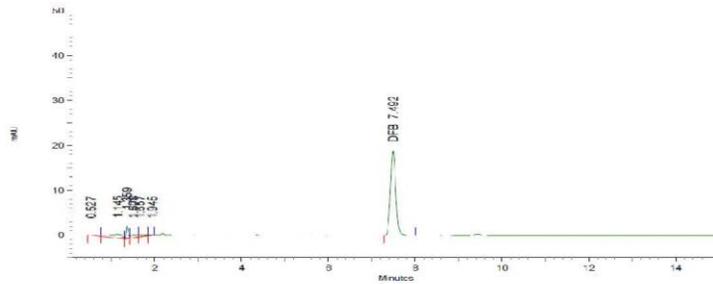
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.545	164527	21734.28

Estándar Diflubenzurón (1920 ppb) 12-2-2014



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.684	139469	19370.08

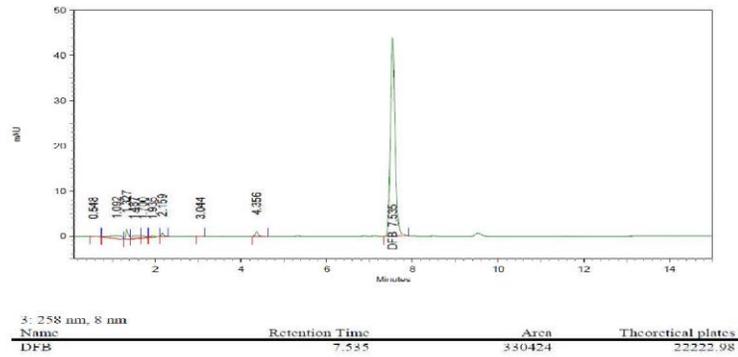
Estándar Diflubenzurón (1920 ppb) 13-2-2014



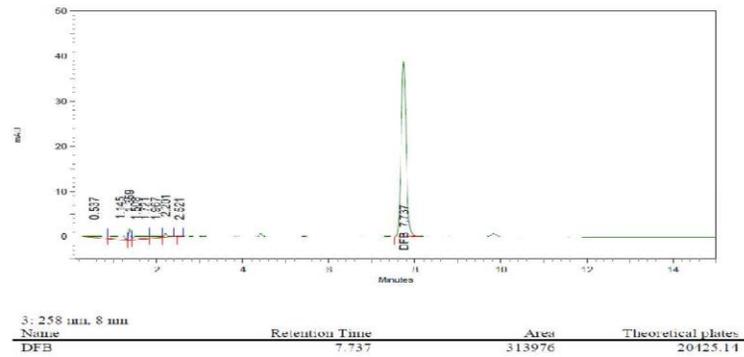
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.492	159610	17765.24



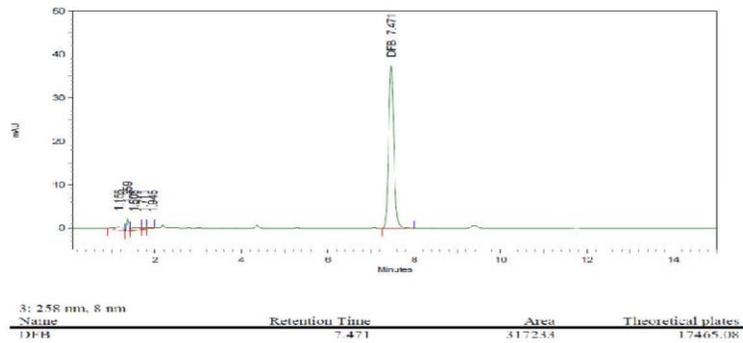
Est3ndar Diflubenzur3n (3840 ppb) 11-2-2014



Est3ndar Diflubenzur3n (3840 ppb) 12-2-2014



Est3ndar Diflubenzur3n (3840 ppb) 13-2-2014

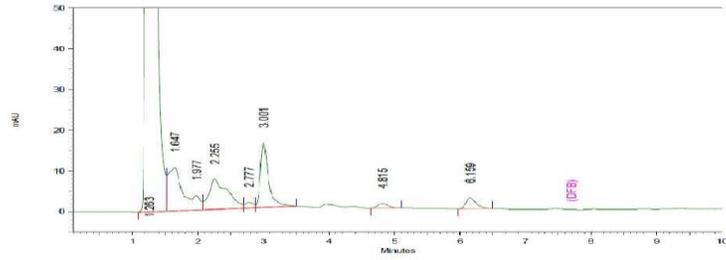






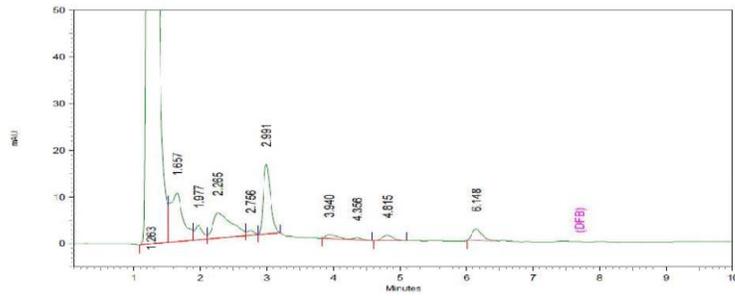
Cromatogramas de Muestras blanco de Diflubenzur3n

Blanco 1



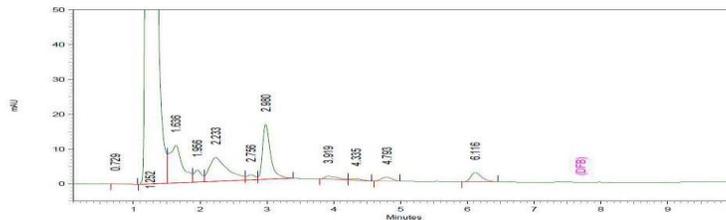
3: 258 nm, 8 nm
Name Retention Time Area Theoretical plates

Blanco 2



3: 258 nm, 8 nm
Name Retention Time Area Theoretical plates

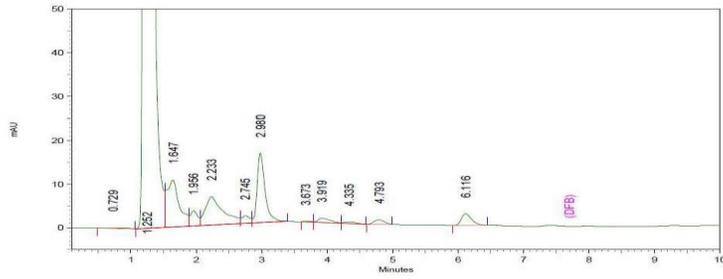
Blanco 3



3: 258 nm, 8 nm
Name Retention Time Area Theoretical plates

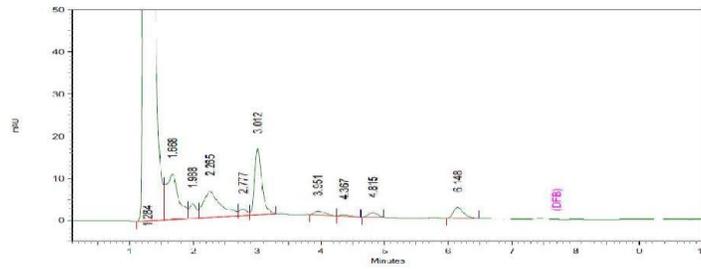


Blanco 4



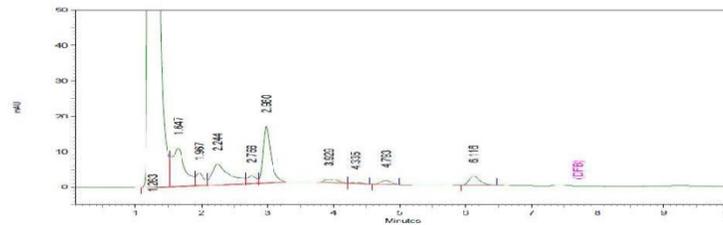
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
------	----------------	------	--------------------

Blanco 5



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
------	----------------	------	--------------------

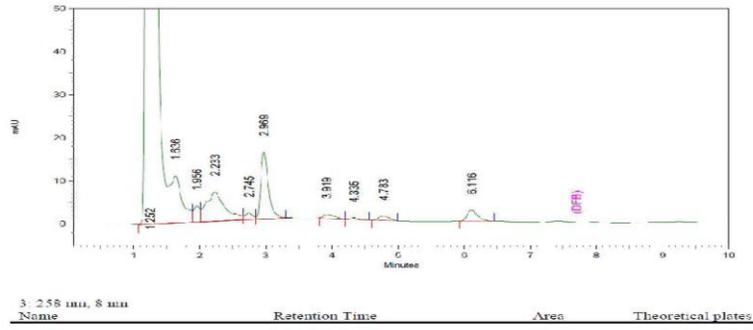
Blanco 6



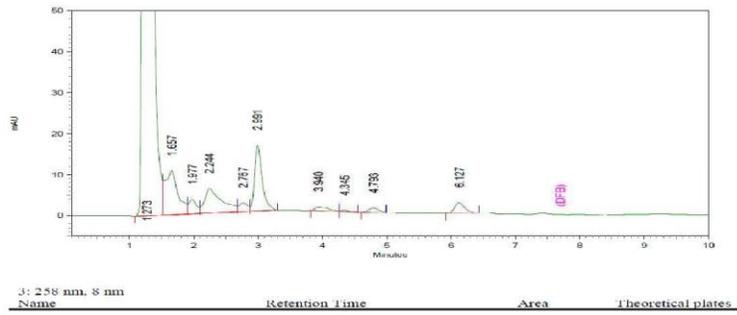
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
------	----------------	------	--------------------



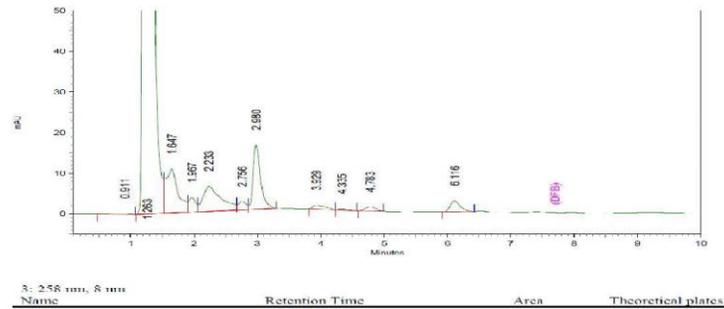
Blanco 7



Blanco 8

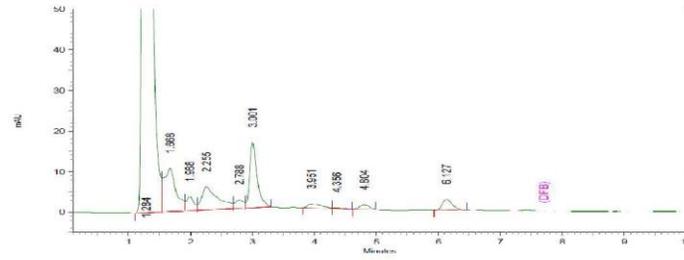


Blanco 9





Blanco 10

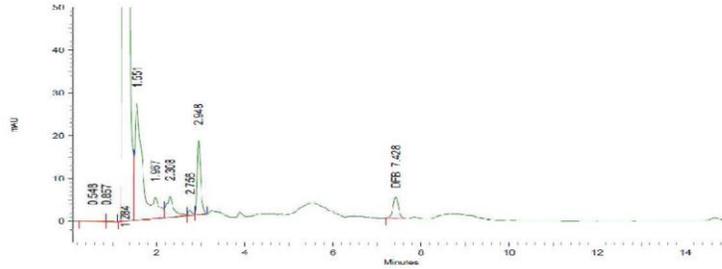


Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
------	----------------	------	--------------------



Cromatogramas de Fortificados de Diflubenzur3n 11-2-2014

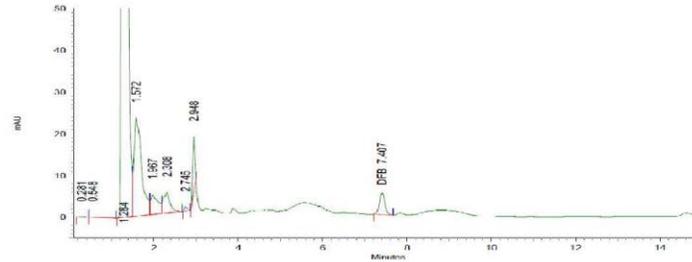
Fortificado 1 Diflubenzur3n 11-2-2014



3: 258 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.428	44139	16235.60

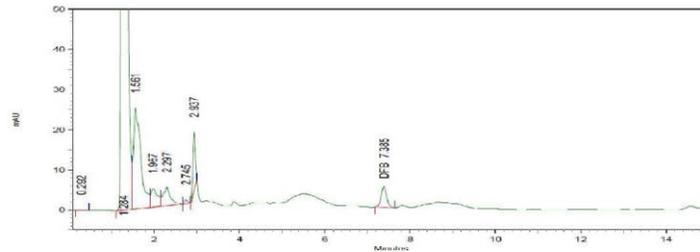
Fortificado 2 Diflubenzur3n 11-2-2014



3: 258 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.407	45651	15781.76

Fortificado 3 Diflubenzur3n 11-2-2014

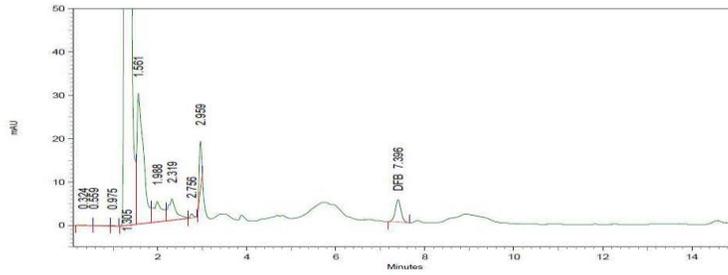


3: 258 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.385	45626	15525.40

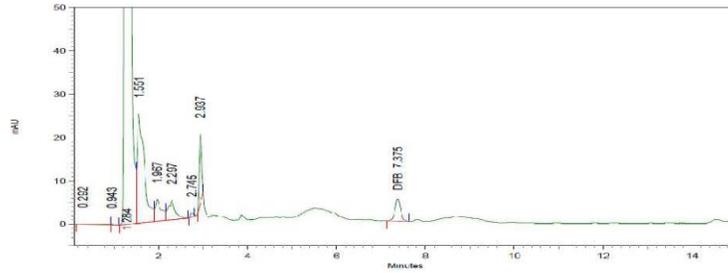


Fortificado 4 Diflubenzurón 11-2-2014



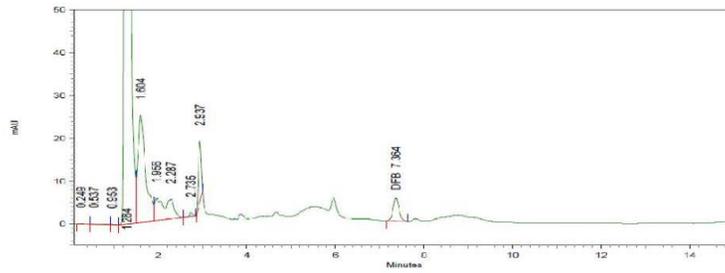
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.396	45683	15754.48

Fortificado 5 Diflubenzurón 11-2-2014



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.375	45765	16121.60

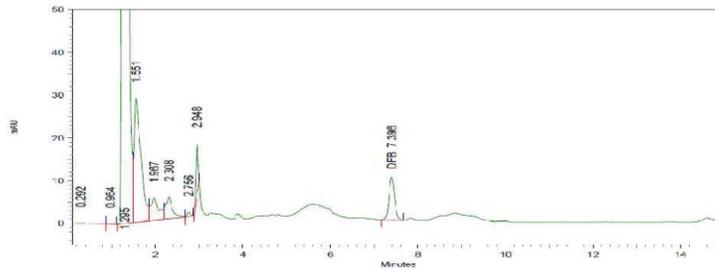
Fortificado 6 Diflubenzurón 11-2-2014



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.384	49834	13778.52

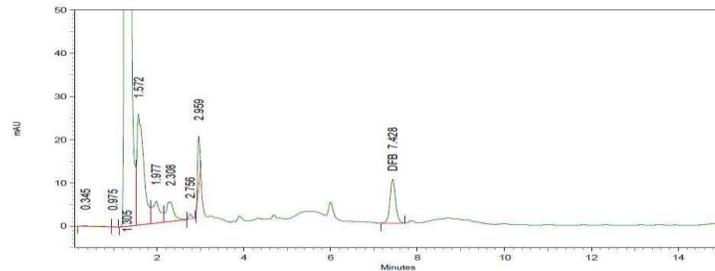


Fortificado 7 Diflubenzurón 11-2-2014



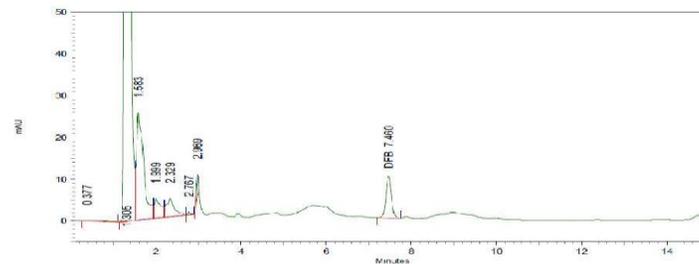
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.396	87356	16152.43

Fortificado 8 Diflubenzurón 11-2-2014



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.428	90455	15808.85

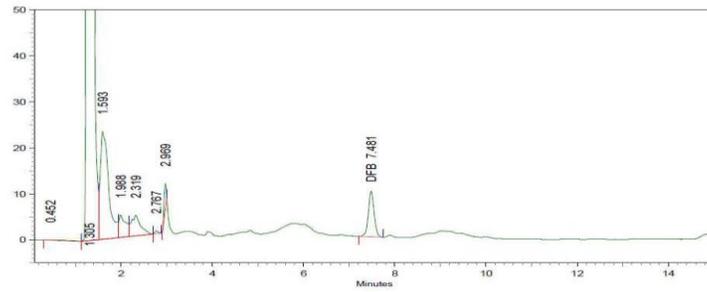
Fortificado 9 Diflubenzurón 11-2-2014



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.400	87413	16361.17

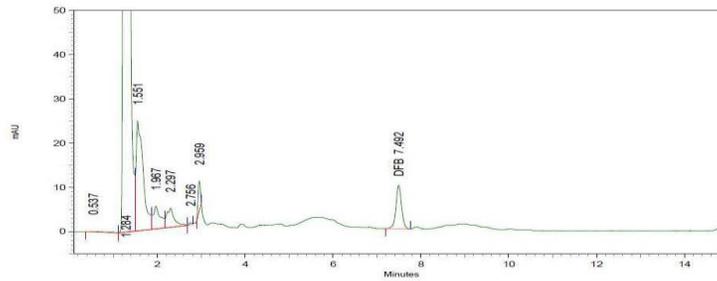


Fortificado 10 Diflubenzurón 11-2-2014



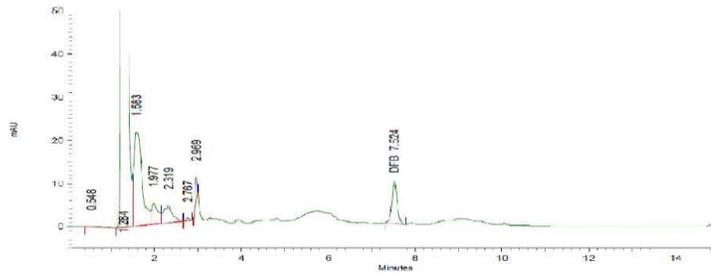
3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.481	87827	16407.34

Fortificado 11 Diflubenzurón 11-2-2014



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.492	87406	16499.54

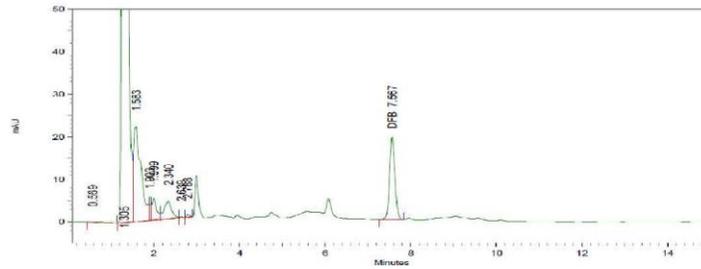
Fortificado 12 Diflubenzurón 11-2-2014



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.524	84055	16836.81

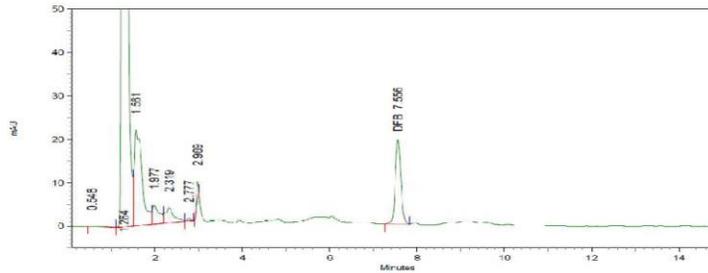


Fortificado 13 Diflubenzur3n 11-2-2014



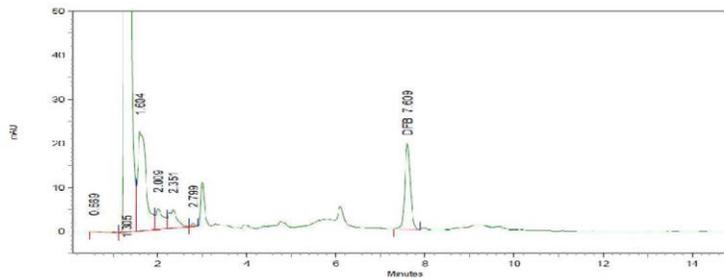
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.567	169368	16734.04

Fortificado 14 Diflubenzur3n 11-2-2014



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.556	169332	17103.58

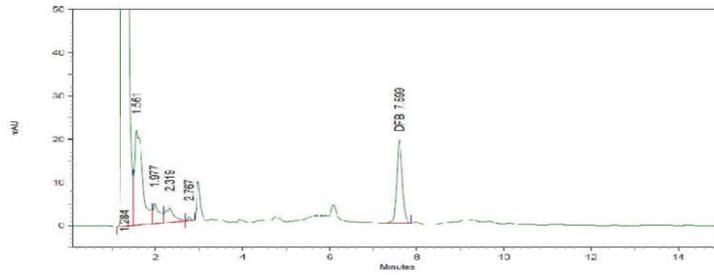
Fortificado 15 Diflubenzur3n 11-2-2014



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.609	169774	16888.39

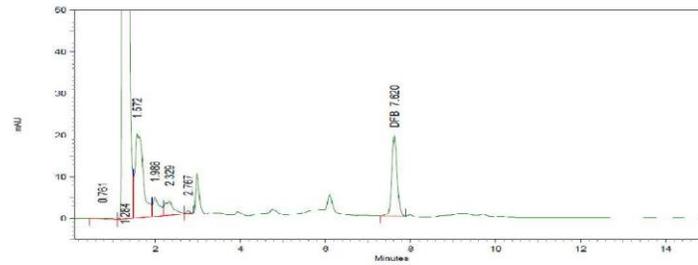


Fortificado 16 Diflubenzur3n 11-2-2014



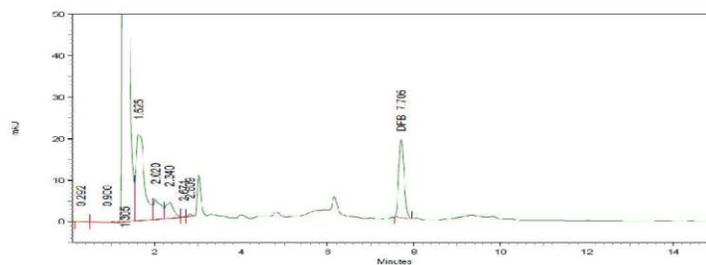
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.599	168662	17017.77

Fortificado 17 Diflubenzur3n 11-2-2014



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.620	168791	17012.61

Fortificado 18 Diflubenzur3n 11-2-2014

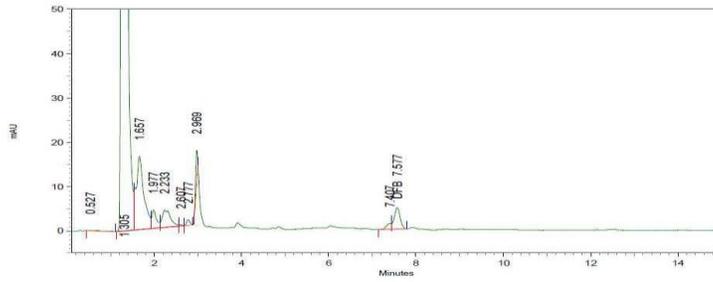


Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.705	159276	17610.53



Cromatogramas de Fortificados de Diflubenzur3n 12-2-2014

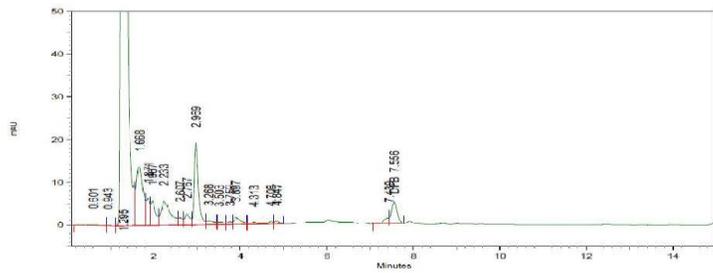
Fortificado 1 Diflubenzur3n 12-2-2014



3: 258 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.577	45259	13800.85

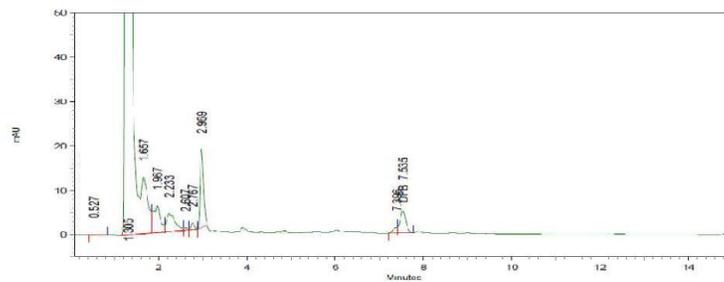
Fortificado 2 Diflubenzur3n 12-2-2014



3: 258 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.556	44140	14445.76

Fortificado 3 Diflubenzur3n 12-2-2014

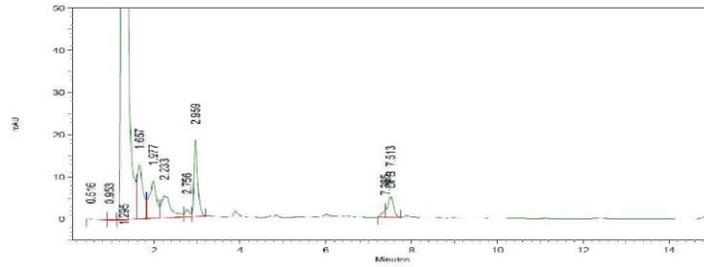


3: 258 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.535	45757	13817.38

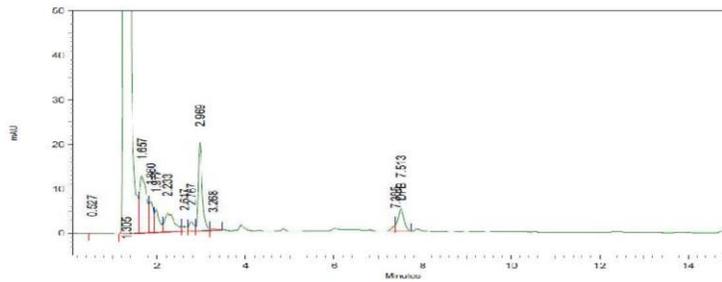


Fortificado 4 Diflubenzur3n 12-2-2014



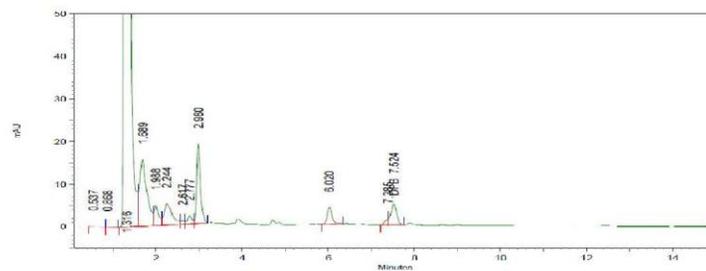
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.513	45544	13242.27

Fortificado 5 Diflubenzur3n 12-2-2014



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.513	16018	13353.21

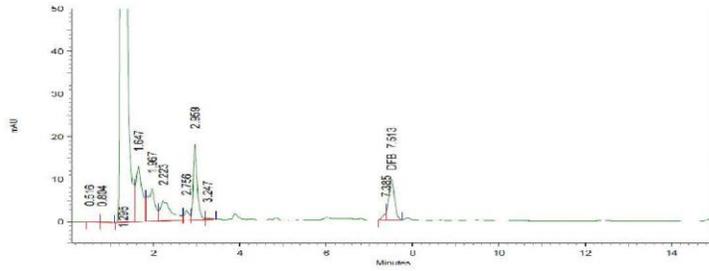
Fortificado 6 Diflubenzur3n 12-2-2014



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.524	47216	12995.35

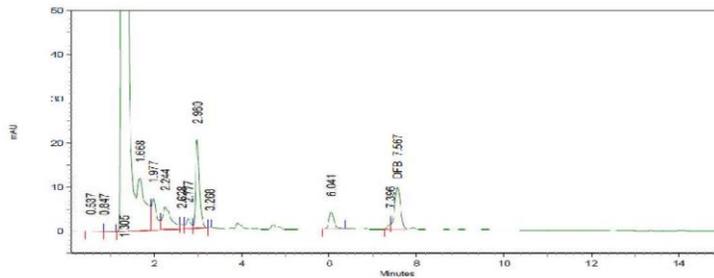


Fortificado 7 Diflubenzurón 12-2-2014



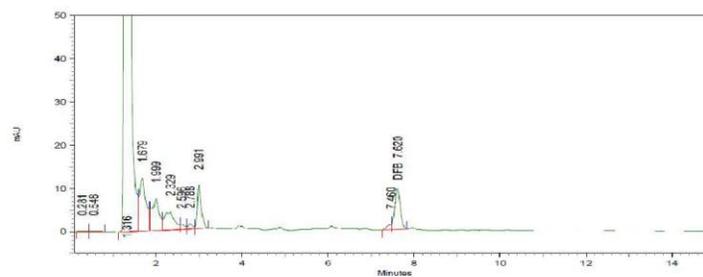
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.513	86550	14533.51

Fortificado 8 Diflubenzurón 12-2-2014



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.567	87905	14774.61

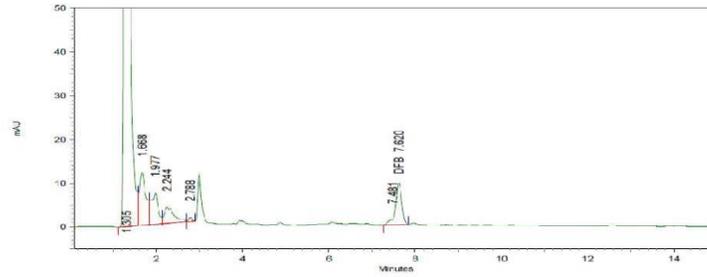
Fortificado 9 Diflubenzurón 12-2-2014



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.620	86588	14816.70

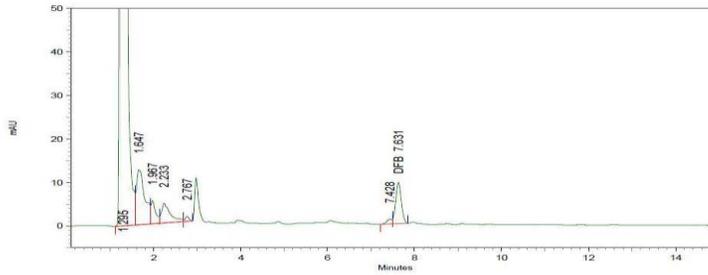


Fortificado 10 Diflubenzur3n 12-2-2014



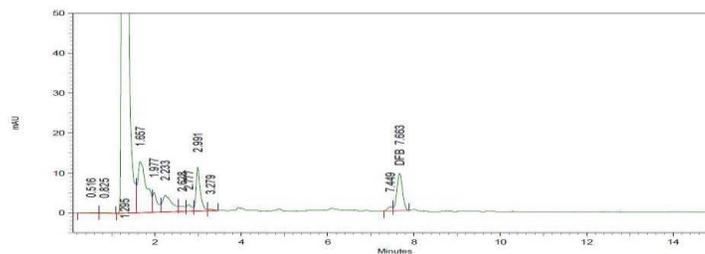
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.620	85268	15553.28

Fortificado 11 Diflubenzur3n 12-2-2014



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.631	86249	15116.56

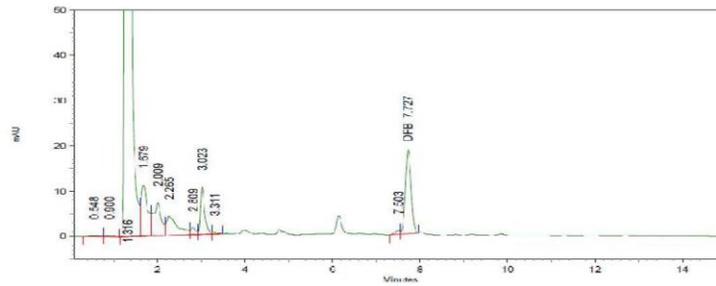
Fortificado 12 Diflubenzur3n 12-2-2014



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.663	84229	15207.07

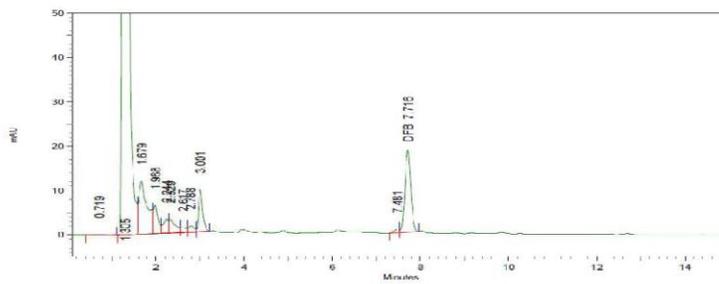


Fortificado 13 Diflubenzur3n 12-2-2014



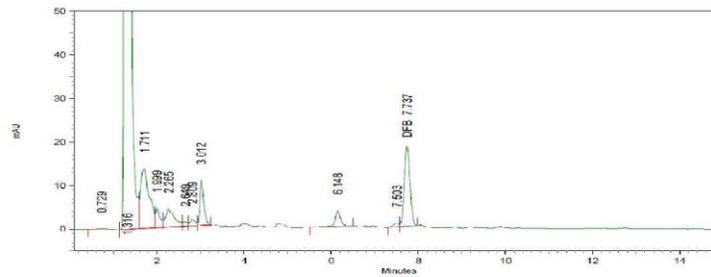
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.727	167871	15470.32

Fortificado 14 Diflubenzur3n 12-2-2014



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.716	168647	15598.17

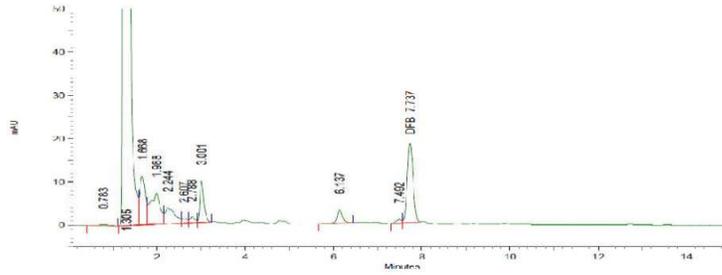
Fortificado 15 Diflubenzur3n 12-2-2014



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFD	7.737	167598	15451.20

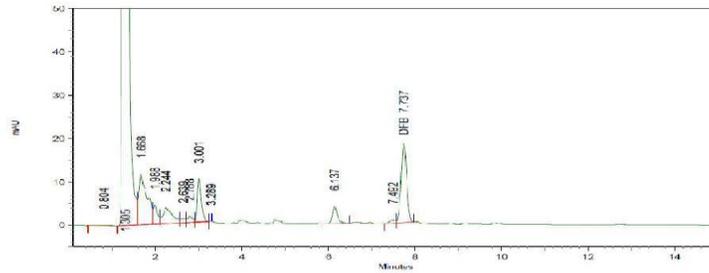


Fortificado 16 Diflubenzur3n 12-2-2014



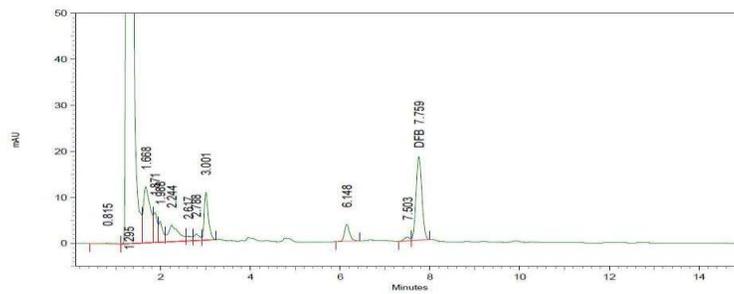
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.737	163986	15812.91

Fortificado 17 Diflubenzur3n 12-2-2014



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.737	166375	15921.23

Fortificado 18 Diflubenzur3n 12-2-2014

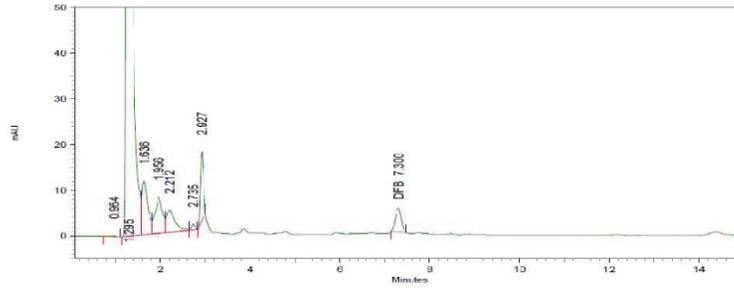


Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.759	164330	15843.33



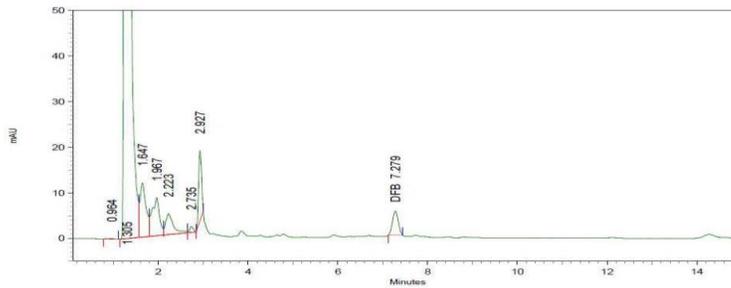
Cromatogramas de Fortificados de Diflubenzurón 13-2-2014

Fortificado 1 Diflubenzurón 13-2-2014



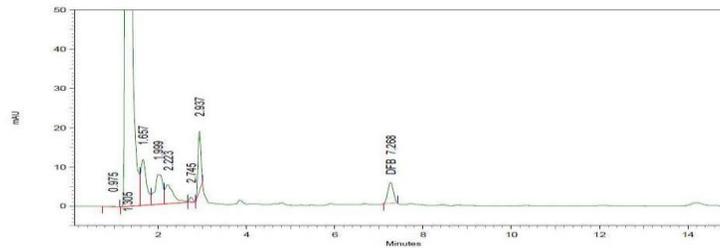
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.300	46388	13109.54

Fortificado 2 Diflubenzurón 13-2-2014



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.279	46868	13538.48

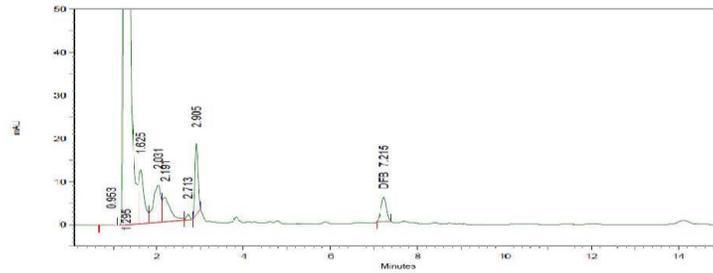
Fortificado 3 Diflubenzurón 13-2-2014



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.268	46328	14453.27

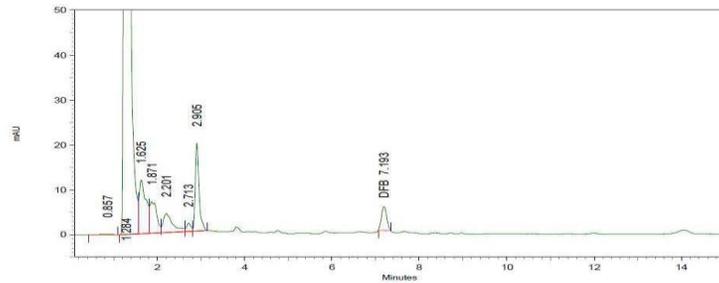


Fortificado 4 Diflubenzurón 13-2-2014



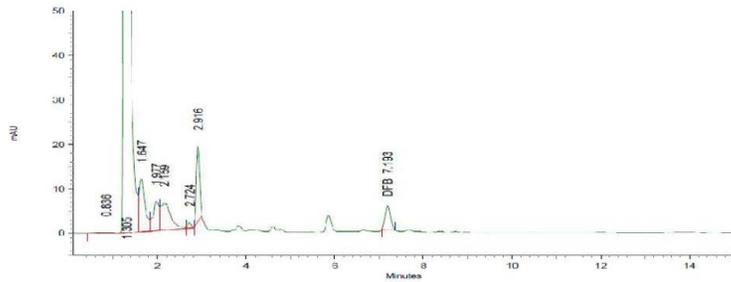
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.215	48056	13974.19

Fortificado 5 Diflubenzurón 13-2-2014



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.193	44939	14599.20

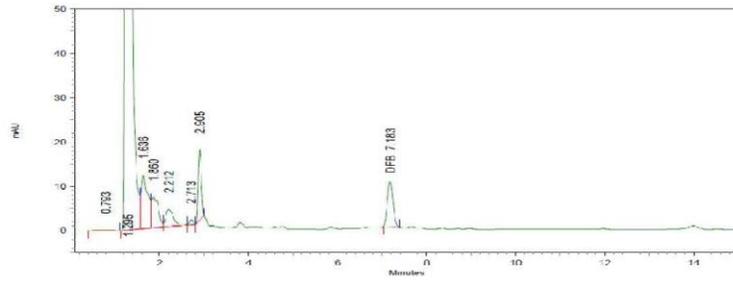
Fortificado 6 Diflubenzurón 13-2-2014



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.193	46777	14268.54

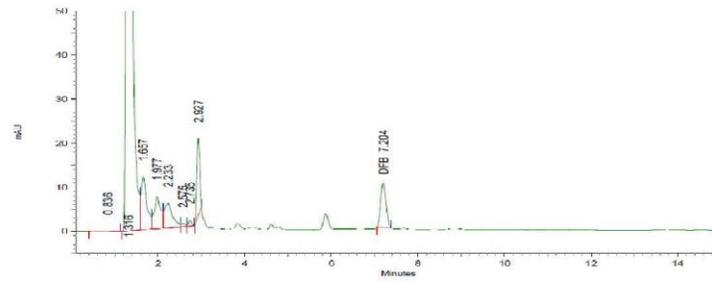


Fortificado 7 Diflubenzur3n 13-2-2014



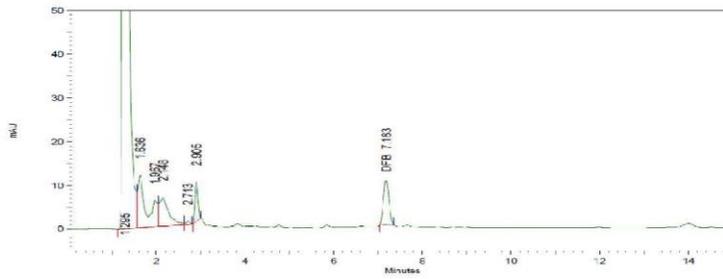
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.183	89693	13996.92

Fortificado 8 Diflubenzur3n 13-2-2014



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.204	87512	14325.83

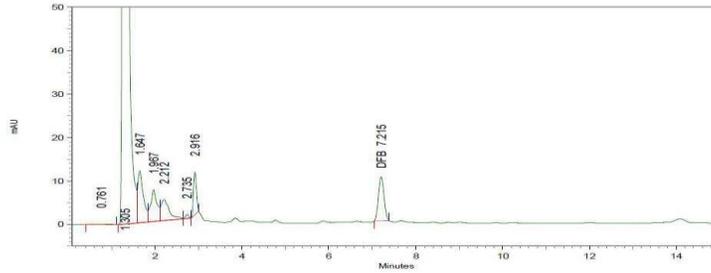
Fortificado 9 Diflubenzur3n 13-2-2014



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.183	86977	14394.94

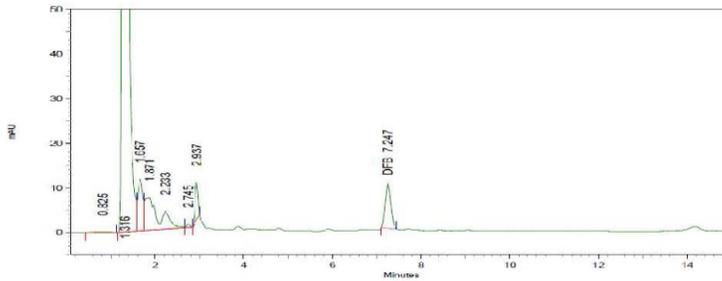


Fortificado 10 Diflubenzur3n 13-2-2014



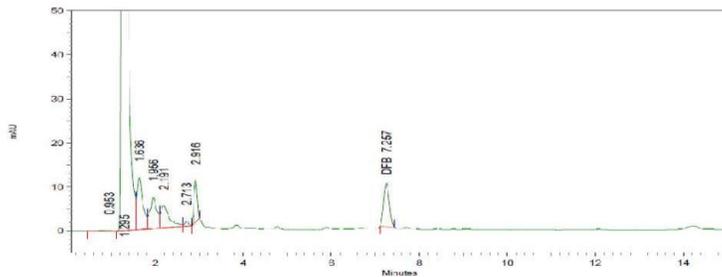
3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.215	89423	13995.88

Fortificado 11 Diflubenzur3n 13-2-2014



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.247	87969	13864.86

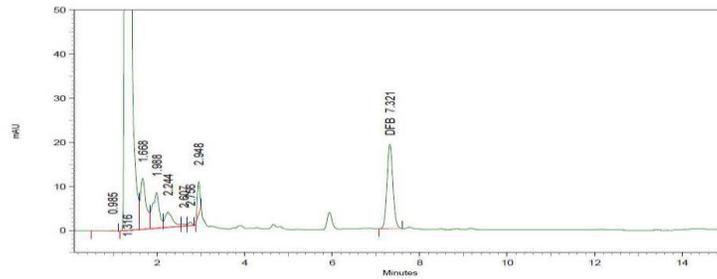
Fortificado 12 Diflubenzur3n 13-2-2014



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.257	87203	13972.60



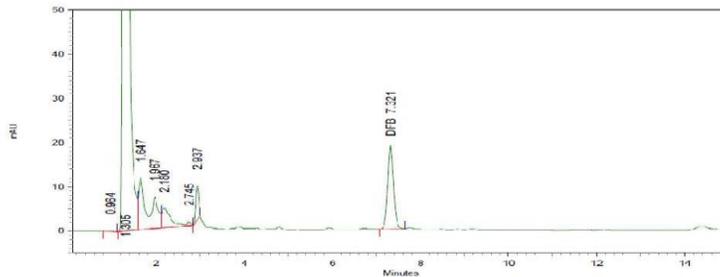
Fortificado 13 Diflubenzurón 13-2-2014



3: 258 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.321	179414	13479.89

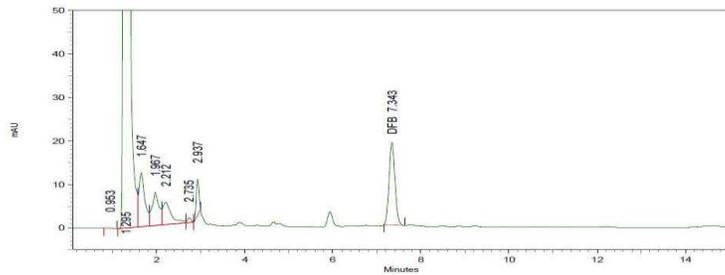
Fortificado 14 Diflubenzurón 13-2-2014



3: 258 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.321	179480	13491.21

Fortificado 15 Diflubenzurón 13-2-2014

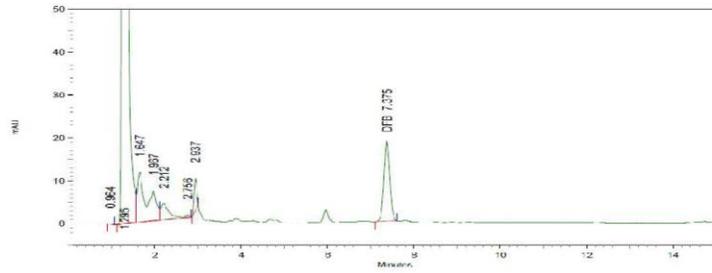


3: 258 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.343	177220	13509.76

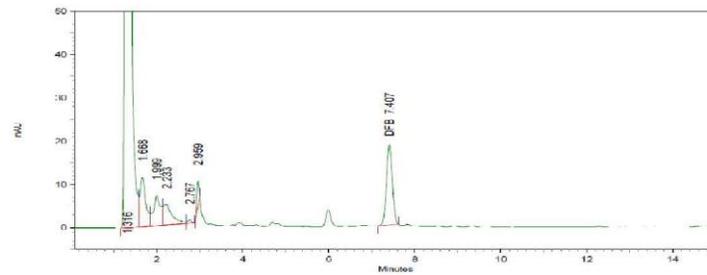


Fortificado 16 Diflubenzurón 13-2-2014



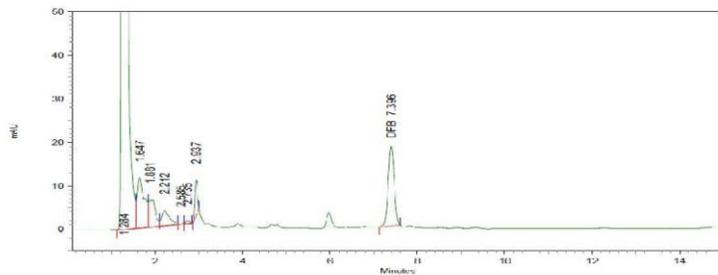
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.375	178420	13242.24

Fortificado 17 Diflubenzurón 13-2-2014



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.407	174746	13192.31

Fortificado 18 Diflubenzurón 13-2-2014

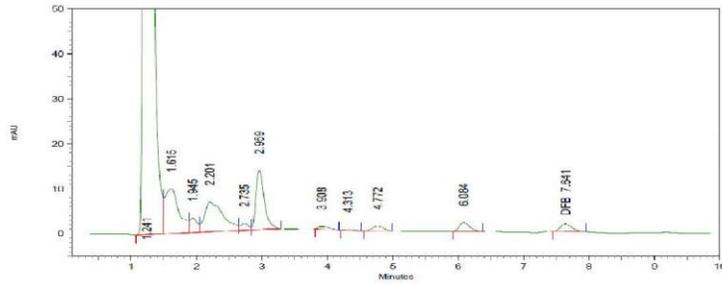


Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.396	172563	13149.82



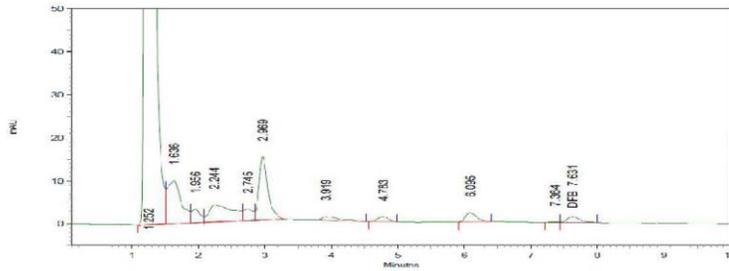
Cromatogramas de Fortificados de Diflubenzur3n 500 ppb

Fortificado 1 Diflubenzur3n15-4-2014



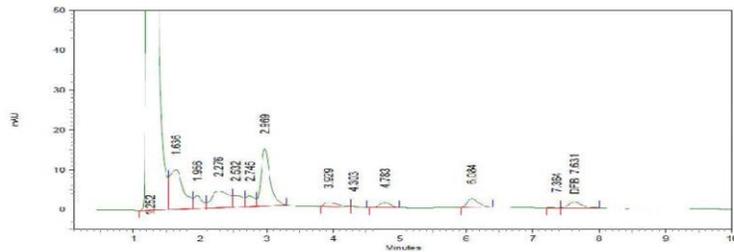
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.641	21393	8014.00

Fortificado 2 Diflubenzur3n15-4-2014



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.631	18149	7801.25

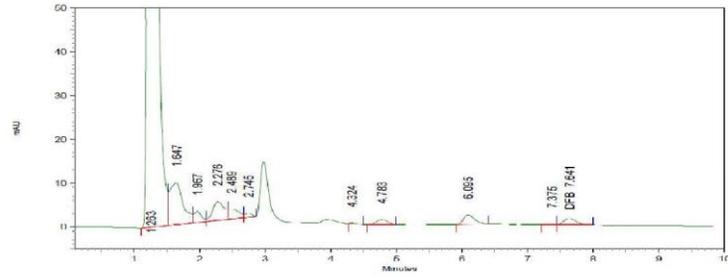
Fortificado 3 Diflubenzur3n15-4-2014



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.631	19225	7554.67

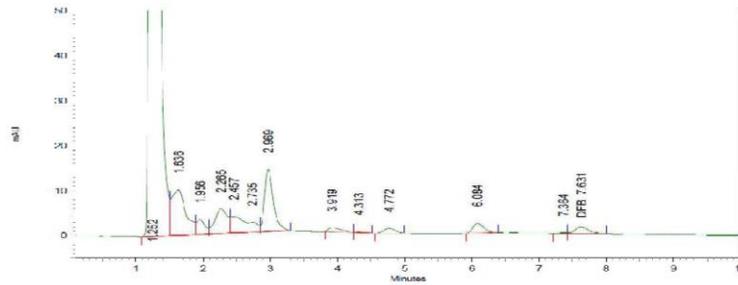


Fortificado 4 Diflubenzurón15-4-2014



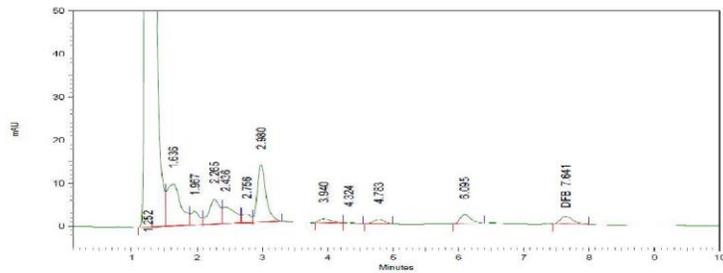
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.641	19359	7740.01

Fortificado 5 Diflubenzurón15-4-2014



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.631	20596	7508.21

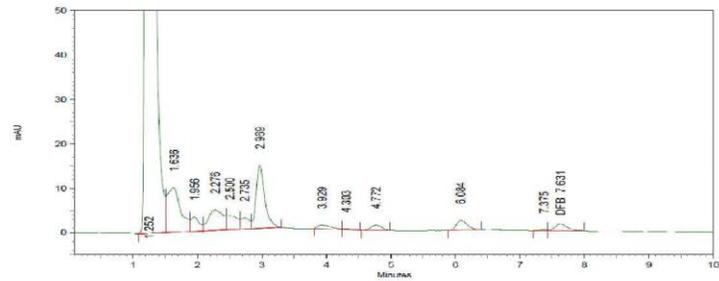
Fortificado 6 Diflubenzurón15-4-2014



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.641	22814	7817.05

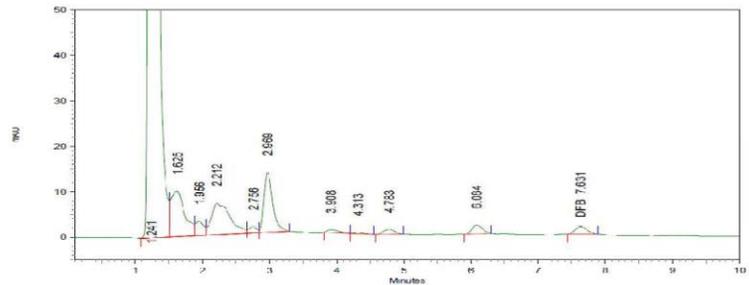


Fortificado 7 Diflubenzurón15-4-2014



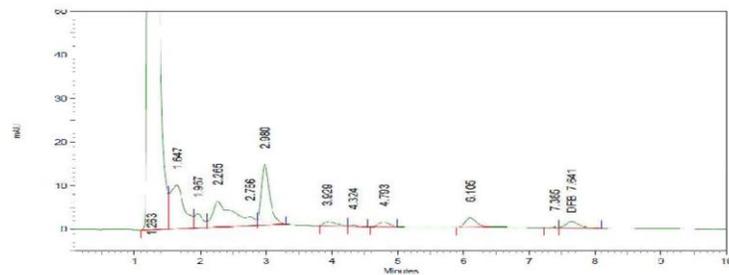
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.631	19341	7654.48

Fortificado 8 Diflubenzurón15-4-2014



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.631	20321	8258.08

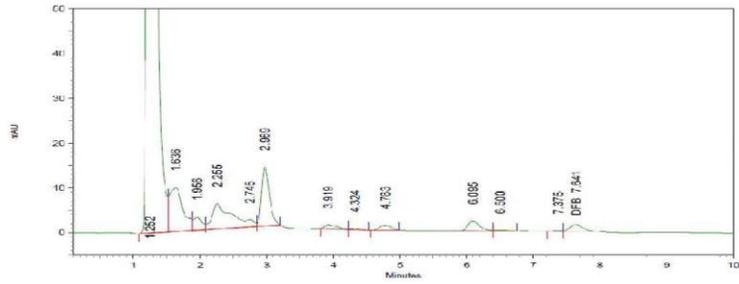
Fortificado 9 Diflubenzurón15-4-2014



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.641	22140	7209.02



Fortificado 10 Diflubenzurón 15-4-2014



3: 258 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.641	20499	7581.56

A N E X O 7

Resultados experimentales de validación de Cipermetrina – Deltametrina.



Resultados experimentales de validaci3n de Cipermetrina-Deltametrina en choritos

Contenido

1.- Especificidad	03
2.- Linealidad	05
3- Recuperaci3n de Cipermetrina-Deltametrina	08
4.- Exactitud	11
5.- Precisi3n	11
5.1.- Repetibilidad de Cipermetrina-Deltametrina	11
5.2.- Precisi3n intermedia de Cipermetrina-Deltametrina	18
6.- L3mite de detecci3n y cuantificaci3n	21
6.1.- L3mite de detecci3n de Cipermetrina-Deltametrina	21
6.1.1.- Verificaci3n del l3mite de detecci3n	21
6.2.- L3mite de cuantificaci3n de Cipermetrina-Deltametrina	21
7.- Robustez	21





1.- Especificidad:

1.1 Especificidad de Deltametrina:

A partir de los datos de la curva de calibración, se determina el tiempo de retención del analito, la desviación estándar y el coeficiente de variación de éste. Los resultados se indican en la tabla N° 1.

Tabla N° 1: Tiempos de retención de Deltametrina

Fecha	conc. ng/ml	T R
13/05/2014	30	22
14/05/2014	30	22,2
19/05/2014	30	22,1
13/05/2014	60	21,9
14/05/2014	60	22,2
19/05/2014	60	22
13/05/2014	120	21,9
14/05/2014	120	22,3
19/05/2014	120	22,1
13/05/2014	210	22
14/05/2014	210	22,5
19/05/2014	210	22,2
13/05/2014	300	21,2
14/05/2014	300	22,5
19/05/2014	300	22,1
	Promedio	22,1
	D.S.	0,3
	% C.V.	1,4

Los cromatogramas se pueden observar en el Anexo 16.1.

Al realizar la extracción de 10 muestras blanco, se demuestra que no hay interferentes de importancia en los tiempos de retención. Los cromatogramas de las muestras blanco se pueden observar en el Anexo 16.2

1.2 Especificidad de Cipermetrina:

A partir de los datos de la curva de calibración, se determina el tiempo de retención de los 4 isómeros del analito, la desviación estándar y el coeficiente de variación de éstos. Los resultados se indican en las tablas N° 2, 3, 4 y 5.

Los cromatogramas se pueden observar en el Anexo 16.1.



Al realizar la extracción de 10 muestras blanco, se demuestra que no hay interferentes de importancia en los tiempos de retención. Los cromatogramas de las muestras blanco se pueden observar en el Anexo 16.2.

Tabla N° 2: Tiempos de retención de isómero 1 de Cipermetrina

Fecha	conc. ng/ml	T R
13/05/2014	52	18,95
14/05/2014	52	19,25
19/05/2014	52	19,17
13/05/2014	104	18,98
14/05/2014	104	19,22
19/05/2014	104	19,1
13/05/2014	208	19,04
14/05/2014	208	19,32
19/05/2014	208	19,11
13/05/2014	364	19,04
14/05/2014	364	19,46
19/05/2014	364	19,18
13/05/2014	520	19,03
14/05/2014	520	19,45
19/05/2014	520	19,1
Promedio		19,2
D.S.		0,2
% C.V.		0,8

Tabla N° 3: Tiempos de retención de isómero 2 de Cipermetrina

Fecha	conc. ng/ml	T R
13/05/2014	52	19,35
14/05/2014	52	19,61
19/05/2014	52	19,52
13/05/2014	104	19,38
14/05/2014	104	19,6
19/05/2014	104	19,46
13/05/2014	208	19,42
14/05/2014	208	19,72
19/05/2014	208	19,48
13/05/2014	364	19,42
14/05/2014	364	19,84
19/05/2014	364	19,58
13/05/2014	520	19,41
14/05/2014	520	19,83
19/05/2014	520	19,49
Promedio		19,5
D.S.		0,2
% C.V.		0,8



Tabla N° 4: Tiempos de retención isómero 3 de Cipermetrina

Fecha	conc. ng/ml	T R
13/05/2014	52	20,37
14/05/2014	52	20,69
19/05/2014	52	20,54
13/05/2014	104	20,41
14/05/2014	104	20,61
19/05/2014	104	20,48
13/05/2014	208	20,45
14/05/2014	208	20,74
19/05/2014	208	20,5
13/05/2014	364	20,45
14/05/2014	364	20,88
19/05/2014	364	20,59
13/05/2014	520	20,42
14/05/2014	520	20,89
19/05/2014	520	20,51
Promedio		20,6
D.S.		0,2
% C.V.		0,8

Tabla N° 5: Tiempos de retención de isómero 4 de Cipermetrina

Fecha	conc. ng/ml	T R
13/05/2014	52	21
14/05/2014	52	21,35
19/05/2014	52	21,25
13/05/2014	104	21,11
14/05/2014	104	21,33
19/05/2014	104	21,19
13/05/2014	208	21,12
14/05/2014	208	21,46
19/05/2014	208	21,21
13/05/2014	364	21,12
14/05/2014	364	21,6
19/05/2014	364	21,31
13/05/2014	520	21,15
14/05/2014	520	21,59
19/05/2014	520	21,22
Promedio		21,3
D.S.		0,2
% C.V.		0,8

2.- Linealidad:

2.1 Linealidad de Deltametrina:

Se evaluó la linealidad del método desarrollado, confeccionando una curva de calibración de 5 puntos durante 3 días diferentes. Las concentraciones aproximadas del analito fue de 30, 384, 960 y 3840 ng/ml. Los resultados de las áreas obtenidas, las curvas de calibración estándar (con la ecuación de la recta y coeficiente de correlación) y el gráfico de residuales se presentan para el analito en la tabla 6 y figuras 1, 2



Tabla N° 6: áreas de curva de calibración de Deltametrina:

Fecha	conc. ng/ml	área obtenida	área promedio	área D.S.	área % C.V.
13/05/2014	30	5.211	4.364	982	23
14/05/2014	30	3.287			
19/05/2014	30	4.594			
13/05/2014	60	9.234	10.191	903	9
14/05/2014	60	10.311			
19/05/2014	60	11.027			
13/05/2014	120	21.667	22.387	1389	6
14/05/2014	120	21.506			
19/05/2014	120	23.988			
13/05/2014	210	38.852	39.910	2640	7
14/05/2014	210	37.962			
19/05/2014	210	42.915			
13/05/2014	300	58.881	59.026	3428	6
14/05/2014	300	55.672			
19/05/2014	300	62.524			

Figura N° 1

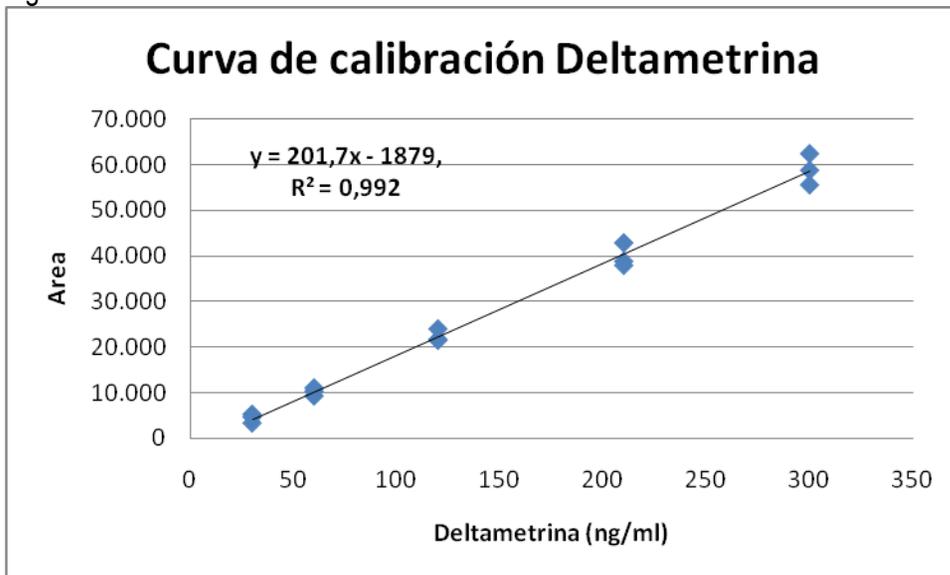
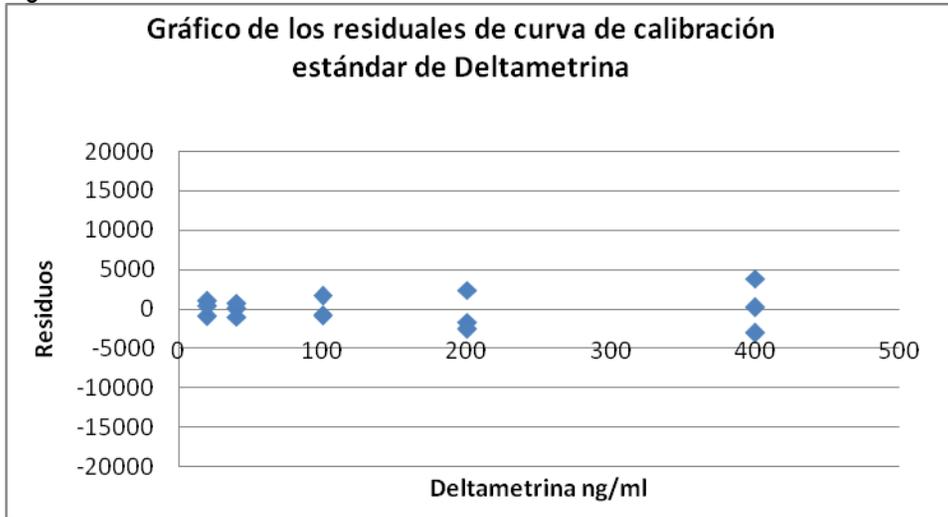




Figura N° 2



Los cromatogramas se pueden observar en Anexo 16.1.

2.2 Linealidad de Cipermetrina

Tabla N° 7: áreas de curva de calibración de Cipermetrina

Fecha	conc. ng/ml	área obtenida	área promedio	área D.S.	área % C.V.
13/05/2014	52	10.691	11.276	560	5
14/05/2014	52	11.807			
19/05/2014	52	11.329			
13/05/2014	104	21.109	21.757	1420	7
14/05/2014	104	20.777			
19/05/2014	104	23.385			
13/05/2014	208	45.732	43.271	3174	7
14/05/2014	208	39.688			
19/05/2014	208	44.392			
13/05/2014	364	77.245	73.243	3568	5
14/05/2014	364	70.396			
19/05/2014	364	72.087			
13/05/2014	520	106.919	106.708	3883	4
14/05/2014	520	102.723			
19/05/2014	520	110.481			



Figura N°3:

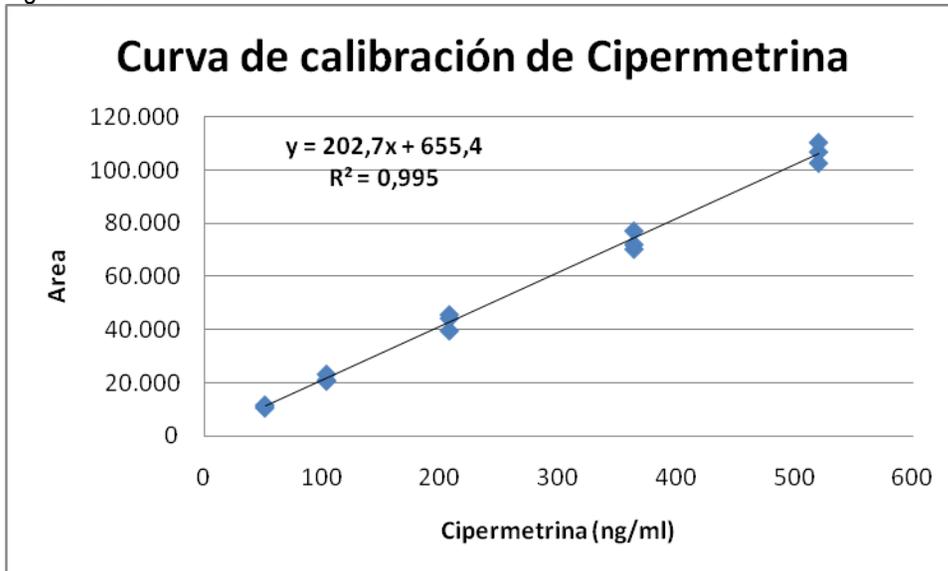
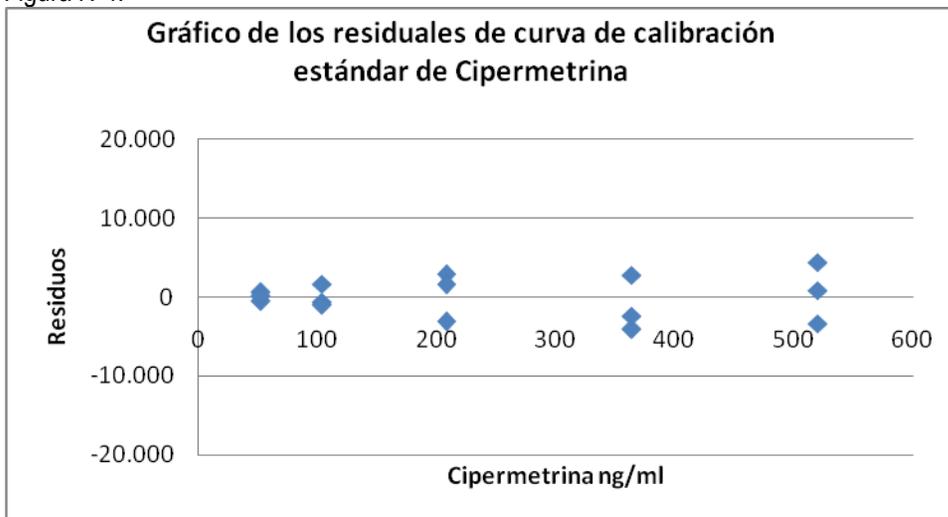


Figura N°4:



Los cromatogramas se pueden observar en Anexo 16.1.

3.- Recuperación:

3.1.- Recuperación de Deltametrina:

Los resultados de recuperación de Deltametrina en los tres días se presentan en la tabla N° 8. Se presenta el valor promedio de recuperación (que se utilizará para el cálculo de las muestras problema), el coeficiente de variación y la desviación estándar para la confección de una carta control de recuperación tipo



Shewhart (con el que se controlarán posteriormente los ensayos, para demostrar que la técnica está bajo control estadístico).

3.2.- Recuperación de Cipermetrina:

Los resultados de recuperación de Cipermetrina en los tres días se presentan en la tabla N° 9. Se presenta el valor promedio de recuperación (que se utilizará para el cálculo de las muestras problema), el coeficiente de variación y la desviación estándar para la confección de una carta control de recuperación tipo Shewhart (con el que se controlarán posteriormente los ensayos, para demostrar que la técnica está bajo control estadístico).

Tabla N°8: Recuperación de Deltametrina

Fecha	Nº for	conc intentada ng/g	conc obtenida ng/g	% rec
13/05/2014	1	60,0	39,7	66,1
	2	60,0	40,4	67,4
	3	60,0	40,7	67,8
	4	60,0	37,4	62,3
	5	60,0	39,7	66,1
	6	60,0	36,5	60,9
	7	120,0	69,0	57,5
	8	120,0	67,0	55,8
	9	120,0	66,3	55,2
	10	120,0	65,7	54,7
	11	120,0	67,0	55,8
	12	120,0	68,1	56,7
	13	240,0	126,4	52,7
	14	240,0	123,2	51,3
	15	240,0	117,6	49,0
	16	240,0	134,0	55,8
	17	240,0	128,3	53,4
	18	240,0	125,5	52,3
14/05/2014	1	60,0	39,1	65,2
	2	60,0	37,5	62,5
	3	60,0	35,5	59,1
	4	60,0	39,1	65,2
	5	60,0	37,2	62,0
	6	60,0	38,1	63,5
	7	120,0	63,2	52,6
	8	120,0	61,5	51,3
	9	120,0	62,0	51,7
	10	120,0	62,9	52,4
	11	120,0	61,0	50,8
	12	120,0	59,4	49,5
	13	240,0	117,4	48,9
	14	240,0	133,6	55,7
	15	240,0	134,0	55,8
	16	240,0	117,1	48,8
	17	240,0	125,3	52,2
	18	240,0	112,7	47,0
	1	60,0	38,1	63,5
	2	60,0	35,3	58,8
	3	60,0	34,9	58,1



15/05/2014	4	60,0	38,1	63,5	
	5	60,0	39,4	65,7	
	6	60,0	37,5	62,5	
	7	120,0	61,1	50,9	
	8	120,0	63,2	52,6	
	9	120,0	62,6	52,2	
	10	120,0	64,4	53,7	
	11	120,0	63,5	52,9	
	12	120,0	68,7	57,2	
	13	240,0	119,3	49,7	
	14	240,0	128,3	53,5	
	15	240,0	121,4	50,6	
	16	240,0	127,7	53,2	
	17	240,0	119,2	49,7	
	18	240,0	131,2	54,7	
	Prom				56,3
	DS				5,7
	CV				10,2
prom + 2DS				67,7	
prom - 2DS				44,8	
prom + 3DS				73,5	
prom - 3DS				39,1	

Los cromatogramas de recuperación, se pueden observar en los anexos 16.3, 16.4 y 16.5.

Tabla N°9: Recuperación de Cipermetrina

Fecha	Nº for	conc intentada ng/g	conc obtenida ng/g	% rec
13/05/2014	1	104,0	48,4	46,5
	2	104,0	50,0	48,1
	3	104,0	41,1	39,5
	4	104,0	45,5	43,8
	5	104,0	49,7	47,8
	6	104,0	47,1	45,3
	7	208,0	103,0	49,5
	8	208,0	91,7	44,1
	9	208,0	116,5	56,0
	10	208,0	86,0	41,4
	11	208,0	99,3	47,8
	12	208,0	98,6	47,4
	13	416,0	193,9	46,6
	14	416,0	181,5	43,6
	15	416,0	204,3	49,1
	16	416,0	163,6	39,3
	17	416,0	184,8	44,4
	18	416,0	173,8	41,8
14/05/2014	1	104,0	48,3	46,5
	2	104,0	52,6	50,6
	3	104,0	49,2	47,3
	4	104,0	50,3	48,3
	5	104,0	43,6	41,9
	6	104,0	56,9	54,7
	7	208,0	105,0	50,5
	8	208,0	103,2	49,6
	9	208,0	98,4	47,3



	10	208,0	100,2	48,2
	11	208,0	85,8	41,2
	12	208,0	91,0	43,7
	13	416,0	173,4	41,7
	14	416,0	185,0	44,5
	15	416,0	161,6	38,9
	16	416,0	174,6	42,0
	17	416,0	172,7	41,5
	18	416,0	178,4	42,9
15/05/2014	1	104,0	50,8	48,9
	2	104,0	52,0	50,0
	3	104,0	49,3	47,4
	4	104,0	49,0	47,2
	5	104,0	49,1	47,2
	6	104,0	45,8	44,0
	7	208,0	93,2	44,8
	8	208,0	81,9	39,4
	9	208,0	94,4	45,4
	10	208,0	82,8	39,8
	11	208,0	93,6	45,0
	12	208,0	97,1	46,7
	13	416,0	172,5	41,5
	14	416,0	190,7	45,8
	15	416,0	150,8	36,3
	16	416,0	171,5	41,2
	17	416,0	173,4	41,7
	18	416,0	164,9	39,6
Prom				45,1
DS				4,0
CV				8,9
prom + 2DS				53,1
prom - 2DS				37,0
prom + 3DS				57,2
prom - 3DS				33,0

Los cromatogramas de recuperación, se pueden observar en los anexos 16.3, 16.4 y 16.5.

4.- Exactitud o veracidad:

No aplica

5.- Precisión:

5.1.- Repetibilidad:

5.1.1.- Repetibilidad de Deltametrina:

Los resultados de recuperación de Deltametrina en los tres días se presentan en las tablas N° 10, 11 y 12. Se presenta el valor promedio de recuperación, la desviación estándar y el coeficiente de variación, de cada nivel de fortificación y del día.

Los cromatogramas de recuperación, se pueden observar en los anexos 6.3, 6.4 y 6.5.



5.1.2.- Repetibilidad de Cipermetrina:

Los resultados de recuperación de Cipermetrina en los tres días se presentan en las tablas N° 13, 14 y 15. Se presenta el valor promedio de recuperación, la desviación estándar y el coeficiente de variación, de cada nivel de fortificación y del día.

Los cromatogramas de recuperación, se pueden observar en los anexos 6.3, 6.4 y 6.5.

Tabla N° 10: Recuperación de Deltametrina 13-05-2014

N° for	conc intentada ng/g	área	pendiente	intercepto	Vol SPE	DIL SPE	conc obtenida ng/g	% rec	prom	ds	cv
1	60,0	11.455	202	-1879	3	1,8	39,7	66,1			
2	60,0	11.718					40,4	67,4			
3	60,0	11.800					40,7	67,8			
4	60,0	10.693					37,4	62,3			
5	60,0	11.455					39,7	66,1			
6	60,0	10.403					36,5	60,9	65,1	2,8	4,4
7	120,0	21.339					69,0	57,5			
8	120,0	20.646					67,0	55,8			
9	120,0	20.402					66,3	55,2			
10	120,0	20.212					65,7	54,7			
11	120,0	20.635					67,0	55,8			
12	120,0	21.019					68,1	56,7	56,0	1,0	1,8
13	240,0	40.629					126,4	52,7			
14	240,0	39.545					123,2	51,3			
15	240,0	37.671					117,6	49,0			
16	240,0	43.171					134,0	55,8			
17	240,0	41.257					128,3	53,4			
18	240,0	40.328					125,5	52,3	52,4	2,3	4,3
							prom	57,8			
							ds	5,9			
							cv	10,1			



Tabla N° 11: Recuperación de Deltametrina 14-05-2014

N° for	conc intentada ng/g	área	pendiente	intercepto	Vol SPE	DIL SPE	conc obtenida ng/g	% rec	prom	ds	cv	
1	60,0	11.274	202	-1879	3	1,8	39,1	65,2				
2	60,0	10.740					37,5	62,5				
3	60,0	10.053					35,5	59,1				
4	60,0	11.279					39,1	65,2				
5	60,0	10.633					37,2	62,0				
6	60,0	10.936					38,1	63,5	62,9	2,3	3,6	
7	120,0	19.360					63,2	52,6				
8	120,0	18.816					61,5	51,3				
9	120,0	18.979					62,0	51,7				
10	120,0	19.273					62,9	52,4				
11	120,0	18.632					61,0	50,8				
12	120,0	18.089					59,4	49,5	51,4	1,2	2,2	
13	240,0	37.599					117,4	48,9				
14	240,0	43.062					133,6	55,7				
15	240,0	43.171					134,0	55,8				
16	240,0	37.490					117,1	48,8				
17	240,0	40.250					125,3	52,2				
18	240,0	36.029					112,7	47,0	51,4	3,8	7,3	
								prom	55,2			
								ds	6,1			
								cv	11,1			



Tabla N° 12: recuperación de Deltametrina 15-05-2014

N° for	conc intentada ng/g	área	pendiente	intercepto	Vol SPE	DIL SPE	conc obtenida ng/g	% rec	prom	ds	cv
1	60,0	10.938	202	-1879	3	1,8	38,1	63,5			
2	60,0	9.985					35,3	58,8			
3	60,0	9.848					34,9	58,1			
4	60,0	10.938					38,1	63,5			
5	60,0	11.386					39,4	65,7			
6	60,0	10.725					37,5	62,5	62,0	3,0	4,8
7	120,0	18.672					61,1	50,9			
8	120,0	19.357					63,2	52,6			
9	120,0	19.183					62,6	52,2			
10	120,0	19.779					64,4	53,7			
11	120,0	19.470					63,5	52,9			
12	120,0	21.215					68,7	57,2	53,3	2,1	4,0
13	240,0	38.231					119,3	49,7			
14	240,0	41.264					128,3	53,5			
15	240,0	38.944					121,4	50,6			
16	240,0	41.061					127,7	53,2			
17	240,0	38.221					119,2	49,7			
18	240,0	42.239					131,2	54,7	51,9	2,2	4,2
								prom	55,7		
								ds	5,2		
								cv	9,3		



Tabla N° 13: Recuperación de Cipermetrina 13-05-2014

Nº for		conc intentada ng/g	área	área total	pendiente	intercepto	Vol SPE	DIL SPE	conc obtenida ng/g	% rec	prom	ds	cv
1	c1	104,0	4.555	16.994	203	655	3	1,8	48,4	46,5			
	c2		4.751										
	c3		4.402										
	c4		3.286										
2	c1	104,0	4.279	17.540					50,0	48,1			
	c2		6.448										
	c3		2.038										
	c4		4.775										
3	c1	104,0	2.590	14.530					41,1	39,5			
	c2		6.878										
	c3		2.379										
	c4		2.683										
4	c1	104,0	3.422	16.030					45,5	43,8			
	c2		5.472										
	c3		2.700										
	c4		4.436										
5	c1	104,0	2.945	17.462					49,7	47,8			
	c2		6.374										
	c3		2.162										
	c4		5.981										
6	c1	104,0	3.158	16.573					47,1	45,3	45,2	3,2	7,1
	c2		6.529										
	c3		3.341										
	c4		3.545										
7	c1	208,0	7.453	35.452					103,0	49,5			
	c2		13.439										
	c3		4.604										
	c4		9.956										
8	c1	208,0	7.246	31.623					91,7	44,1			
	c2		12.866										
	c3		5.225										
	c4		6.286										
9	c1	208,0	9.378	40.029					116,5	56,0			
	c2		14.169										
	c3		5.484										
	c4		10.998										
10	c1	208,0	6.009	29.725					86,0	41,4			
	c2		12.756										
	c3		4.181										
	c4		6.779										
11	c1	208,0	7.213	34.216					99,3	47,8			
	c2		14.802										
	c3		4.611										
	c4		7.590										
12	c1	208,0	7.162	33.956					98,6	47,4	47,7	5,0	10,5
	c2		13.717										
	c3		6.556										
	c4		6.521										
13	c1	416,0	16.428	66.176					193,9	46,6			
	c2		26.432										
	c3		10.285										
	c4		13.031										
14	c1	416,0	14.566	61.961					181,5	43,6			
	c2		25.508										
	c3		10.285										
	c4		11.602										
15	c1	416,0	15.526	69.658					204,3	49,1			
	c2		29.590										
	c3		12.142										



	c4		12.400										
16	c1	416,0	12.377	55.920					163,6	39,3			
	c2		22.773										
	c3		9.490										
	c4		11.280										
17	c1	416,0	13.730	63.075					184,8	44,4			
	c2		24.375										
	c3		9.669										
	c4		15.301										
18	c1	416,0	13.477	59.374					173,8	41,8			
	c2		23.974								44,1	3,5	7,8
	c3		9.278										
	c4		12.645										
									prom	45,9			
									ds	4,5			
									cv	9,8			

Tabla N° 14: Recuperación de Cipermetrina 14-05-2014

N° for		conc intentada ng/g	área	área total	pendiente	intercepto	Vol SPE	DIL SPE	conc obtenida ng/g	% rec	prom	ds	cv
1	C1	104,0	3.746	16.980	202,70	655	3	1,8	48,3	46,5			
	C2		6.995										
	C3		2.866										
	C4		3.373										
2	C1	104,0	3.489	18.417					52,6	50,6			
	C2		7.678										
	C3		3.121										
	C4		4.129										
3	C1	104,0	2.729	17.283					49,2	47,3			
	C2		6.662										
	C3		3.626										
	C4		4.266										
4	C1	104,0	3.949	17.640					50,3	48,3			
	C2		7.367										
	C3		2.894										
	C4		3.430										
5	C1	104,0	3.485	15.370					43,6	41,9			
	C2		6.342										
	C3		1.432										
	C4		4.111										
6	C1	104,0	3.990	19.873					56,9	54,7	48,2	4,3	8,9
	C2		5.751										
	C3		6.259										
	C4		3.873										
7	c1	208,0	8.443	36.117					105,0	50,5			
	c2		13.926										
	c3		7.025										
	c4		6.723										
8	c1	208,0	8.152	35.512					103,2	49,6			
	c2		14.112										
	c3		5.987										
	c4		7.261										
9	c1	208,0	8.622	33.909					98,4	47,3			
	c2		14.000										
	c3		4.847										
	c4		6.440										
10	c1	208,0	7.681	34.492					100,2	48,2			
	c2		15.044										
	c3		6.375										
	c4		5.392										
11	c1	208,0	6.364	29.640					85,8	41,2			
	c2		12.406										
	c3		4.795										



	c4		6.075											
12	c1	208,0	6.749	31.387					91,0	43,7				
	c2		12.281								46,8	3,6	7,6	
	c3		4.757											
	c4		7.600											
13	c1	416,0	14.181	59.234					173,4	41,7				
	c2		24.192											
	c3		9.532											
	c4		11.329											
14	c1	416,0	13.390	63.161					185,0	44,5				
	c2		24.123											
	c3		9.821											
	c4		15.827											
15	c1	416,0	12.107	55.260					161,6	38,9				
	c2		22.461											
	c3		9.412											
	c4		11.280											
16	c1	416,0	12.585	59.652					174,6	42,0				
	c2		25.272											
	c3		10.223											
	c4		11.572											
17	c1	416,0	13.319	58.987					172,7	41,5				
	c2		23.815											
	c3		9.215											
	c4		12.638											
18	c1	416,0	12.882	60.924					178,4	42,9				
	c2		24.369								41,9	1,8	4,4	
	c3		10.213											
	c4		13.460											
											prom	45,6		
											ds	4,2		
											cv	9,3		

Tabla Nº 15: Recuperación de Cipermetrina 15-05-2014

Nº for		conc intentada ng/g	área	área total	pendiente	intercepto	Vol SPE	DIL SPE	conc obtenida ng/g	% rec	prom	ds	cv
1	C1	104,0	3.906	17.825	202,70	655	3	1,8	50,8	48,9			
	C2		6.915										
	C3		3.287										
	C4		3.717										
2	C1	104,0	4.056	18.209					52,0	50,0			
	C2		8.009										
	C3		2.201										
	C4		3.943										
3	C1	104,0	3.591	17.302					49,3	47,4			
	C2		6.986										
	C3		2.385										
	C4		4.340										
4	C1	104,0	3.587	17.225					49,0	47,2			
	C2		6.780										
	C3		3.175										
	C4		3.683										
5	C1	104,0	3.118	17.255					49,1	47,2			
	C2		6.095										
	C3		3.933										
	C4		4.109										
6	C1	104,0	3.607	16.124					45,8	44,0			
	C2		6.404								47,4	2,0	4,2
	C3		2.550										



	C4		3.563											
7	c1	208,0	6.782	32.134					93,2	44,8				
	c2		15.060											
	c3		4.330											
	c4		5.962											
8	c1	208,0	5.856	28.324					81,9	39,4				
	c2		11.144											
	c3		3.965											
	c4		7.359											
9	c1	208,0	7.786	32.538					94,4	45,4				
	c2		14.805											
	c3		3.751											
	c4		6.196											
10	c1	208,0	5.864	28.623					82,8	39,8				
	c2		11.206											
	c3		4.046											
	c4		7.507											
11	c1	208,0	6.782	32.286					93,6	45,0				
	c2		15.060											
	c3		4.330											
	c4		6.114											
12	c1	208,0	6.967	33.447					97,1	46,7				
	c2		13.481								43,5	3,1	7,1	
	c3		5.130											
	c4		7.869											
13	c1	416,0	12.747	58.918					172,5	41,5				
	c2		28.546											
	c3		7.205											
	c4		10.420											
14	c1	416,0	12.813	65.069					190,7	45,8				
	c2		25.531											
	c3		11.523											
	c4		15.202											
15	c1	416,0	11.250	51.606					150,8	36,3				
	c2		19.680											
	c3		8.150											
	c4		12.526											
16	c1	416,0	13.947	58.580					171,5	41,2				
	c2		25.656											
	c3		7.602											
	c4		11.375											
17	c1	416,0	12.450	59.244					173,4	41,7				
	c2		22.084											
	c3		9.954											
	c4		14.756											
18	c1	416,0	12.673	56.354					164,9	39,6				
	c2		20.598								41,0	3,1	7,6	
	c3		10.280											
	c4		12.803											
									prom	44,0				
									ds	3,8				
									cv	8,6				

5.2 Precisión intermedia:

5.2.1 Precisión intermedia de Deltametrina

Los resultados de la precisión intermedia de Deltametrina, se presentan en la tabla 16. Los cromatogramas se pueden observar en los anexos 6.3, 6.4 y 6.5.

5.2.1 Precisión intermedia de Cipermetrina



Los resultados de la precisión intermedia de Cipertrina, se presentan en la tabla 17. Los cromatogramas se pueden observar en los anexos 6.3, 6.4 y 6.5.

Tabla Nº 16: Precisión intermedia de Deltametrina

Fecha	Nº for	conc intentada ng/g	conc obtenida ng/g	% rec	prom	ds	cv
13-may	1	60,0	39,7	66,1			
13-may	2	60,0	40,4	67,4			
13-may	3	60,0	40,7	67,8			
13-may	4	60,0	37,4	62,3			
13-may	5	60,0	39,7	66,1			
13-may	6	60,0	36,5	60,9			
14-may	1	60,0	39,1	65,2			
14-may	2	60,0	37,5	62,5	63,4	2,9	4,5
14-may	3	60,0	35,5	59,1			
14-may	4	60,0	39,1	65,2			
14-may	5	60,0	37,2	62,0			
14-may	6	60,0	38,1	63,5			
15-may	1	60,0	38,1	63,5			
15-may	2	60,0	35,3	58,8			
15-may	3	60,0	34,9	58,1			
15-may	4	60,0	38,1	63,5			
15-may	5	60,0	39,4	65,7			
15-may	6	60,0	37,5	62,5			
13-may	7	120,0	69,0	57,5			
13-may	8	120,0	67,0	55,8			
13-may	9	120,0	66,3	55,2			
13-may	10	120,0	65,7	54,7			
13-may	11	120,0	67,0	55,8			
13-may	12	120,0	68,1	56,7			
14-may	7	120,0	63,2	52,6			
14-may	8	120,0	61,5	51,3	53,5	2,4	4,5
14-may	9	120,0	62,0	51,7			
14-may	10	120,0	62,9	52,4			
14-may	11	120,0	61,0	50,8			
15-may	12	120,0	59,4	49,5			
15-may	7	120,0	61,1	50,9			
15-may	8	120,0	63,2	52,6			
15-may	9	120,0	62,6	52,2			
15-may	10	120,0	64,4	53,7			
15-may	11	120,0	63,5	52,9			
15-may	12	120,0	68,7	57,2			
13-may	13	240,0	126,4	52,7			
13-may	14	240,0	123,2	51,3			
13-may	15	240,0	117,6	49,0			
13-may	16	240,0	134,0	55,8			
13-may	17	240,0	128,3	53,4			
13-may	18	240,0	125,5	52,3			
14-may	13	240,0	117,4	48,9			
14-may	14	240,0	133,6	55,7	51,9	2,7	5,2
14-may	15	240,0	134,0	55,8			
14-may	16	240,0	117,1	48,8			
14-may	17	240,0	125,3	52,2			
15-may	18	240,0	112,7	47,0			
15-may	13	240,0	119,3	49,7			
15-may	14	240,0	128,3	53,5			
15-may	15	240,0	121,4	50,6			
15-may	16	240,0	127,7	53,2			
15-may	17	240,0	119,2	49,7			
15-may	18	240,0	131,2	54,7			



Tabla N° 17: Precisión intermedia de Cipermetrina

Fecha	N° for	conc intentada ng/g	conc obtenida ng/g	% rec	prom	ds	cv
13-may	1	104,0	48,4	46,5			
13-may	2	104,0	50,0	48,1			
13-may	3	104,0	41,1	39,5			
13-may	4	104,0	45,5	43,8			
13-may	5	104,0	49,7	47,8			
13-may	6	104,0	47,1	45,3			
14-may	1	104,0	48,3	46,5			
14-may	2	104,0	52,6	50,6	46,9	3,4	7,2
14-may	3	104,0	49,2	47,3			
14-may	4	104,0	50,3	48,3			
14-may	5	104,0	43,6	41,9			
14-may	6	104,0	56,9	54,7			
15-may	1	104,0	50,8	48,9			
15-may	2	104,0	52,0	50,0			
15-may	3	104,0	49,3	47,4			
15-may	4	104,0	49,0	47,2			
15-may	5	104,0	49,1	47,2			
15-may	6	104,0	45,8	44,0			
13-may	7	208,0	103,0	49,5			
13-may	8	208,0	91,7	44,1			
13-may	9	208,0	116,5	56,0			
13-may	10	208,0	86,0	41,4			
13-may	11	208,0	99,3	47,8			
13-may	12	208,0	98,6	47,4			
14-may	7	208,0	105,0	50,5			
14-may	8	208,0	103,2	49,6	46,0	4,2	9,1
14-may	9	208,0	98,4	47,3			
14-may	10	208,0	100,2	48,2			
14-may	11	208,0	85,8	41,2			
15-may	12	208,0	91,0	43,7			
15-may	7	208,0	93,2	44,8			
15-may	8	208,0	81,9	39,4			
15-may	9	208,0	94,4	45,4			
15-may	10	208,0	82,8	39,8			
15-may	11	208,0	93,6	45,0			
15-may	12	208,0	97,1	46,7			
13-may	13	416,0	193,9	46,6			
13-may	14	416,0	181,5	43,6			
13-may	15	416,0	204,3	49,1			
13-may	16	416,0	163,6	39,3			
13-may	17	416,0	184,8	44,4			
13-may	18	416,0	173,8	41,8			
14-may	13	416,0	173,4	41,7			
14-may	14	416,0	185,0	44,5	42,4	3,0	7,2
14-may	15	416,0	161,6	38,9			
14-may	16	416,0	174,6	42,0			
14-may	17	416,0	172,7	41,5			
15-may	18	416,0	178,4	42,9			
15-may	13	416,0	172,5	41,5			
15-may	14	416,0	190,7	45,8			
15-may	15	416,0	150,8	36,3			
15-may	16	416,0	171,5	41,2			
15-may	17	416,0	173,4	41,7			
15-may	18	416,0	164,9	39,6			



6.- Límite de detección:

6.1.- El límite de detección (LD) de Deltametrina se presenta en la tabla N°18.

6.2.- El límite de detección (LD) de Cipermetrina se presenta en la tabla N°19.

7.- Límite de cuantificación:

7.1.- El límite de cuantificación (LC) de Deltametrina se presenta en la tabla N°18.

7.2.- El límite de Cuantificación (LC) de Cipermetrina se presenta en la tabla N°19.

Tabla 18 LD y LC de Deltametrina

Fecha	conc intentada ng/g	area obtenida
13-may	60,0	11455
13-may	60,0	11718
13-may	60,0	11800
13-may	60,0	10693
13-may	60,0	11455
13-may	60,0	10403
14-may	60,0	11274
14-may	60,0	10740
14-may	60,0	10053
14-may	60,0	11279
14-may	60,0	10633
14-may	60,0	10936
15-may	60,0	10938
15-may	60,0	9985
15-may	60,0	9848
15-may	60,0	10938
15-may	60,0	11386
15-may	60,0	10725
	DS	578,923
	pendiente	202
	intercepto	-1879
	recuperación	0,563
	LD	20,0
	LC	40,5



Tabla 18 LD y LC de Cipermetrina

Fecha	conc intentada ng/g	area obtenida
13-may	104,0	16994
13-may	104,0	17540
13-may	104,0	14530
13-may	104,0	16030
13-may	104,0	17462
13-may	104,0	16573
14-may	104,0	16980
14-may	104,0	18417
14-may	104,0	17283
14-may	104,0	17640
14-may	104,0	15370
14-may	104,0	19873
15-may	104,0	17825
15-may	104,0	18209
15-may	104,0	17302
15-may	104,0	17225
15-may	104,0	17225
15-may	104,0	16124
	DS	1184,811
	pendiente	203
	intercepto	655
	recuperación	0,451
	LD	21,3
	LC	73,4

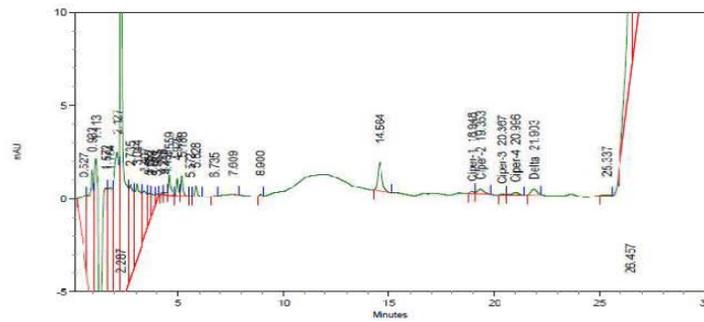
7.- Robustez:

El coeficiente de variación total de la recuperación (CV% total) de 4.0%, da una indicación de la robustez del método.



Cromatogramas de Curva de calibraci3n est3ndar de Cipermetrina-Deltametrina

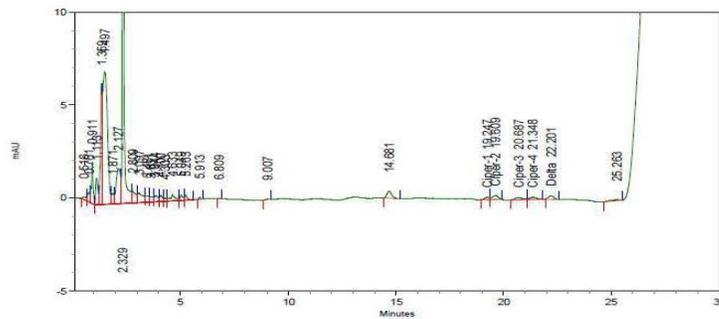
Est3ndar Deltametrina (30 ppb)-Cipermetrina (52 ppb) 13-5-2014



1: 210 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Ciper-1	18.948	1555	30276.94
Ciper-2	19.353	4699	20556.14
Ciper-3	20.367	1207	13480.90
Ciper-4	20.996	3230	0.00
Delta	21.903	5211	28281.29
Totals		13902	

Est3ndar Deltametrina (30 ppb)-Cipermetrina (52 ppb) 14-5-2014

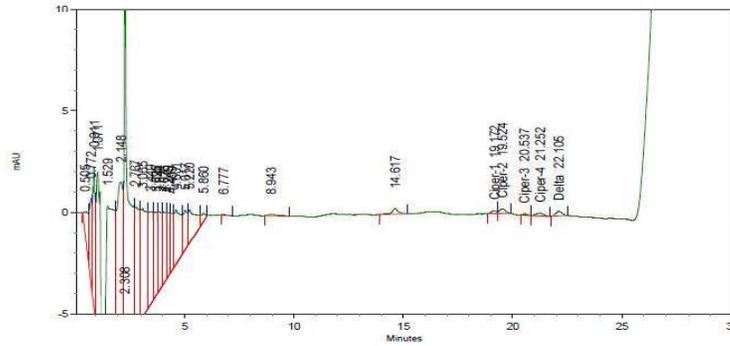


1: 210 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Ciper-1	19.247	1901	14664.65
Ciper-2	19.609	3855	23508.86
Ciper-3	20.687	3414	6168.85
Ciper-4	21.348	2629	15244.47
Delta	22.201	3287	33739.86
Totals		15086	

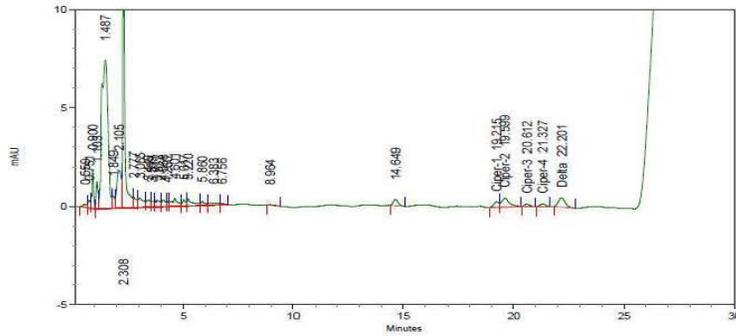


Estándar Deltametrina (30 ppb)-Cipermetrina (52 ppb) 19-5-2014





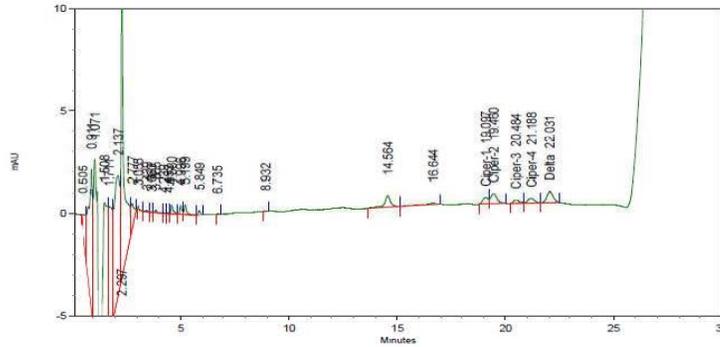
Estándar Deltametrina (60 ppb)-Cipermetrina (104 ppb) 14-5-2014



1: 210 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Ciper-1	19.215	4592	13447.47
Ciper-2	19.599	11338	15062.74
Ciper-3	20.612	2039	31325.96
Ciper-4	21.327	2808	0.00
Delta	22.201	10311	24636.40
Totals		31088	

Estándar Deltametrina (60 ppb)-Cipermetrina (104 ppb) 19-5-2014

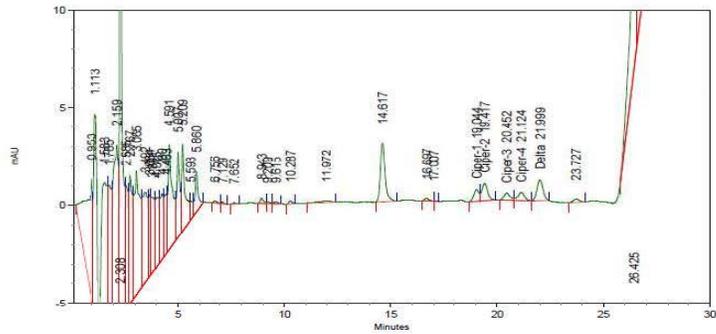


1: 210 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Ciper-1	19.097	5247	14898.07
Ciper-2	19.460	10092	17592.19
Ciper-3	20.484	3087	29512.21
Ciper-4	21.188	4959	19861.75
Delta	22.031	11027	25352.50
Totals		34412	

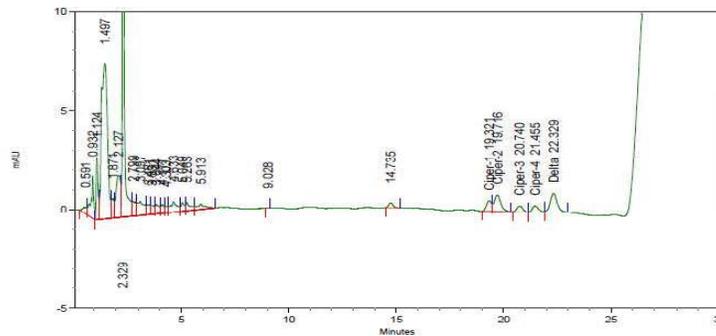


Estándar Deltametrina (120 ppb)-Cipermetrina (208 ppb) 13-5-2014



1: 210 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Ciper-1	19.044	10830	17059.38
Ciper-2	19.417	17497	19899.07
Ciper-3	20.452	7756	22623.46
Ciper-4	21.124	9649	23285.23
Delta	21.999	21667	26460.67
Totals		67399	

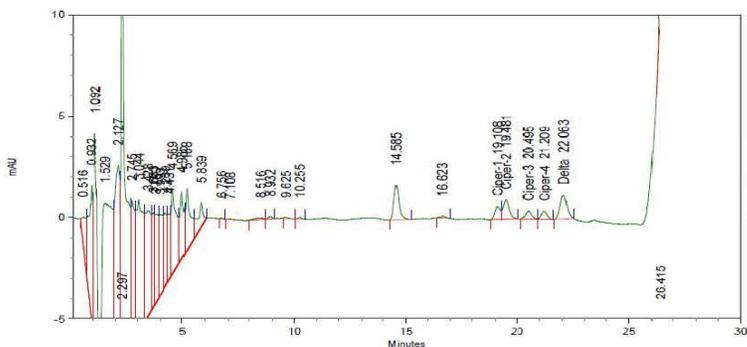
Estándar Deltametrina (120 ppb)-Cipermetrina (208 ppb) 14-5-2014



1: 210 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Ciper-1	19.321	9179	15667.59
Ciper-2	19.716	17744	18954.82
Ciper-3	20.740	5908	25235.71
Ciper-4	21.455	6857	24296.42
Delta	22.329	21506	23961.66
Totals		61194	



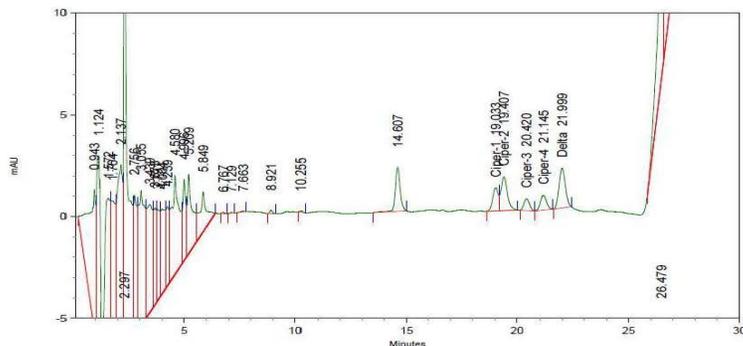
Estándar Deltametrina (120 ppb)-Cipermetrina (208 ppb) 19-5-2014



1: 210 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Ciper-1	19.108	10617	17004.29
Ciper-2	19.481	18978	20071.09
Ciper-3	20.495	7569	25494.70
Ciper-4	21.209	7328	28547.37
Delta	22.063	23988	25997.20
Totals		68480	

Estándar Deltametrina (210 ppb)-Cipermetrina (364 ppb) 13-5-2014

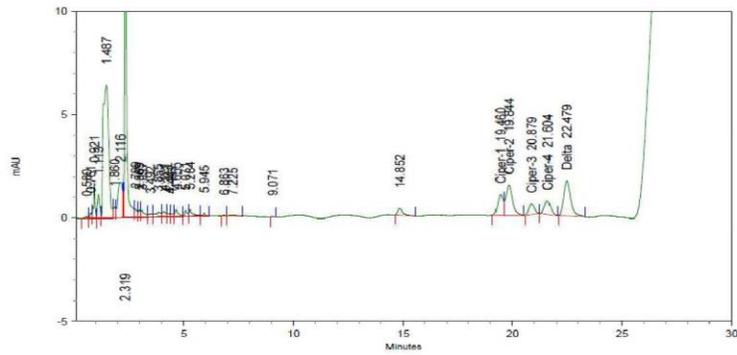


1: 210 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Ciper-1	19.033	19408	15865.48
Ciper-2	19.407	33819	18600.73
Ciper-3	20.420	10082	28123.72
Ciper-4	21.145	13936	26506.95
Delta	21.999	38852	26580.30
Totals		116097	



Estándar Deltametrina (210 ppb)-Cipermetrina (364 ppb) 14-5-2014

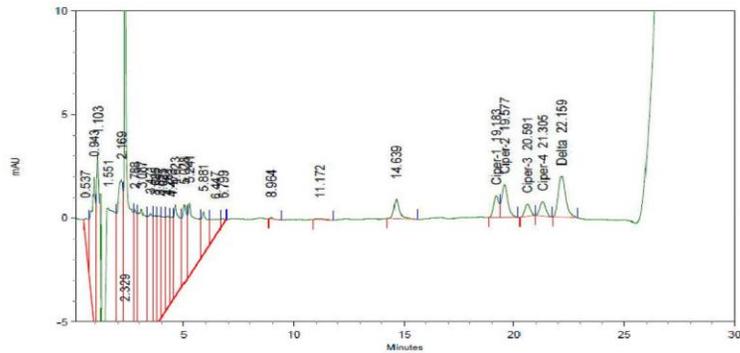


I: 210 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Ciper-1	19.460	17228	15456.42
Ciper-2	19.844	30932	18272.41
Ciper-3	20.879	9467	28360.81
Ciper-4	21.604	12769	26169.80
Delta	22.479	37962	24075.65

Totals		108358	
--------	--	--------	--

Estándar Deltametrina (210 ppb)-Cipermetrina (364 ppb) 19-5-2014



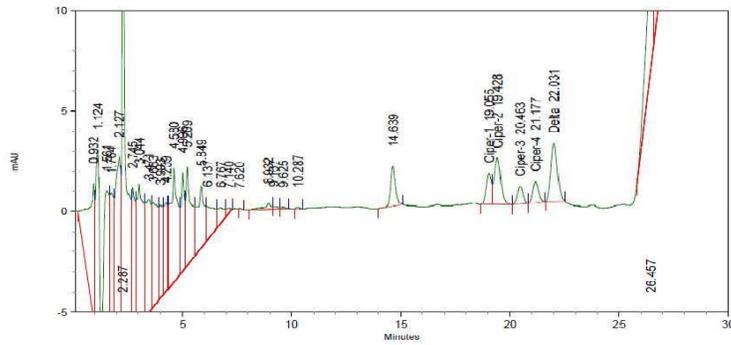
I: 210 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Ciper-1	19.183	17269	18474.23
Ciper-2	19.577	31549	20401.38
Ciper-3	20.591	10342	29001.16
Ciper-4	21.305	12927	28277.34
Delta	22.159	42915	24647.15

Totals		115002	
--------	--	--------	--



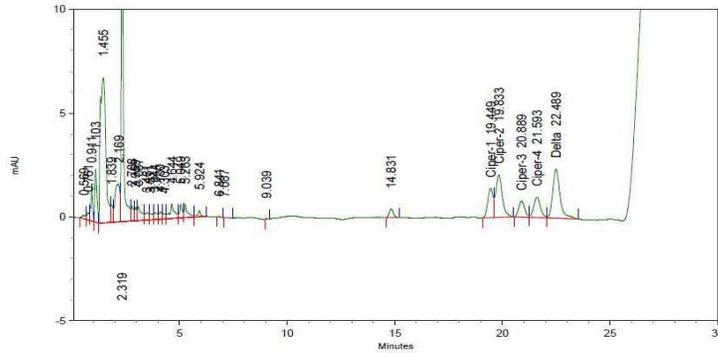
Estándar Deltametrina (300 ppb)-Cipermetrina (520 ppb) 13-5-2014



1: 210 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Ciper-1	19.055	25597	16863.22
Ciper-2	19.428	45896	19685.87
Ciper-3	20.463	15987	27410.11
Ciper-4	21.177	19439	27344.16
Delta	22.031	58881	25871.04
Totals		165800	

Estándar Deltametrina (300 ppb)-Cipermetrina (520 ppb) 14-5-2014

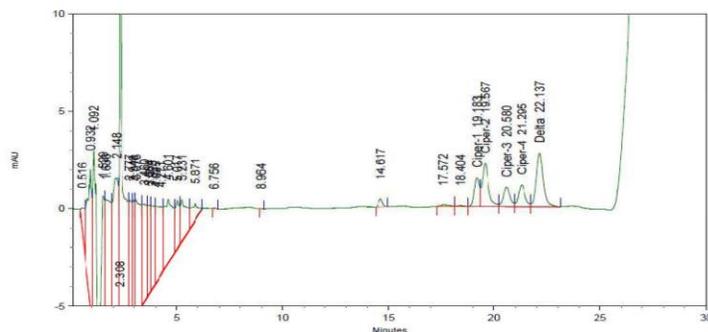


1: 210 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Ciper-1	19.449	24083	16096.49
Ciper-2	19.833	42842	18501.94
Ciper-3	20.889	14690	26036.57
Ciper-4	21.593	21108	23618.36
Delta	22.489	55672	23861.84
Totals		158395	



Est3ndar Deltametrina (300 ppb)-Cipermetrina (520 ppb) 19-5-2014



1: 210 nm, 8 nm

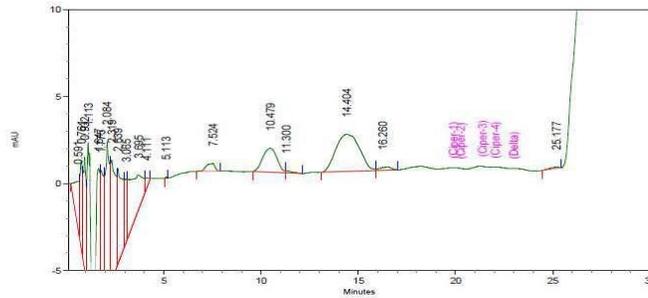
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Ciper-1	19.183	25196	17864.44
Ciper-2	19.567	47603	19241.51
Ciper-3	20.580	21936	21560.28
Ciper-4	21.295	25109	21785.43
Delta	22.137	62524	23732.43

Totals		182368	
--------	--	--------	--



Cromatogramas de Muestras blanco de Cipermetrina-Deltametrina

Blanco 1

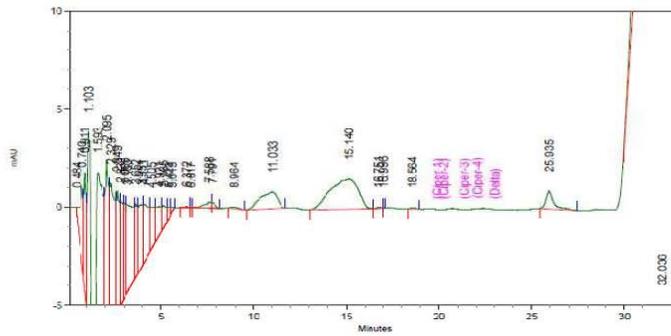


1: 210 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Ciper-1			
Ciper-2			
Ciper-3			
Ciper-4			
Delta			

Totals			
--------	--	--	--

Blanco 2



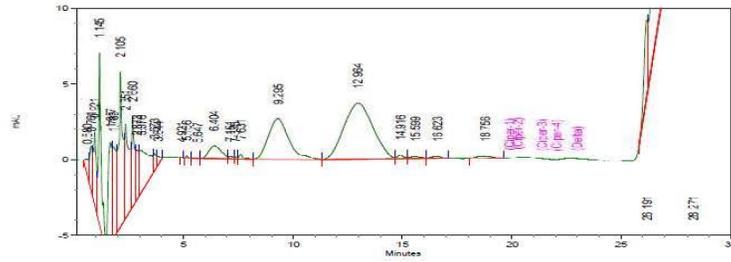
1: 210 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Ciper-1			
Ciper-2			
Ciper-3			
Ciper-4			
Delta			

Totals			
--------	--	--	--

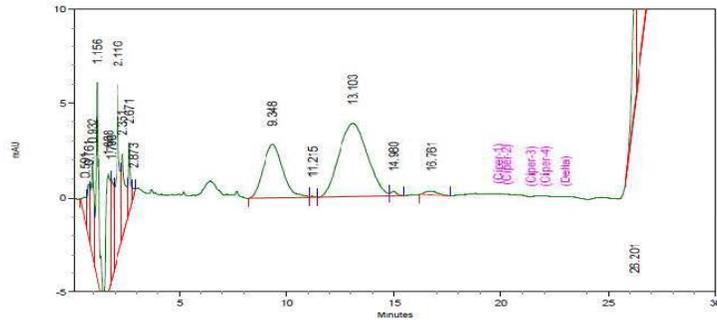


Blanco 3



1: 210 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Ciper-1			
Ciper-2			
Ciper-3			
Ciper-4			
Delta			
Totals			

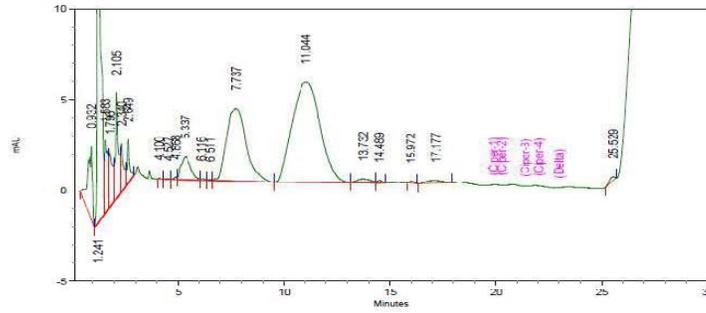
Blanco 4



1: 210 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Ciper-1			
Ciper-2			
Ciper-3			
Ciper-4			
Delta			
Totals			



Blanco 5

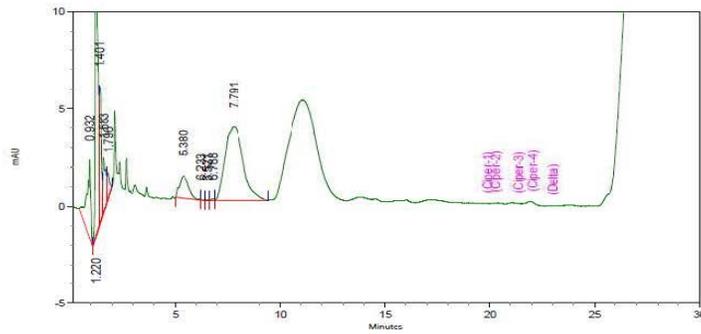


1: 210 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Ciper-1			
Ciper-2			
Ciper-3			
Ciper-4			
Delta			

Totals			
--------	--	--	--

Blanco 6



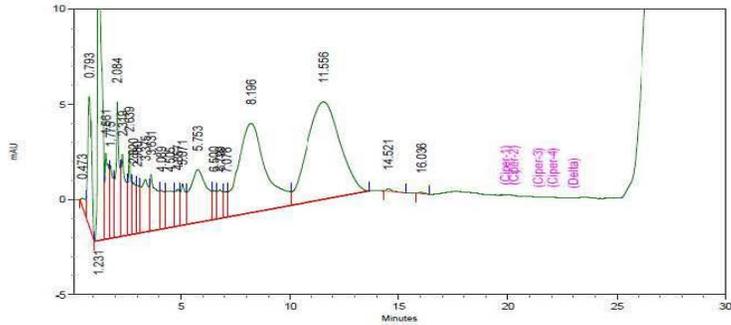
1: 210 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Ciper-1			
Ciper-2			
Ciper-3			
Ciper-4			
Delta			

Totals			
--------	--	--	--



Blanco 7

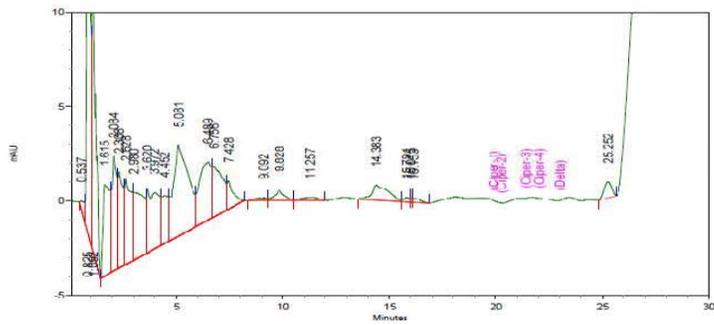


I: 210 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Ciper-1			
Ciper-2			
Ciper-3			
Ciper-4			
Delta			

Totals			
--------	--	--	--

Blanco 8



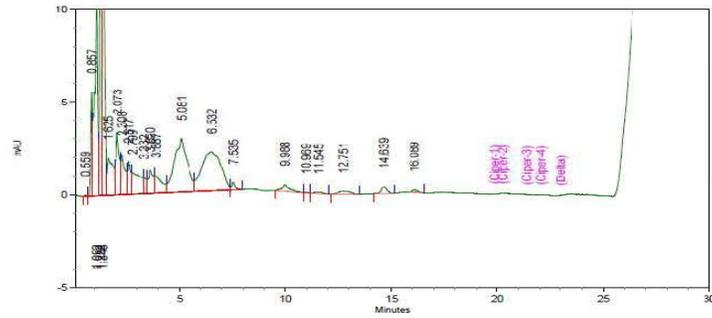
I: 210 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Ciper-1			
Ciper-2			
Ciper-3			
Ciper-4			
Delta			

Totals			
--------	--	--	--



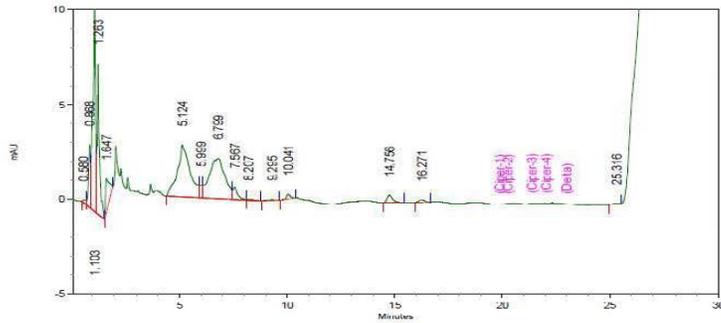
Blanco 9



1: 210 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Ciper-1			
Ciper-2			
Ciper-3			
Ciper-4			
Delta			
Totals			

Blanco 10



1: 210 nm, 8 nm

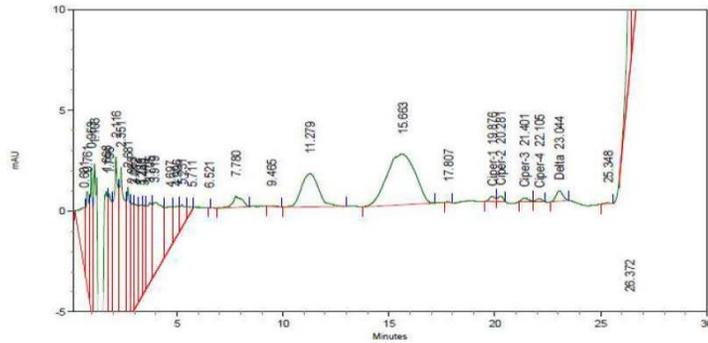
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Ciper-1			
Ciper-2			
Ciper-3			
Ciper-4			
Delta			
Totals			





Cromatogramas de Fortificados de Cipermetrina-Deltametrina 13-5-2014

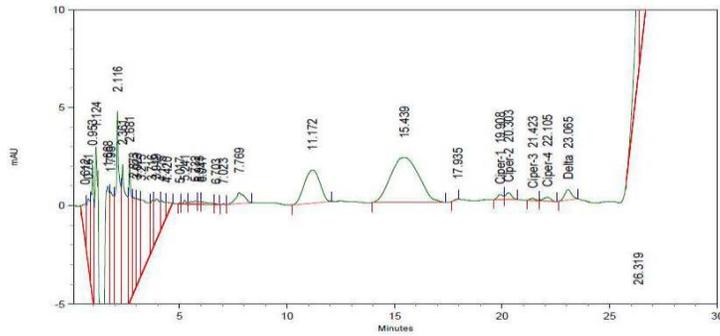
Fortificado 1 Cipermetrina-Deltametrina 13-5-2014



1: 210 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Ciper-1	19.876	4555	19336.58
Ciper-2	20.281	4751	26142.00
Ciper-3	21.401	4402	13593.75
Ciper-4	22.105	3286	19441.69
Delta	23.044	11455	23637.69
Totals		28449	

Fortificado 2 Cipermetrina-Deltametrina 13-5-2014

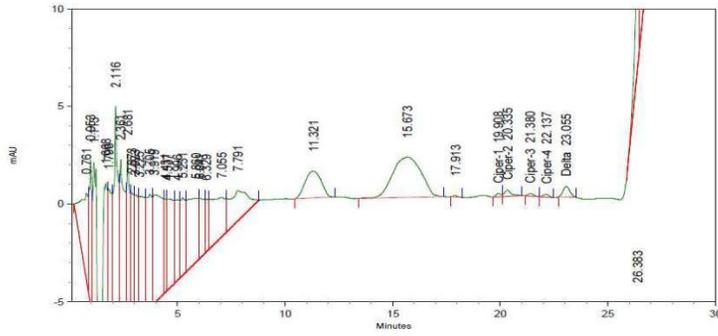


1: 210 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Ciper-1	19.908	4279	18307.28
Ciper-2	20.303	6448	22095.64
Ciper-3	21.423	2038	0.00
Ciper-4	22.105	4775	12905.76
Delta	23.065	11718	23985.07
Totals		29258	



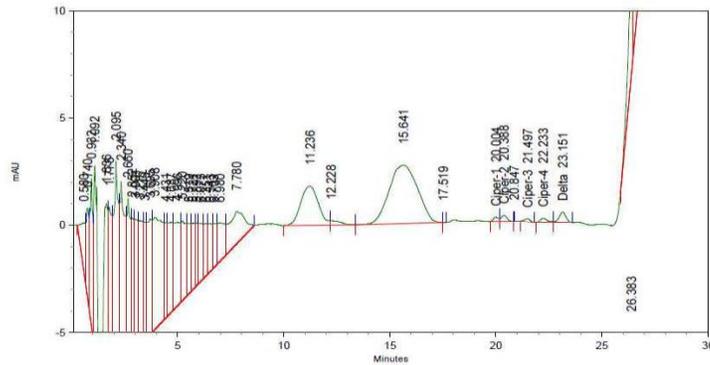
Fortificado 3 Cipermetrina-Deltametrina 13-5-2014



1: 210 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Ciper-1	19.908	2590	25089.45
Ciper-2	20.335	6878	22798.15
Ciper-3	21.380	2379	12421.48
Ciper-4	22.137	2683	27429.14
Delta	23.055	11800	23672.59
Totals		26330	

Fortificado 4 Cipermetrina-Deltametrina 13-5-2014

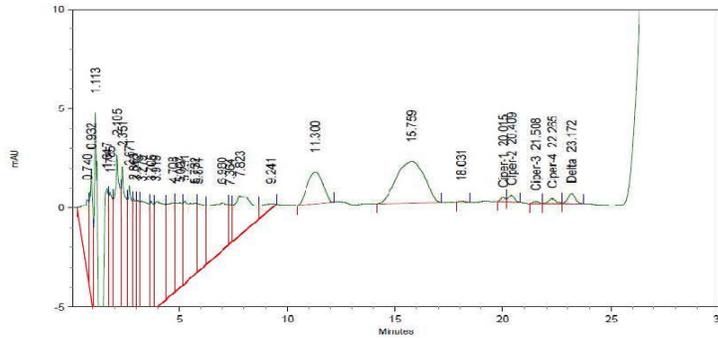


1: 210 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Ciper-1	20.004	3422	20651.12
Ciper-2	20.388	5472	23498.03
Ciper-3	21.497	2700	0.00
Ciper-4	22.233	4436	20697.81
Delta	23.151	10693	24413.02
Totals		26723	



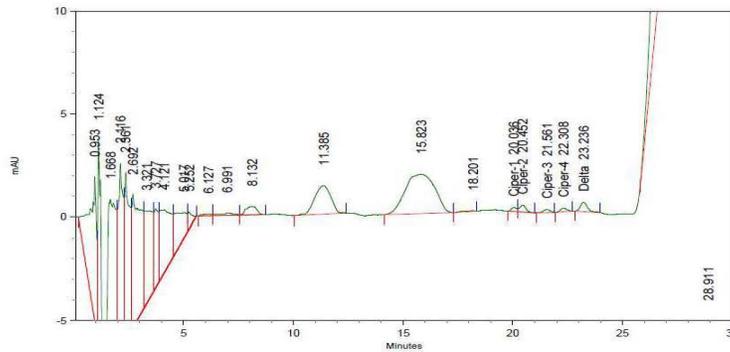
Fortificado 5 Cipermetrina-Deltametrina 13-5-2014



1: 210 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Ciper-1	20.015	2945	16581.28
Ciper-2	20.409	6374	21261.69
Ciper-3	21.508	2162	0.00
Ciper-4	22.265	5981	20046.34
Delta	23.172	11455	23553.17
Totals		28917	

Fortificado 6 Cipermetrina-Deltametrina 13-5-2014

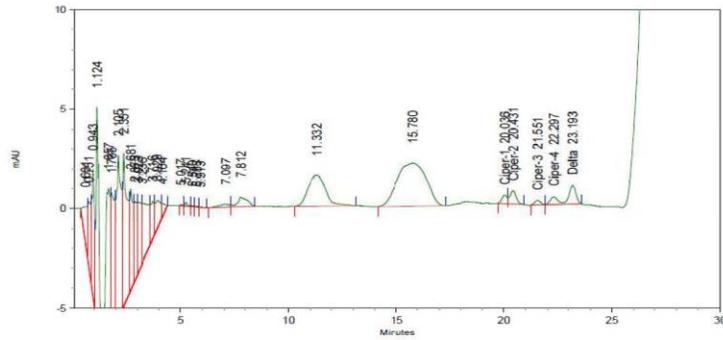


1: 210 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Ciper-1	20.036	3158	15228.24
Ciper-2	20.452	6529	20264.05
Ciper-3	21.561	3341	21590.16
Ciper-4	22.308	3545	26835.32
Delta	23.236	10403	26469.16
Totals		26976	



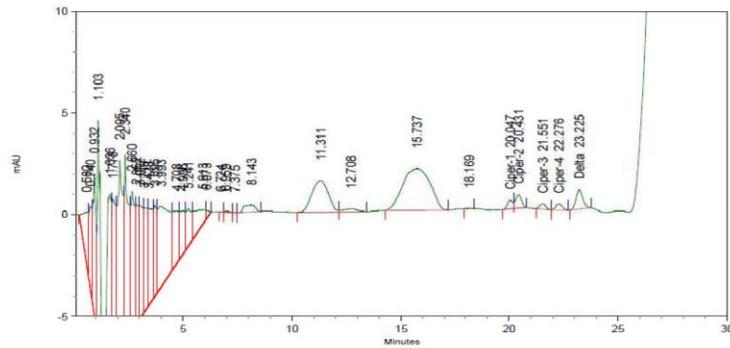
Fortificado 7 Cipermetrina-Deltametrina 13-5-2014



1: 210 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Ciper-1	20.036	7453	14206.58
Ciper-2	20.431	13439	19341.44
Ciper-3	21.551	4604	28023.71
Ciper-4	22.297	9955	17931.20
Delta	23.193	21339	25505.17
Totals		56791	

Fortificado 8 Cipermetrina-Deltametrina 13-5-2014

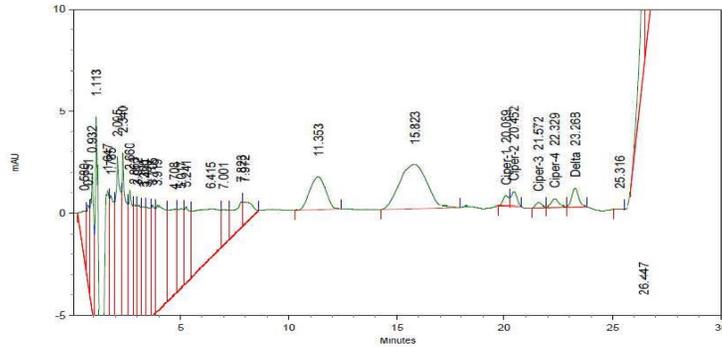


1: 210 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Ciper-1	20.047	7246	16021.88
Ciper-2	20.431	12866	20352.14
Ciper-3	21.551	5225	27186.21
Ciper-4	22.276	6286	26233.35
Delta	23.225	20646	26158.83
Totals		52269	



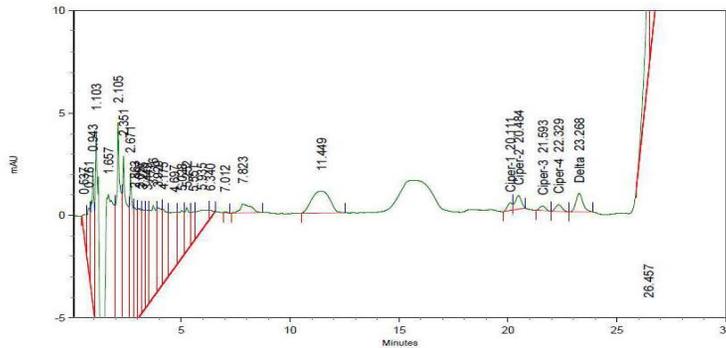
Fortificado 9 Cipermetrina-Deltametrina 13-5-2014



1: 210 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Ciper-1	20.089	9378	11995.46
Ciper-2	20.452	14169	17296.15
Ciper-3	21.572	5484	24035.29
Ciper-4	22.329	10998	20105.92
Delta	23.268	20402	26291.34
Totals		60431	

Fortificado 10 Cipermetrina-Deltametrina 13-5-2014

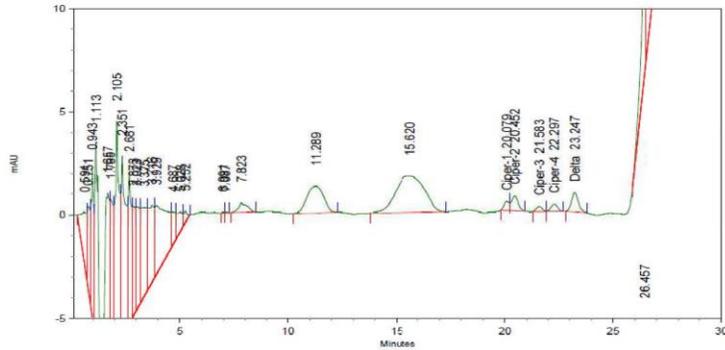


1: 210 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Ciper-1	20.111	6009	17784.23
Ciper-2	20.484	12756	21130.93
Ciper-3	21.593	4181	28212.32
Ciper-4	22.329	6779	24669.61
Delta	23.268	20212	25919.04
Totals		49937	



Fortificado 11 Cipermetrina-Deltametrina 13-5-2014

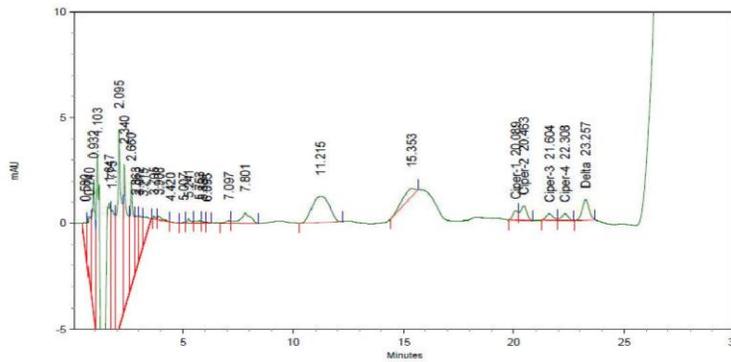


1: 210 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Ciper-1	20.079	7213	11530.68
Ciper-2	20.452	14802	18494.97
Ciper-3	21.583	4611	27630.74
Ciper-4	22.297	7590	24398.47
Delta	23.247	20635	25374.77

Totals		54851	
--------	--	-------	--

Fortificado 12 Cipermetrina-Deltametrina 13-5-2014



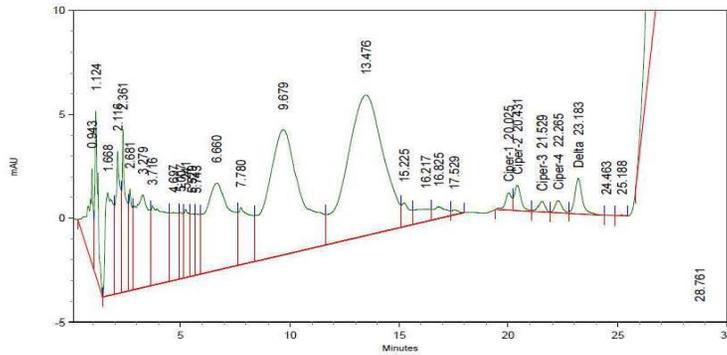
1: 210 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Ciper-1	20.089	7162	12733.28
Ciper-2	20.463	13717	18900.16
Ciper-3	21.604	6556	21773.09
Ciper-4	22.308	6521	26358.86
Delta	23.257	21019	25434.75

Totals		54975	
--------	--	-------	--



Fortificado 13 Cipermetrina-Deltametrina 13-5-2014

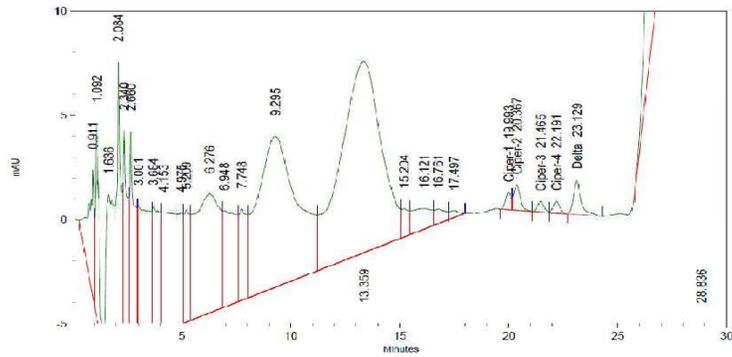


1: 210 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Ciper-1	20.025	16428	14742.64
Ciper-2	20.431	26432	18566.13
Ciper-3	21.529	10285	24316.97
Ciper-4	22.265	13031	24173.38
Delta	23.183	40629	25168.36

Totals		106805	
--------	--	--------	--

Fortificado 14 Cipermetrina-Deltametrina 13-5-2014



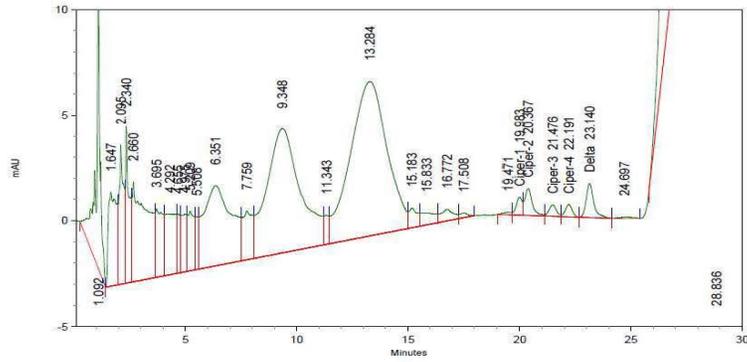
1: 210 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Ciper-1	19.993	14566	13984.79
Ciper-2	20.367	25508	18849.79
Ciper-3	21.465	10285	24389.56
Ciper-4	22.191	11602	25862.79
Delta	23.129	39545	25741.50

Totals		101506	
--------	--	--------	--



Fortificado 15 Cipermetrina-Deltametrina 13-5-2014

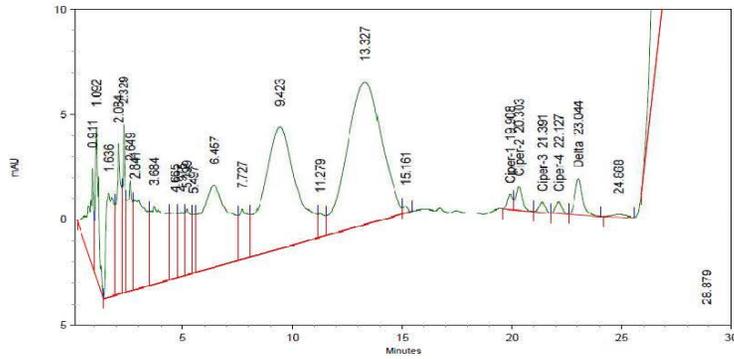


1: 210 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Ciper-1	19.983	15526	11780.90
Ciper-2	20.367	29590	17315.63
Ciper-3	21.476	12142	20167.64
Ciper-4	22.191	12400	23519.63
Delta	23.140	37671	25147.35

Totals	107329		
--------	--------	--	--

Fortificado 16 Cipermetrina-Deltametrina 13-5-2014



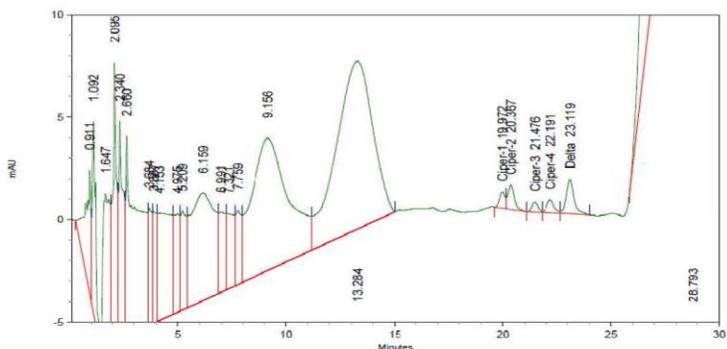
1: 210 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Ciper-1	19.908	12377	17725.86
Ciper-2	20.303	22773	20777.66
Ciper-3	21.391	9490	25289.72
Ciper-4	22.127	11280	26130.41
Delta	23.044	43171	22613.71

Totals	99091		
--------	-------	--	--

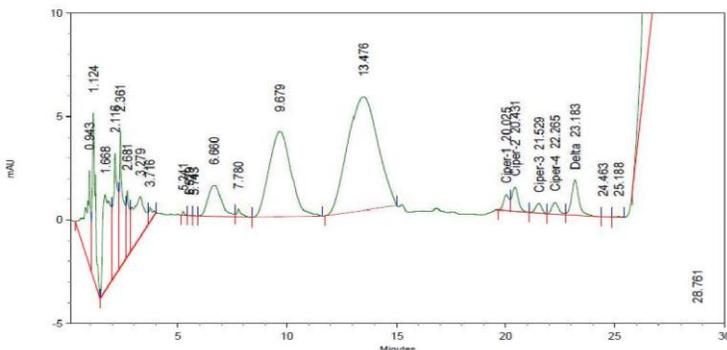


Fortificado 17 Cipermetrina-Deltametrina 13-5-2014



1: 210 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Ciper-1	19.972	13730	16909.78
Ciper-2	20.367	24375	19286.64
Ciper-3	21.476	9669	24858.13
Ciper-4	22.191	15301	21301.34
Delta	23.119	41257	23726.50
Totals		104332	

Fortificado 18 Cipermetrina-Deltametrina 13-5-2014



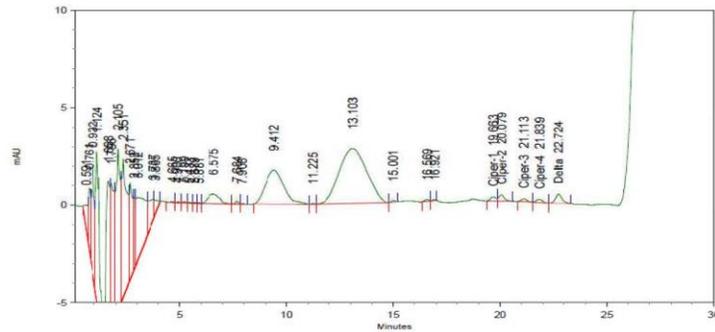
1: 210 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Ciper-1	20.025	13477	16816.83
Ciper-2	20.431	23974	20056.30
Ciper-3	21.529	9278	26127.35
Ciper-4	22.265	12645	24724.20
Delta	23.183	40328	25280.16
Totals		99702	





Cromatogramas de Fortificados de Cipermetrina-Deltametrina 14-5-2014

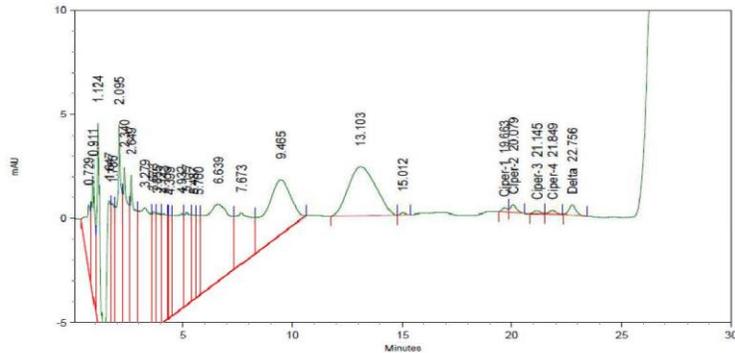
Fortificado 1 Cipermetrina-Deltametrina 14-5-2014



1: 210 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Ciper-1	19.663	3746	20241.41
Ciper-2	20.079	6995	21781.58
Ciper-3	21.113	2866	0.00
Ciper-4	21.839	3373	25772.88
Delta	22.724	11274	23183.59
Totals		28254	

Fortificado 2 Cipermetrina-Deltametrina 14-5-2014

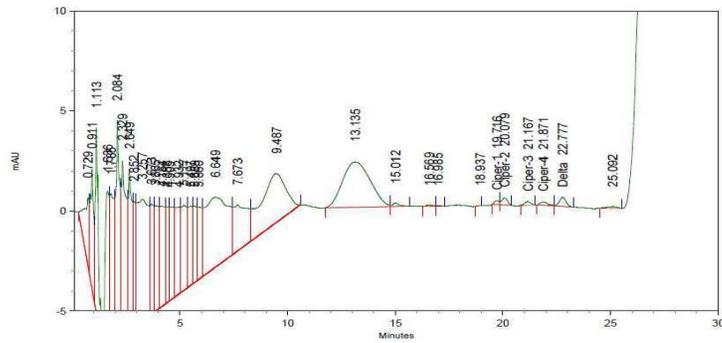


1: 210 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Ciper-1	19.663	3489	15799.95
Ciper-2	20.079	7678	20530.25
Ciper-3	21.145	3121	26351.92
Ciper-4	21.849	4129	22286.66
Delta	22.756	10740	24005.69
Totals		29157	



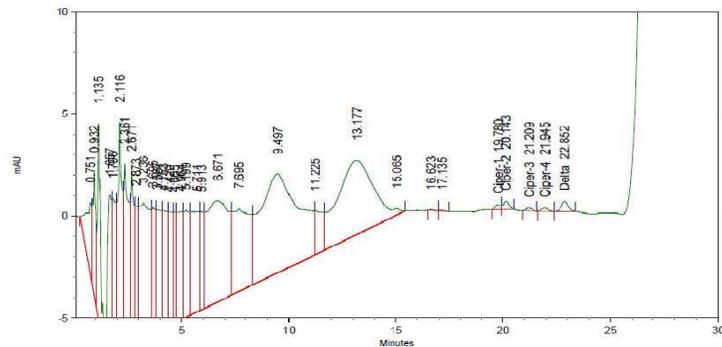
Fortificado 3 Cipermetrina-Deltametrina 14-5-2014



1: 210 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Ciper-1	19.716	2729	14475.72
Ciper-2	20.079	6662	22190.34
Ciper-3	21.167	3626	25602.16
Ciper-4	21.871	4266	24207.55
Delta	22.777	10053	24028.75
Totals		27336	

Fortificado 4 Cipermetrina-Deltametrina 14-5-2014

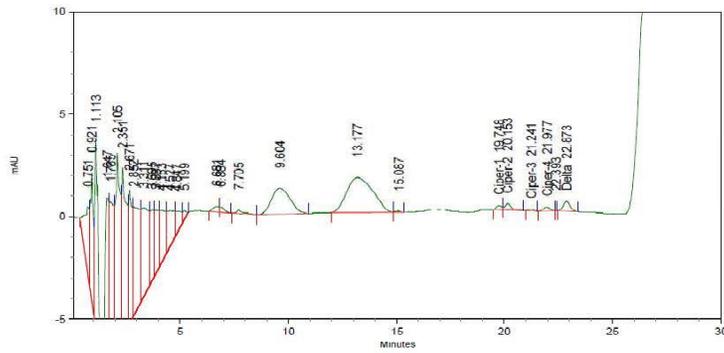


1: 210 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Ciper-1	19.780	3949	16303.71
Ciper-2	20.143	7367	19717.08
Ciper-3	21.209	2894	22501.45
Ciper-4	21.945	3430	0.00
Delta	22.852	11279	22895.10
Totals		28919	

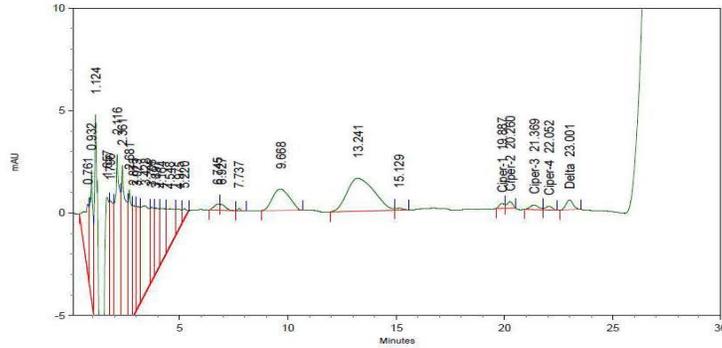


Fortificado 5 Cipermetrina-Deltametrina 14-5-2014



1: 210 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Ciper-1	19.748	3485	21439.41
Ciper-2	20.153	6342	21527.25
Ciper-3	21.241	1432	38553.91
Ciper-4	21.977	4111	22156.76
Delta	22.873	10633	23940.96
Totals		26003	

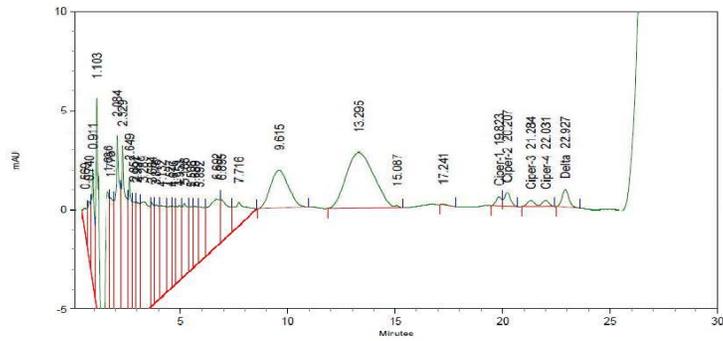
Fortificado 6 Cipermetrina-Deltametrina 14-5-2014



1: 210 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Ciper-1	19.887	3990	16391.53
Ciper-2	20.260	5751	20721.39
Ciper-3	21.369	6259	14566.79
Ciper-4	22.052	3873	19061.09
Delta	23.001	10936	23470.36
Totals		30809	



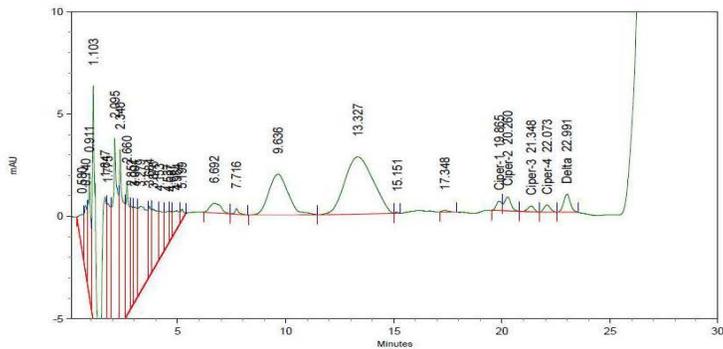
Fortificado 7 Cipermetrina-Deltametrina 14-5-2014



I: 210 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Ciper-1	19.823	8443	13732.43
Ciper-2	20.207	13926	18243.21
Ciper-3	21.284	7025	22815.84
Ciper-4	22.031	6723	26188.08
Delta	22.927	19360	25133.03
Totals		55477	

Fortificado 8 Cipermetrina-Deltametrina 14-5-2014

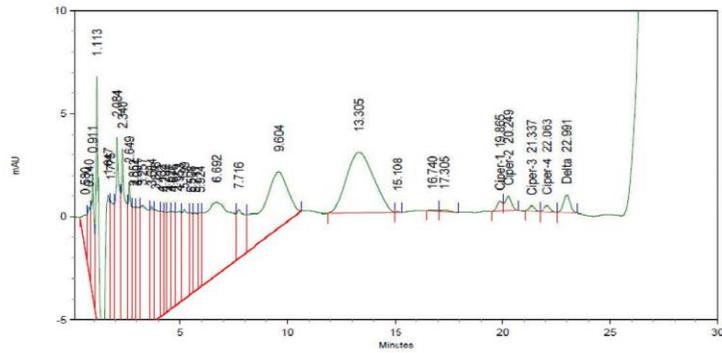


I: 210 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Ciper-1	19.865	8152	13768.74
Ciper-2	20.260	14112	19374.61
Ciper-3	21.348	5987	25186.85
Ciper-4	22.073	7261	24960.82
Delta	22.991	18816	25866.90
Totals		54328	

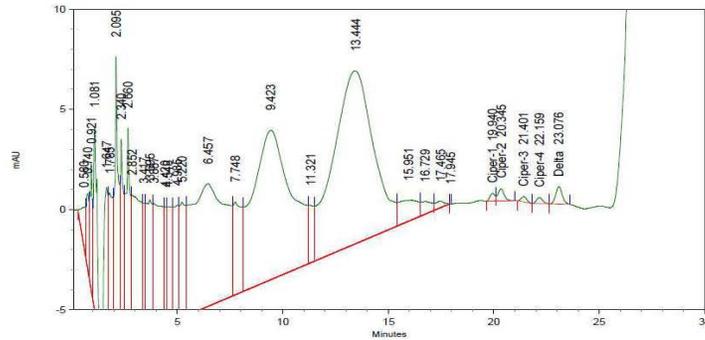


Fortificado 9 Cipermetrina-Deltametrina 14-5-2014





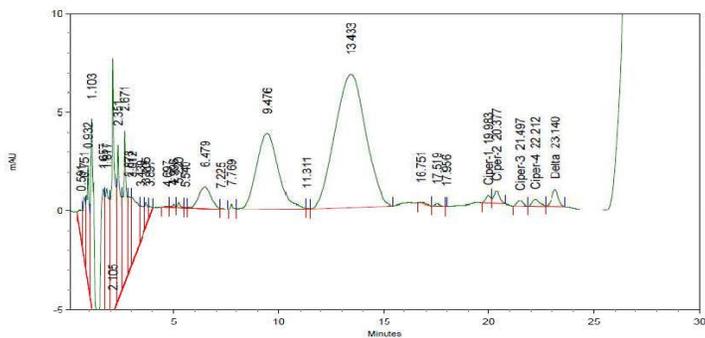
Fortificado 11 Cipermetrina-Deltametrina 14-5-2014



I: 210 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Ciper-1	19.940	6364	20669.05
Ciper-2	20.345	12406	22373.19
Ciper-3	21.401	4795	28620.92
Ciper-4	22.159	6075	25553.75
Delta	23.076	18632	26590.59
Totals		48272	

Fortificado 12 Cipermetrina-Deltametrina 14-5-2014

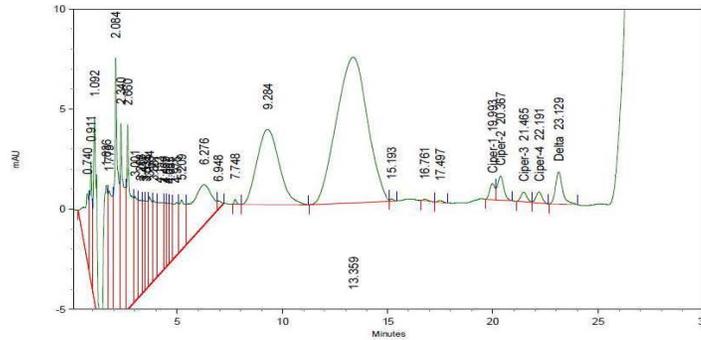


I: 210 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Ciper-1	19.983	6749	17857.74
Ciper-2	20.377	12281	21088.72
Ciper-3	21.497	4757	26042.58
Ciper-4	22.212	7600	24381.36
Delta	23.140	18089	26973.75
Totals		49476	



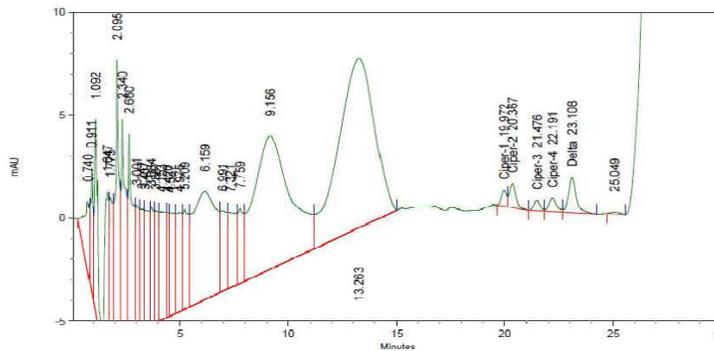
Fortificado 13 Cipermetrina-Deltametrina 14-5-2014



1: 210 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Ciper-1	19.993	14181	15243.95
Ciper-2	20.367	24192	19463.64
Ciper-3	21.465	9532	25775.01
Ciper-4	22.191	11329	26986.86
Delta	23.129	37599	26101.06
Totals		96833	

Fortificado 14 Cipermetrina-Deltametrina 14-5-2014

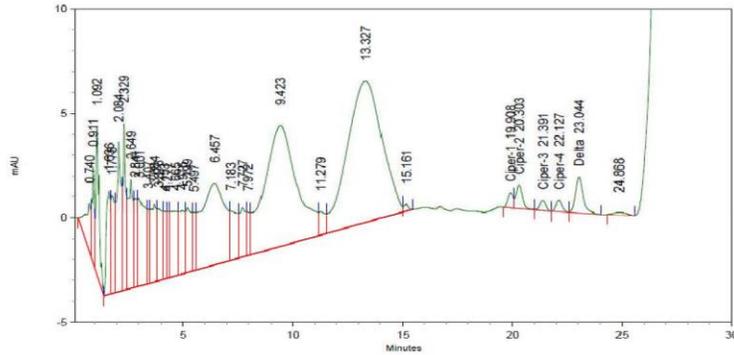


1: 210 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Ciper-1	19.972	13390	17293.98
Ciper-2	20.367	24123	19985.63
Ciper-3	21.476	9821	23827.42
Ciper-4	22.191	15827	20932.79
Delta	23.108	43062	23595.10
Totals		106223	



Fortificado 15 Cipermetrina-Deltametrina 14-5-2014

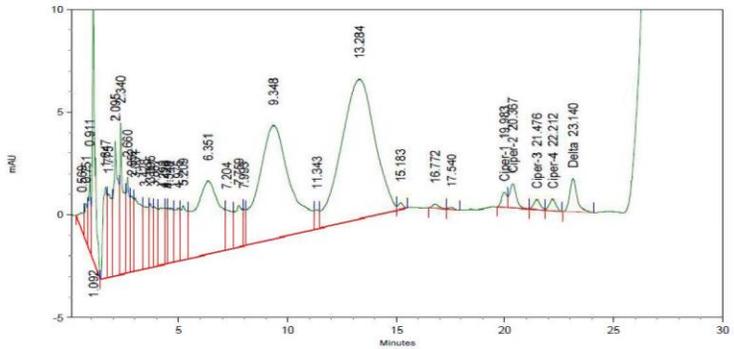


1: 210 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Ciper-1	19.908	12107	18054.13
Ciper-2	20.303	22461	21193.63
Ciper-3	21.391	9412	24869.12
Ciper-4	22.127	11280	26430.44
Delta	23.044	43171	22644.21

Totals		98431	
--------	--	-------	--

Fortificado 16 Cipermetrina-Deltametrina 14-5-2014



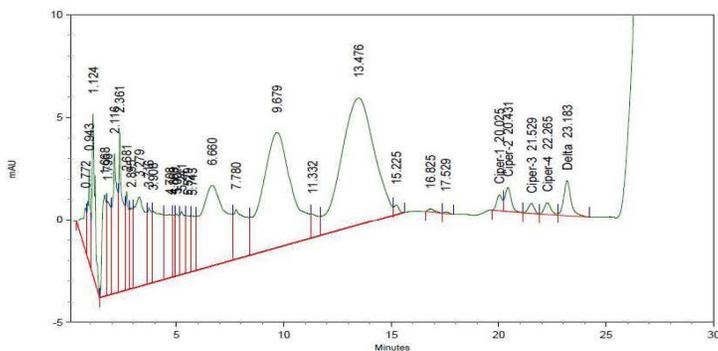
1: 210 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Ciper-1	19.983	12585	15706.17
Ciper-2	20.367	25272	19498.68
Ciper-3	21.476	10223	23334.50
Ciper-4	22.212	11572	25355.29
Delta	23.140	37490	25515.10

Totals		97142	
--------	--	-------	--



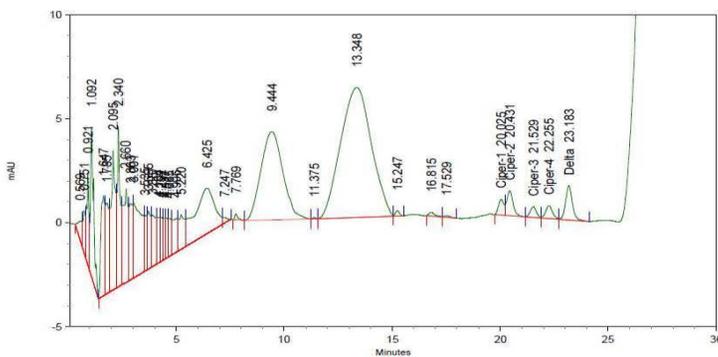
Fortificado 17 Cipermetrina-Deltametrina 14-5-2014



1: 210 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Ciper-1	20.025	13319	17051.56
Ciper-2	20.431	23815	20644.67
Ciper-3	21.529	9215	26810.12
Ciper-4	22.265	12638	24675.43
Delta	23.183	40250	25684.43
Totals		99237	

Fortificado 18 Cipermetrina-Deltametrina 14-5-2014



1: 210 nm, 8 nm

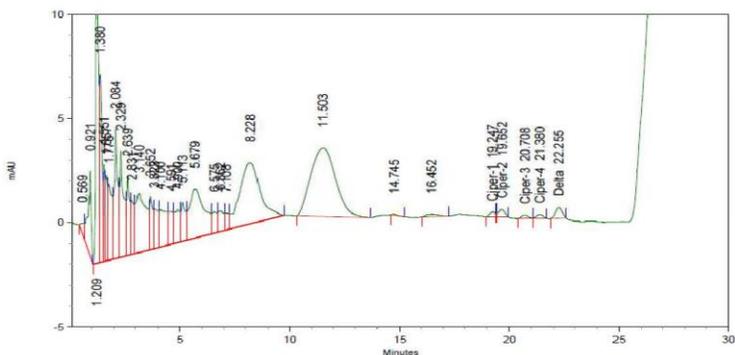
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Ciper-1	20.025	12882	18458.96
Ciper-2	20.431	24369	20786.60
Ciper-3	21.529	10213	25868.09
Ciper-4	22.255	13460	24525.08
Delta	23.183	36029	26909.28
Totals		96953	





Cromatogramas de Fortificados de Cipermetrina-Deltametrina 15-5-2014

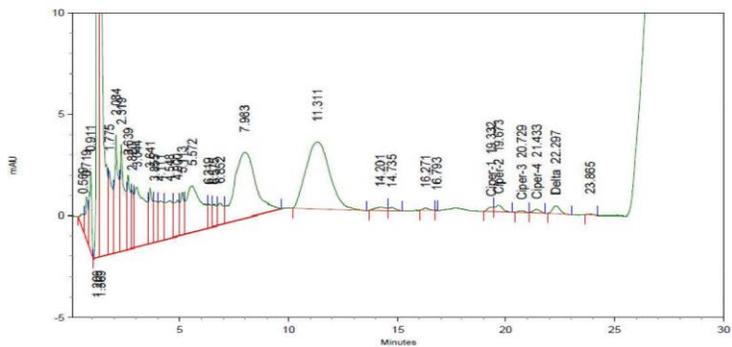
Fortificado 1 Cipermetrina-Deltametrina 15-5-2014



1: 210 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Ciper-1	19.247	3906	9891.58
Ciper-2	19.652	6915	16933.23
Ciper-3	20.708	3287	24962.82
Ciper-4	21.380	3717	24424.16
Delta	22.255	10938	23358.47
Totals		28763	

Fortificado 2 Cipermetrina-Deltametrina 15-5-2014

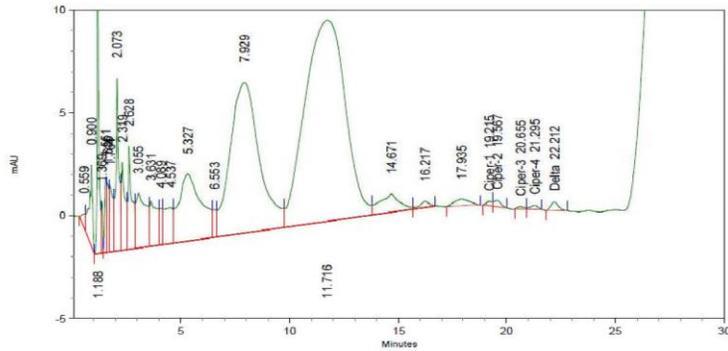


1: 210 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Ciper-1	19.332	4056	0.00
Ciper-2	19.673	8009	11634.43
Ciper-3	20.729	2201	0.00
Ciper-4	21.433	3943	20495.97
Delta	22.297	9985	18813.05
Totals		28194	



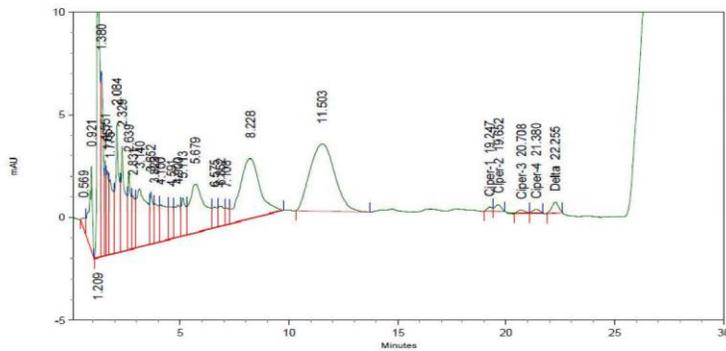
Fortificado 3 Cipermetrina-Deltametrina 15-5-2014



1: 210 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Ciper-1	19.215	3591	0.00
Ciper-2	19.567	6986	11081.45
Ciper-3	20.655	2385	0.00
Ciper-4	21.295	4340	0.00
Delta	22.212	9848	19645.52
Totals		27150	

Fortificado 4 Cipermetrina-Deltametrina 15-5-2014

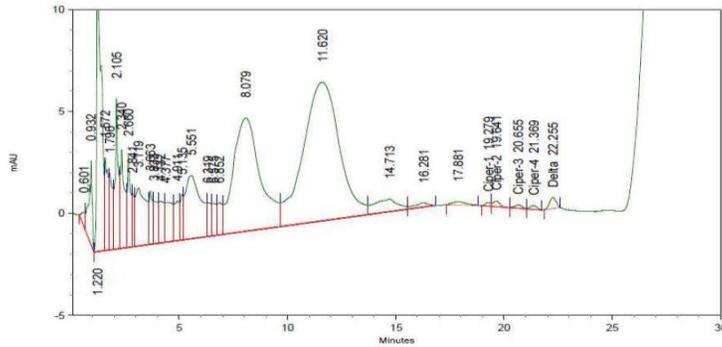


1: 210 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Ciper-1	19.247	3587	10416.36
Ciper-2	19.652	6780	17434.31
Ciper-3	20.708	3175	25645.71
Ciper-4	21.380	3683	24594.68
Delta	22.255	10938	23358.47
Totals		28163	



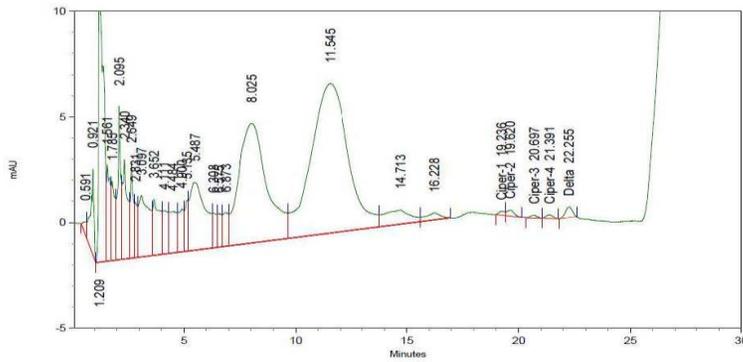
Fortificado 5 Cipermetrina-Deltametrina 15-5-2014



1: 210 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Ciper-1	19.279	3118	14440.63
Ciper-2	19.641	6095	13868.51
Ciper-3	20.655	3933	16867.57
Ciper-4	21.369	4109	14941.61
Delta	22.255	11386	22496.36
Totals		28641	

Fortificado 6 Cipermetrina-Deltametrina 15-5-2014

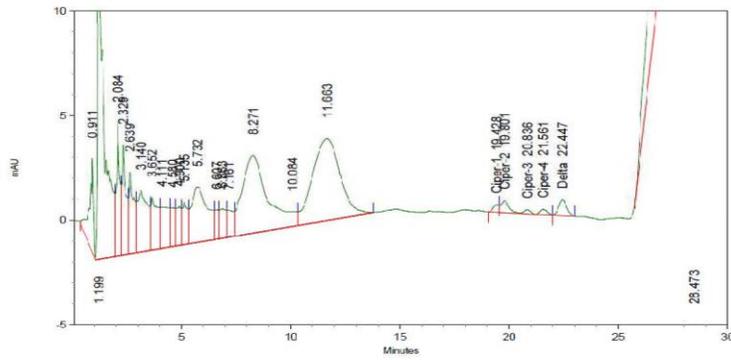


1: 210 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Ciper-1	19.236	3607	7417.84
Ciper-2	19.620	6404	12284.20
Ciper-3	20.697	2550	11225.56
Ciper-4	21.391	3563	13523.11
Delta	22.255	10725	21550.22
Totals		26849	

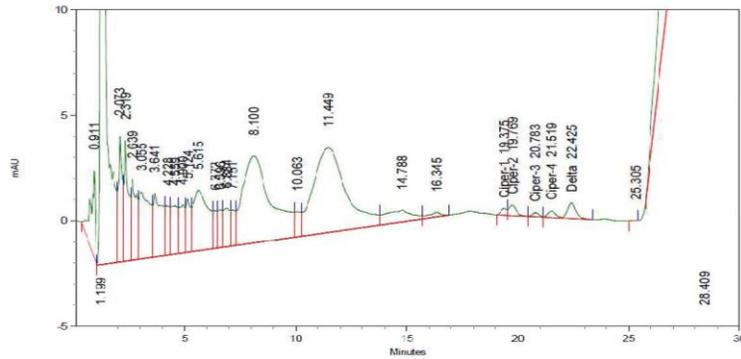


Fortificado 7 Cipermetrina-Deltametrina 15-5-2014



I: 210 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Ciper-1	19.428	6782	5615.79
Ciper-2	19.801	15060	11942.46
Ciper-3	20.836	4330	21936.19
Ciper-4	21.561	5962	20704.49
Delta	22.447	18572	18711.10
Totals		50806	

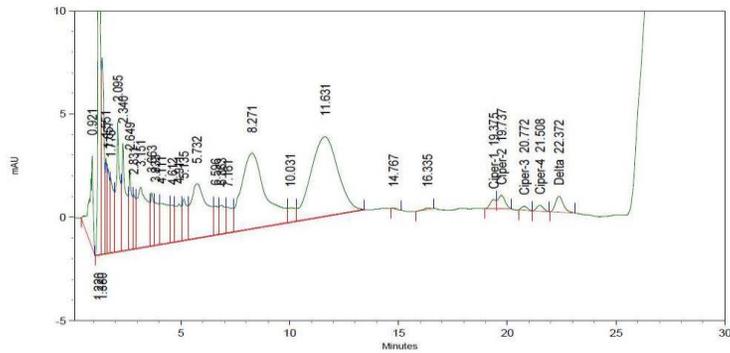
Fortificado 8 Cipermetrina-Deltametrina 15-5-2014



I: 210 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Ciper-1	19.375	5856	9039.55
Ciper-2	19.769	11144	13606.87
Ciper-3	20.783	3965	23495.20
Ciper-4	21.519	7359	18336.15
Delta	22.425	19357	18538.43
Totals		47681	



Fortificado 9 Cipermetrina-Deltametrina 15-5-2014

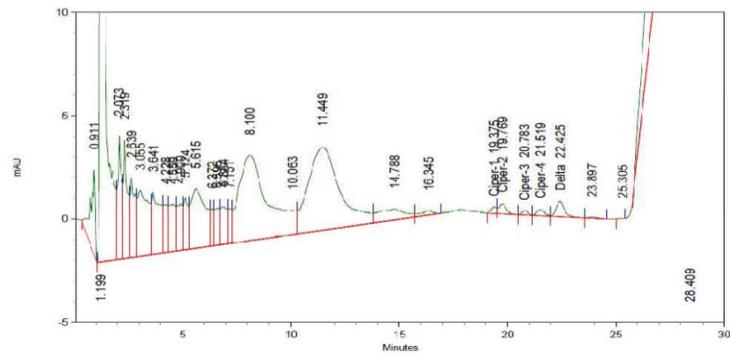


1: 210 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Ciper-1	19.375	7786	0.00
Ciper-2	19.737	14805	11675.25
Ciper-3	20.772	3751	25626.36
Ciper-4	21.508	6196	19422.51
Delta	22.372	19183	18450.12

Totals		51721	
--------	--	-------	--

Fortificado 10 Cipermetrina-Deltametrina 15-5-2014



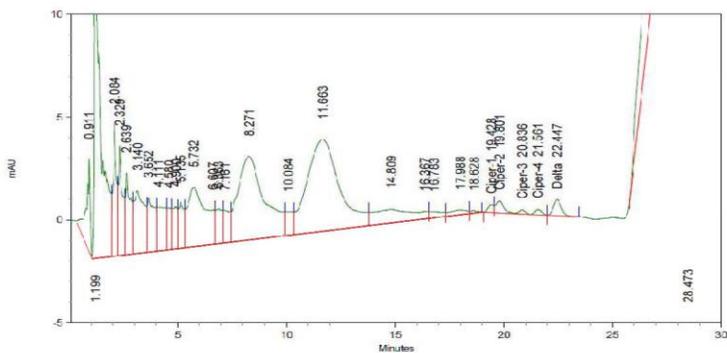
1: 210 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Ciper-1	19.375	5864	9000.07
Ciper-2	19.769	11206	13569.78
Ciper-3	20.783	4046	23098.90
Ciper-4	21.519	7507	18054.34
Delta	22.425	19779	18379.50

Totals		48402	
--------	--	-------	--



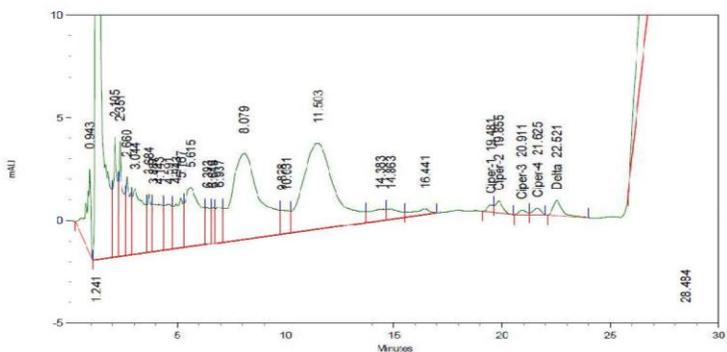
Fortificado 11 Cipermetrina-Deltametrina 15-5-2014



1: 210 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Ciper-1	19.428	6782	5615.79
Ciper-2	19.801	15060	11942.46
Ciper-3	20.836	4330	21936.19
Ciper-4	21.561	6114	20288.49
Delta	22.447	19470	18301.31
Totals		51756	

Fortificado 12 Cipermetrina-Deltametrina 15-5-2014

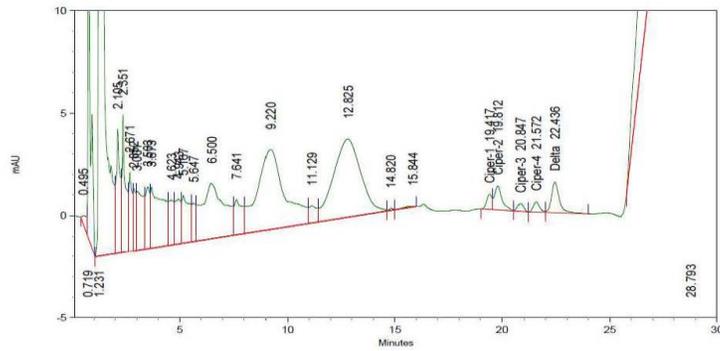


1: 210 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Ciper-1	19.481	6967	0.00
Ciper-2	19.855	13481	11996.43
Ciper-3	20.911	5130	17925.41
Ciper-4	21.625	7869	16645.97
Delta	22.521	21215	17761.04
Totals		54662	



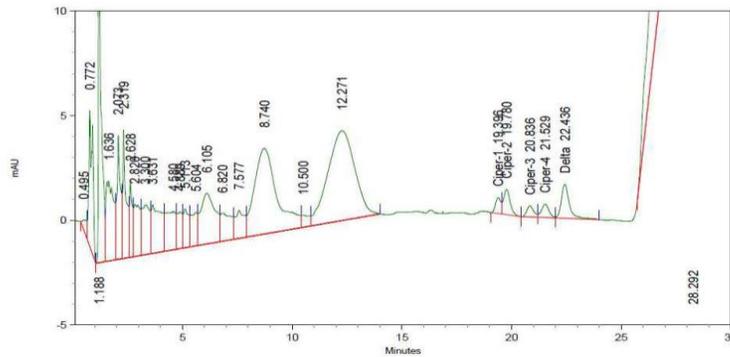
Fortificado 13 Cipermetrina-Deltametrina 15-5-2014



1: 210 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Ciper-1	19.417	12747	13779.04
Ciper-2	19.812	28546	15362.68
Ciper-3	20.847	7205	25439.82
Ciper-4	21.572	10420	24562.16
Delta	22.436	38231	20923.16
Totals		97149	

Fortificado 14 Cipermetrina-Deltametrina 15-5-2014

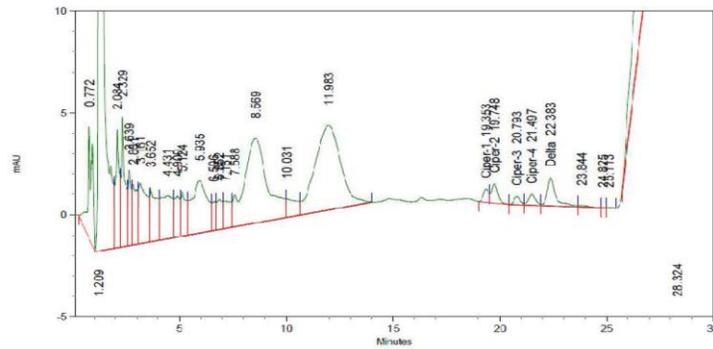


1: 210 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Ciper-1	19.396	12813	13444.31
Ciper-2	19.780	25361	17864.76
Ciper-3	20.836	11523	21280.16
Ciper-4	21.529	15202	19818.28
Delta	22.436	41264	21831.88
Totals		106163	



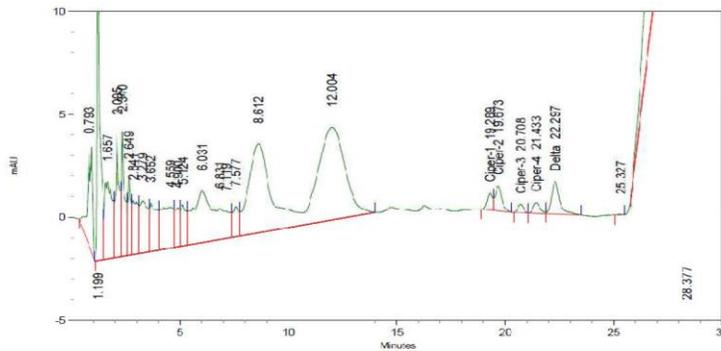
Fortificado 15 Cipermetrina-Deltametrina 15-5-2014



1: 210 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Ciper-1	19.253	11250	16376.64
Ciper-2	19.748	19680	18974.05
Ciper-3	20.793	8150	23554.83
Ciper-4	21.497	12526	20793.80
Delta	22.383	38944	21246.68
Totals		90550	

Fortificado 16 Cipermetrina-Deltametrina 15-5-2014

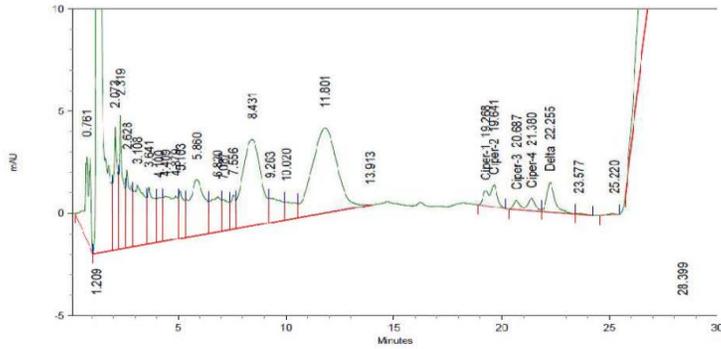


1: 210 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Ciper-1	19.289	13947	15498.77
Ciper-2	19.673	25656	18105.83
Ciper-3	20.708	7602	27756.98
Ciper-4	21.433	11375	22679.02
Delta	22.297	41061	21115.05
Totals		99541	



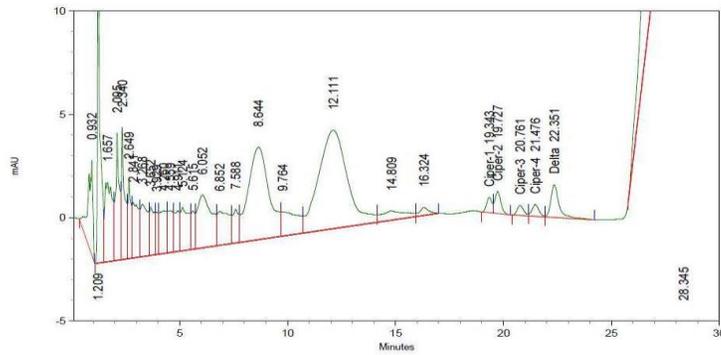
Fortificado 17 Cipermetrina-Deltametrina 15-5-2014



1: 210 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Ciper-1	19.268	12450	15509.58
Ciper-2	19.641	22084	17834.78
Ciper-3	20.683	9954	20101.77
Ciper-4	21.380	14756	18793.28
Delta	22.255	38221	20882.46
Totals		97465	

Fortificado 18 Cipermetrina-Deltametrina 15-5-2014



1: 210 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Ciper-1	19.343	12673	17105.27
Ciper-2	19.727	20598	20172.45
Ciper-3	20.761	10280	22192.78
Ciper-4	21.476	12803	20723.98
Delta	22.351	42239	21555.36
Totals		98593	



A N E X O 8

Resultados experimentales de validación de Diflubenzurón.



Resultados experimentales de revalidación de Diflubenzuron en choritos

Contenido

1.- Especificidad	03
2.- Linealidad	03
3- Recuperación de Diflubenzuron	05
4.- Exactitud	06
5.- Precisión	06
5.1.- Repetibilidad de Diflubenzuron	06
5.2.- Precisión intermedia de Diflubenzuron	08
6.- Límite de detección y cuantificación	09
6.1.- Límite de detección de Diflubenzuron	09
6.1.1.- Verificación del límite de detección	10
6.2.- Límite de cuantificación de Diflubenzuron	10
7.- Robustez	10





1.- Especificidad:

Ni fue necesario realizarla nuevamente.

2.- Linealidad:

Se evaluó la linealidad del método desarrollado, confeccionando una curva de calibración de 5 puntos durante 3 días diferentes. Las concentraciones aproximadas del analito fue de 25, 50, 125 y 500 ng/ml. Los resultados de las áreas obtenidas, las curvas de calibración estándar (con la ecuación de la recta y coeficiente de correlación) y el gráfico de residuales se presentan para el analito en la tabla 2 y figuras 1, 2

Tabla N° 2: áreas de curva de calibración de Diflubenzuron:

Fecha	conc. ng/ml	área obtenida	área promedio	área D.S.	área % C.V.
25/11/2014	25	3.274	3.098	155	5
26/11/2014	25	3.042			
03/12/2014	25	2.979			
25/11/2014	50	5.809	5.836	261	4
26/11/2014	50	6.110			
03/12/2014	50	5.590			
25/11/2014	125	14.948	15.224	295	2
26/11/2014	125	15.535			
03/12/2014	125	15.190			
25/11/2014	250	30.978	30.322	780	3
26/11/2014	250	30.528			
03/12/2014	250	29.460			
25/11/2014	500	60.775	60.730	1063	2
26/11/2014	500	61.770			
03/12/2014	500	59.645			



Figura N° 1

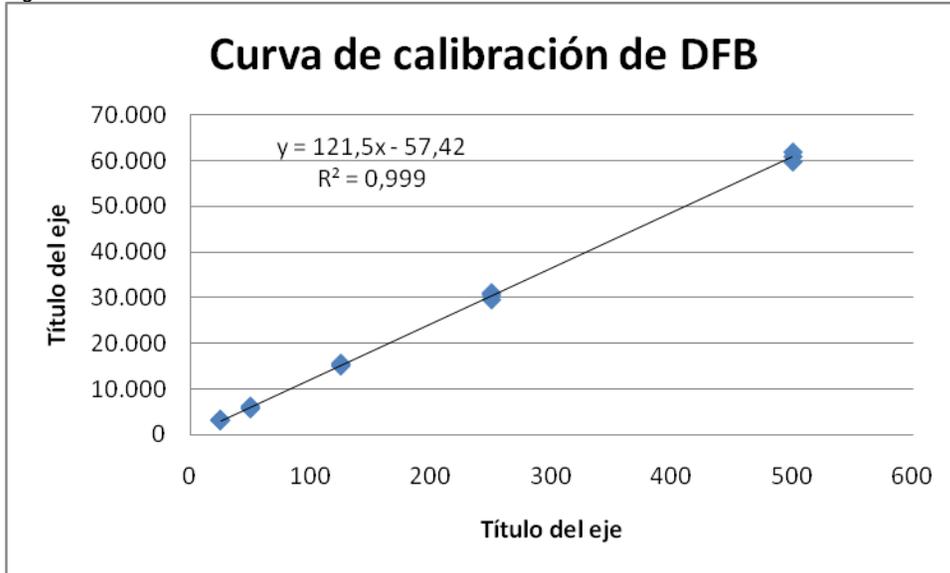
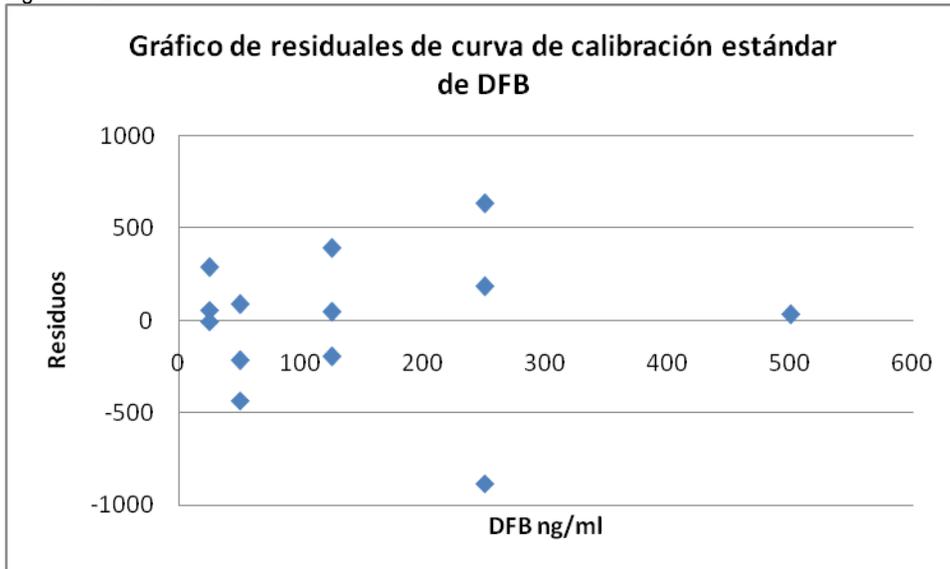


Figura N° 2:



Los cromatogramas se pueden observar en Anexo 8.1, cromatogramas de curva de calibración de Diflubenzuron.



3.- Recuperación:

Los resultados de recuperación de Diflubenzuron en los tres días se presentan en la tabla N° 3. Se presenta el valor promedio de recuperación (que se utilizará para el cálculo de las muestras problema), el coeficiente de variación y la desviación estándar para la confección de una carta control de recuperación tipo Shewhart (con el que se controlarán posteriormente los ensayos, para demostrar que la técnica está bajo control estadístico).

Tabla N°3: Recuperación de Diflubenzuron

Fecha	Nº for	conc intentada ng/g	conc obtenida ng/g	% rec
21/11/2014	1	100,0	98,2	98,2
	2	100,0	98,9	98,9
	3	100,0	106,8	106,8
	4	100,0	94,9	94,9
	5	100,0	106,4	106,4
	6	100,0	113,8	113,8
	7	200,0	206,9	103,5
	8	200,0	214,4	107,2
	9	200,0	205,1	102,6
	10	200,0	213,1	106,5
	11	200,0	206,3	103,2
	12	200,0	207,5	103,8
	13	400,0	412,1	103,0
	14	400,0	391,0	97,8
	15	400,0	399,7	99,9
	16	400,0	400,3	100,1
	17	400,0	394,6	98,7
	18	400,0	395,6	98,9
26/11/2014	1	100,0	113,1	113,1
	2	100,0	101,4	101,4
	3	100,0	109,7	109,7
	4	100,0	114,6	114,6
	5	100,0	106,4	106,4
	6	100,0	108,3	108,3
	7	200,0	206,8	103,4
	8	200,0	207,7	103,8
	9	200,0	204,1	102,0
	10	200,0	205,6	102,8
	11	200,0	211,2	105,6
	12	200,0	197,8	98,9
	13	400,0	412,5	103,1
	14	400,0	409,5	102,4
	15	400,0	402,7	100,7
	16	400,0	402,6	100,7
	17	400,0	404,7	101,2
	18	400,0	402,2	100,6
	1	100,0	98,6	98,6
	2	100,0	92,7	92,7
	3	100,0	92,1	92,1
	4	100,0	94,7	94,7
	5	100,0	90,1	90,1



03/12/2014	6	100,0	95,6	95,6
	7	200,0	194,3	97,1
	8	200,0	190,5	95,2
	9	200,0	184,3	92,2
	10	200,0	195,0	97,5
	11	200,0	195,7	97,9
	12	200,0	191,5	95,7
	13	400,0	395,0	98,8
	14	400,0	381,1	95,3
	15	400,0	399,3	99,8
	16	400,0	395,0	98,7
	17	400,0	394,0	98,5
	18	400,0	427,0	106,7
		Prom	101,1	
		DS	5,4	
		CV	5,3	
		prom + 2DS	111,9	
		prom - 2DS	90,3	
		prom + 3DS	117,3	
		prom - 3DS	85,0	

Los cromatogramas de recuperación, se pueden observar en los anexos 8.2, 8.3y 8.4

4.- Exactitud o veracidad:

No aplica

5.- Precisión:

5.1.- Repetibilidad:

Los resultados de recuperación de Diflubenzuron en los tres días se presentan en las tablas N° 4, 5 y 6. Se presenta el valor promedio de recuperación, la desviación estándar y el coeficiente de variación, de cada nivel de fortificación y del día.

Tabla N° 4: Recuperación de Diflubenzuron 25-09-2014

N° for	conc intentada ng/g	área	pendiente	intercepto	conc obtenida ng/g	% rec	prom	ds	cv
1	100,0	5.936	121,05	-8,47	98,2	98,2			
2	100,0	5.978			98,9	98,9			
3	100,0	6.456			106,8	106,8			
4	100,0	5.734			94,9	94,9			
5	100,0	6.432			106,4	106,4			
6	100,0	6.877			113,8	113,8	103,2	7,0	6,8
7	200,0	12.516			206,9	103,5			
8	200,0	12.970			214,4	107,2			
9	200,0	12.406			205,1	102,6			



10	200,0	12.888			213,1	106,5			
11	200,0	12.480			206,3	103,2			
12	200,0	12.551			207,5	103,8	104,5	1,9	1,9
13	400,0	24.935			412,1	103,0			
14	400,0	23.658			391,0	97,8			
15	400,0	24.185			399,7	99,9			
16	400,0	24.221			400,3	100,1			
17	400,0	23.877			394,6	98,7			
18	400,0	23.935			395,6	98,9	99,7	1,8	1,8
						prom	102,4		
						ds	4,6		
						cv	4,5		

Tabla N° 5: recuperación de Diflubenzuron 26-09-2014

N° for	conc intentada ng/g	área	pendiente	intercepto	conc obtenida ng/g	% rec	prom	ds	cv
1	100,0	6.836	121,05	-8,47	113,1	113,1			
2	100,0	6.129			101,4	101,4			
3	100,0	6.630			109,7	109,7			
4	100,0	6.928			114,6	114,6			
5	100,0	6.432			106,4	106,4			
6	100,0	6.547			108,3	108,3	108,9	4,8	4,4
7	200,0	12.505			206,8	103,4			
8	200,0	12.561			207,7	103,8			
9	200,0	12.342			204,1	102,0			
10	200,0	12.438			205,6	102,8			
11	200,0	12.773			211,2	105,6			
12	200,0	11.962			197,8	98,9	102,8	2,2	2,2
13	400,0	24.957			412,5	103,1			
14	400,0	24.776			409,5	102,4			
15	400,0	24.366			402,7	100,7			
16	400,0	24.359			402,6	100,7			
17	400,0	24.484			404,7	101,2			
18	400,0	24.337			402,2	100,6	101,4	1,1	1,1
						prom	104,4		
						ds	4,4		
						cv	4,3		



Tabla N° 6: recuperación de Diflubenzuron 3-12-2014

N° for	conc intentada ng/g	área	pendiente	intercepto	conc obtenida ng/g	% rec	prom	ds	cv	
1	100,0	5.957	121,05	-8,47	98,6	98,6				
2	100,0	5.601			92,7	92,7				
3	100,0	5.563			92,1	92,1				
4	100,0	5.723			94,7	94,7				
5	100,0	5.443			90,1	90,1				
6	100,0	5.775			95,6	95,6	93,9	3,0	3,2	
7	200,0	11.751			194,3	97,1				
8	200,0	11.520			190,5	95,2				
9	200,0	11.149			184,3	92,2				
10	200,0	11.796			195,0	97,5				
11	200,0	11.837			195,7	97,9				
12	200,0	11.579			191,5	95,7	95,9	2,1	2,2	
13	400,0	23.899			395,0	98,8				
14	400,0	23.058			381,1	95,3				
15	400,0	24.159			399,3	99,8				
16	400,0	23.896			395,0	98,7				
17	400,0	23.839			394,0	98,5				
18	400,0	25.834			427,0	106,7	99,6	3,8	3,8	
						prom	96,5			
						ds	3,8			
						cv	3,9			

Los cromatogramas de recuperación se pueden observar en los anexos 8.2, 8.3 y 8.4.

5.2 Precisión intermedia:

Los resultados de la precisión intermedia de Diflubenzuron, se presentan en la tabla 7.



Tabla N° 7: Precisión intermedia de Diflubenzuron 13-02-2014

Fecha	Nº for	conc intentada ng/g	área	pendiente	intercepto	conc obtenida ng/g	% rec	prom	ds	cv
25-nov	1	100,0	5.936	121	-8	98,2	98,2			
25-nov	2	100,0	5.978			98,9	98,9			
25-nov	3	100,0	6.456			106,8	106,8			
25-nov	4	100,0	5.734			94,9	94,9			
25-nov	5	100,0	6.432			106,4	106,4			
25-nov	6	100,0	6.877			113,8	113,8			
26-nov	1	100,0	6.836			113,1	113,1			
26-nov	2	100,0	6.129			101,4	101,4	102,0	8,0	7,9
26-nov	3	100,0	6.630			109,7	109,7			
26-nov	4	100,0	6.928			114,6	114,6			
26-nov	5	100,0	6.432			106,4	106,4			
26-nov	6	100,0	6.547			108,3	108,3			
03-dic	1	100,0	5.957			98,6	98,6			
03-dic	2	100,0	5.601			92,7	92,7			
03-dic	3	100,0	5.563			92,1	92,1			
03-dic	4	100,0	5.723			94,7	94,7			
03-dic	5	100,0	5.443			90,1	90,1			
03-dic	6	100,0	5.775			95,6	95,6			
25-nov	7	200,0	12.516			206,9	103,5			
25-nov	8	200,0	12.970			214,4	107,2			
25-nov	9	200,0	12.406			205,1	102,6			
25-nov	10	200,0	12.888			213,1	106,5			
25-nov	11	200,0	12.480			206,3	103,2			
25-nov	12	200,0	12.551			207,5	103,8			
26-nov	7	200,0	12.505			206,8	103,4			
26-nov	8	200,0	12.561			207,7	103,8	101,1	4,3	4,2
26-nov	9	200,0	12.342			204,1	102,0			
26-nov	10	200,0	12.438			205,6	102,8			
26-nov	11	200,0	12.773			211,2	105,6			
26-nov	12	200,0	11.962			197,8	98,9			
03-dic	7	200,0	11.751			194,3	97,1			
03-dic	8	200,0	11.520			190,5	95,2			
03-dic	9	200,0	11.149			184,3	92,2			
03-dic	10	200,0	11.796			195,0	97,5			
03-dic	11	200,0	11.837			195,7	97,9			
03-dic	12	200,0	11.579			191,5	95,7			
25-nov	13	400,0	24.935			412,1	103,0			
25-nov	14	400,0	23.658			391,0	97,8			
25-nov	15	400,0	24.185			399,7	99,9			
25-nov	16	400,0	24.221			400,3	100,1			
25-nov	17	400,0	23.877			394,6	98,7			
25-nov	18	400,0	23.935			395,6	98,9			
26-nov	13	400,0	24.957			412,5	103,1			
26-nov	14	400,0	24.776			409,5	102,4	100,3	2,5	2,5
26-nov	15	400,0	24.366			402,7	100,7			
26-nov	16	400,0	24.359			402,6	100,7			
26-nov	17	400,0	24.484			404,7	101,2			
26-nov	18	400,0	24.337			402,2	100,6			
03-dic	13	400,0	23.899			395,0	98,8			
03-dic	14	400,0	23.058			381,1	95,3			
03-dic	15	400,0	24.159			399,3	99,8			
03-dic	16	400,0	23.896			395,0	98,7			
03-dic	17	400,0	23.839			394,0	98,5			
03-dic	18	400,0	25.834			427,0	106,7			

Los cromatogramas se pueden observar en los anexos 8.2, 8.3 y 8.4.



6.- Límite de detección y cuantificación:

6.1.- El límite de detección (LD) de Diflubenzuron se presenta en la tabla N°8.

Tabla 8 LD y LC de Diflubenzuron.

Fecha	conc intentada ng/g	area obtenida
25/11/2014	100,0	5936
25/11/2014	100,0	5978
25/11/2014	100,0	6456
25/11/2014	100,0	5734
25/11/2014	100,0	6432
25/11/2014	100,0	6877
26/11/2014	100,0	6836
26/11/2014	100,0	6129
26/11/2014	100,0	6630
26/11/2014	100,0	6928
26/11/2014	100,0	6432
26/11/2014	100,0	6547
03/12/2014	100,0	5957
03/12/2014	100,0	5601
03/12/2014	100,0	5563
03/12/2014	100,0	5723
03/12/2014	100,0	5443
03/12/2014	100,0	5775
	DS	484,813
	pendiente	121
	intercepto	-8
	recuperación	1,000
	LD	26,6
	LC	80,2

6.2.-El límite de cuantificación (LC) de Diflubenzuron se presenta en la tabla N° 8.

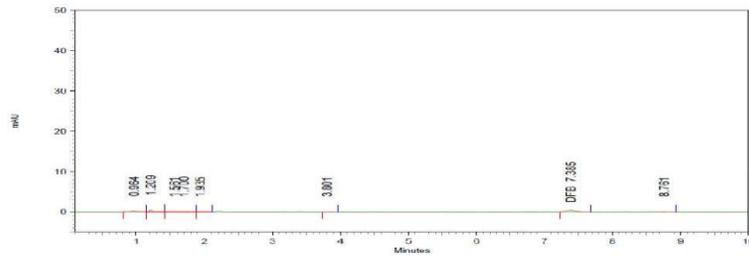
7.- Robustez:

El coeficiente de variación total de la recuperación (CV% total) de 5.3%, da una indicación de la robustez del método



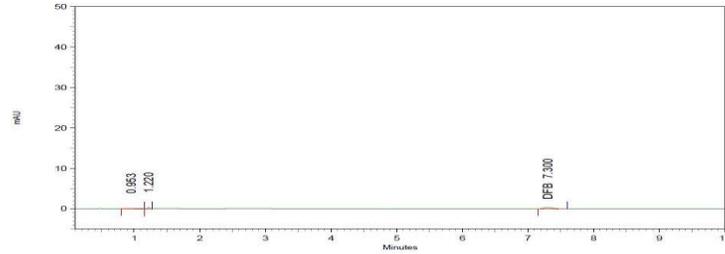
Cromatogramas de Curva de calibraci3n est3ndar de revalidaci3n de Diflubenzur3n

Est3ndar Diflubenzur3n (25 ppb) 25-11-2014



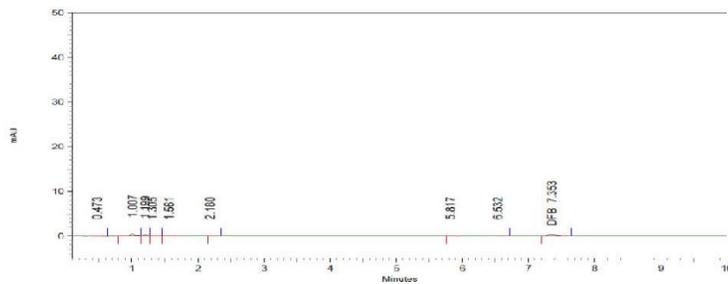
3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.385	3274	15221.97

Est3ndar Diflubenzur3n (25 ppb) 26-11-2014



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.300	3042	14808.69

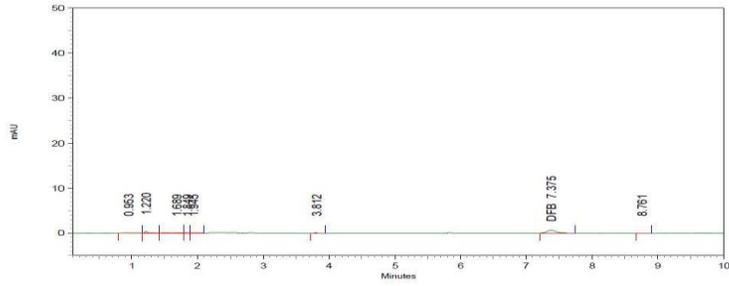
Est3ndar Diflubenzur3n (25 ppb) 03-12-2014



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.353	2979	15238.89

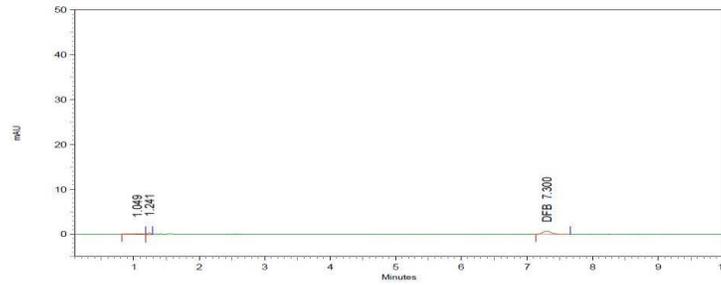


Estándar Diflubenzurón (50 ppb) 25-11-2014



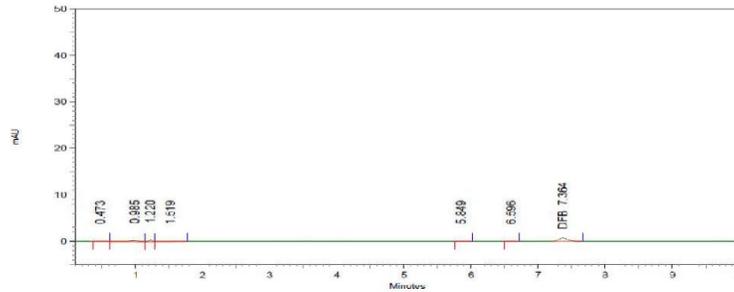
3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.375	5809	14379.17

Estándar Diflubenzurón (50 ppb) 26-11-2014



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.300	6110	14854.69

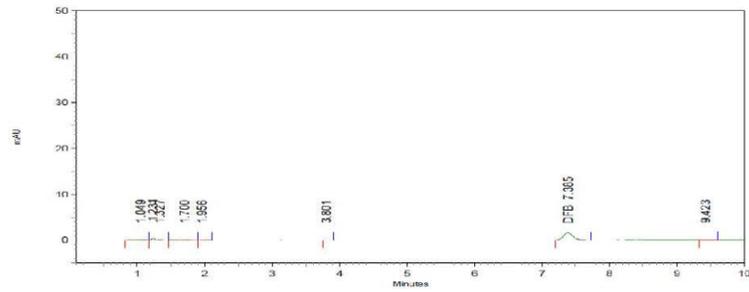
Estándar Diflubenzurón (50 ppb) 03-12-2014



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.364	5590	15980.47

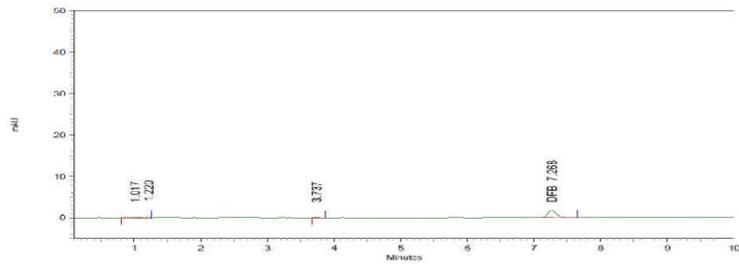


Est3ndar Diflubenzur3n (125 ppb) 25-11-2014



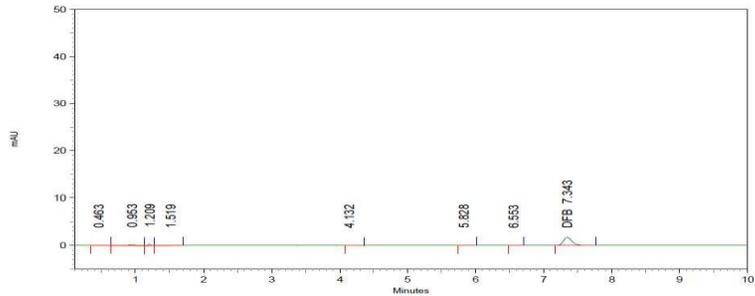
3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.385	14948	14729.50

Est3ndar Diflubenzur3n (125 ppb) 26-11-2014



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.268	15535	14637.85

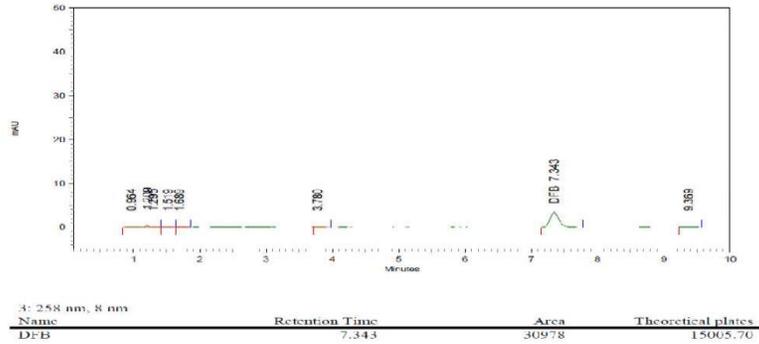
Est3ndar Diflubenzur3n (125 ppb) 03-12-2014



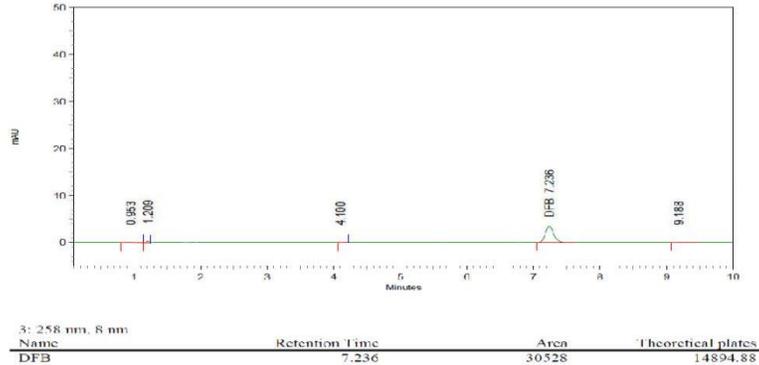
3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.343	15190	15764.24



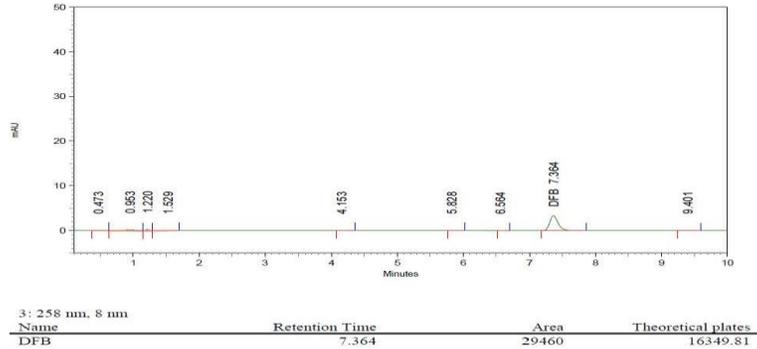
Est3ndar Diflubenzur3n (250 ppb) 25-11-2014



Est3ndar Diflubenzur3n (250 ppb) 26-11-2014

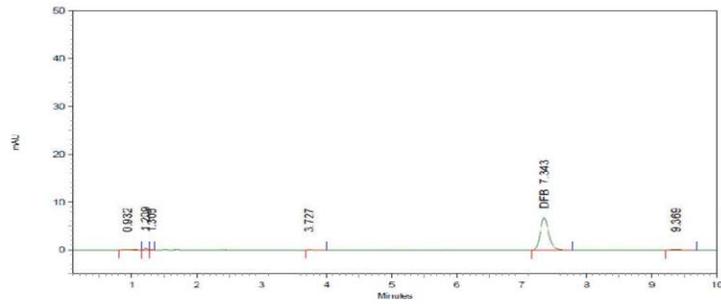


Est3ndar Diflubenzur3n (250 ppb) 03-12-2014



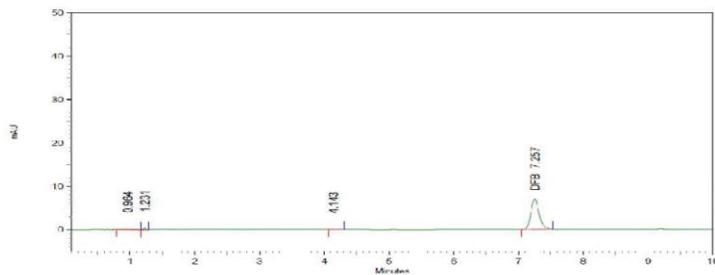


Est3ndar Diflubenzur3n (500 ppb) 25-11-2014



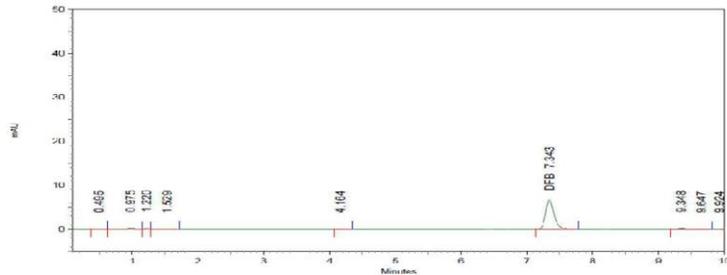
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.343	60775	14944.83

Est3ndar Diflubenzur3n (500 ppb) 26-11-2014



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.257	61009	15145.35

Est3ndar Diflubenzur3n (500 ppb) 03-12-2014



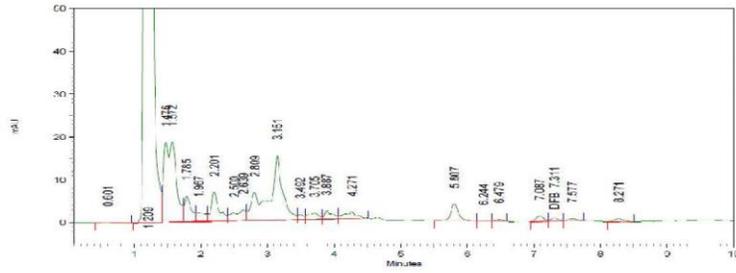
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.343	59615	15471.01





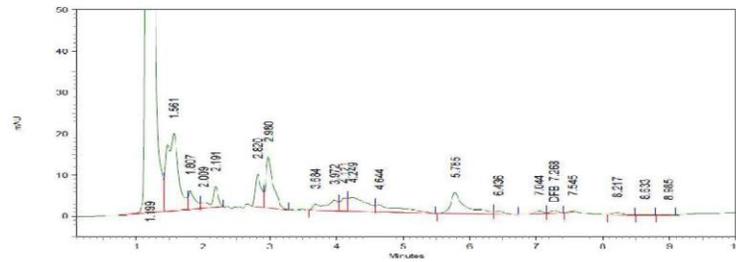
Cromatogramas de Fortificados de Diflubenzurón 25-11-2014

Fortificado 1 Diflubenzurón 25-11-2014



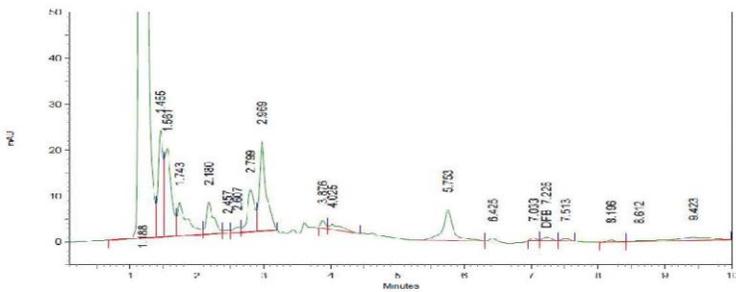
3: 258 mm, 8 mm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.311	59.46	14779.48

Fortificado 2 Diflubenzurón 25-11-2014



3: 258 mm, 8 mm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.268	59.78	18220.99

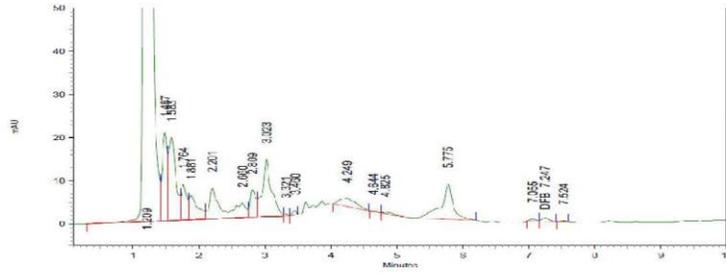
Fortificado 3 Diflubenzurón 25-11-2014



3: 258 mm, 8 mm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.225	64.56	16528.53

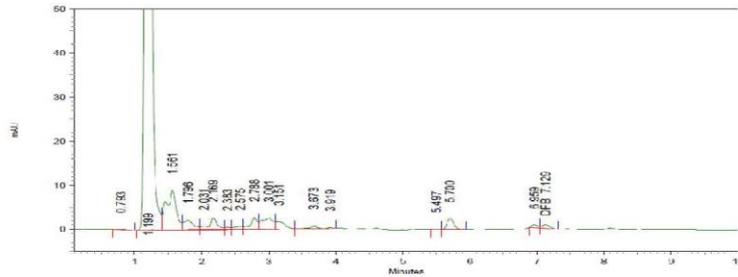


Fortificado 4 Diflubenzurón 25-11-2014



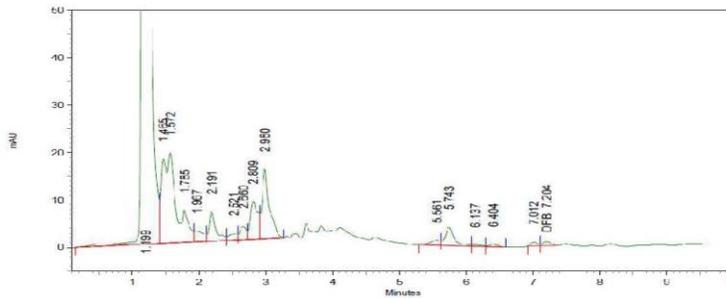
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.247	5734	17260.52

Fortificado 5 Diflubenzurón 25-11-2014



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.129	6432	14878.79

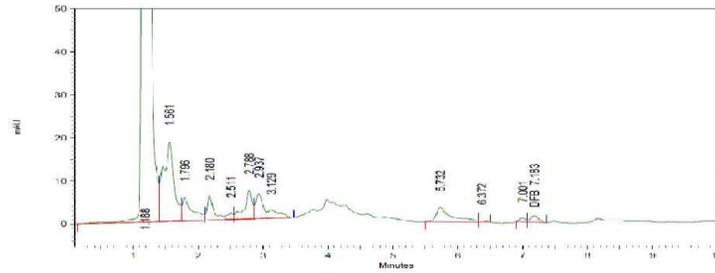
Fortificado 6 Diflubenzurón 25-11-2014



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.204	6877	13847.72

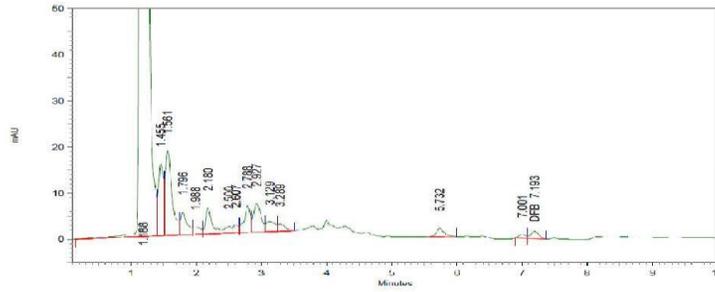


Fortificado 7 Diflubenzur3n 25-11-2014



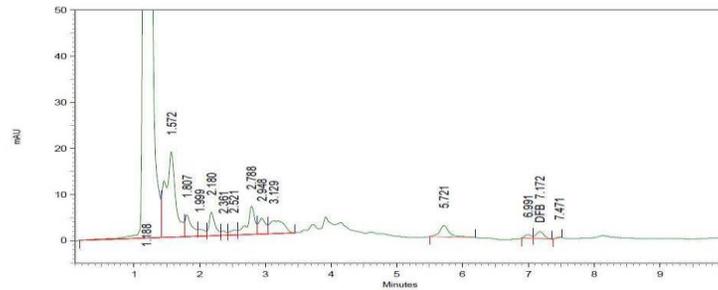
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.183	12416	15096.84

Fortificado 8 Diflubenzur3n 25-11-2014



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.193	12970	15416.46

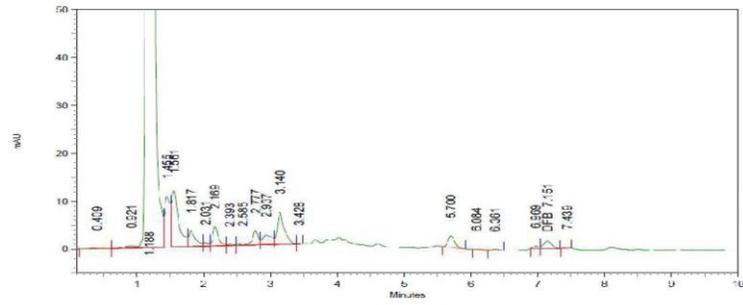
Fortificado 9 Diflubenzur3n 25-11-2014



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.172	12406	15128.02



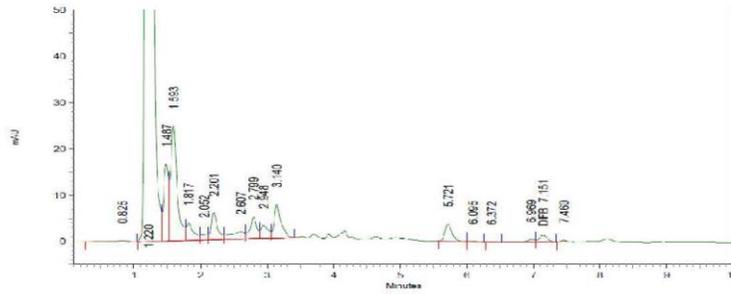
Fortificado 10 Diflubenzurón 25-11-2014



3: 258 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.151	12888	15780.50

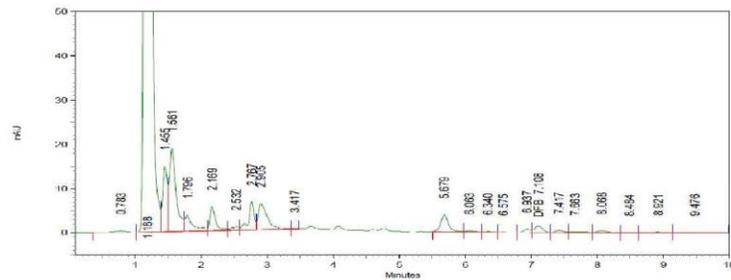
Fortificado 11 Diflubenzurón 25-11-2014



3: 258 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.151	12180	14136.95

Fortificado 12 Diflubenzurón 25-11-2014

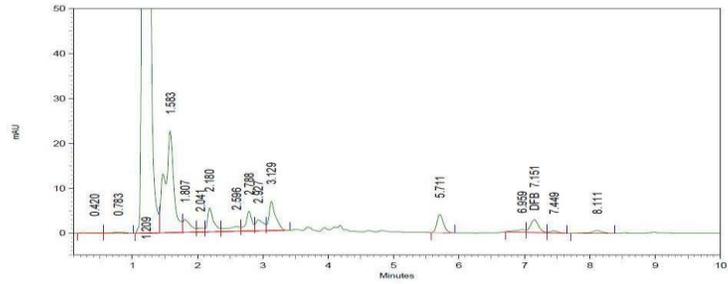


3: 258 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.108	12551	14249.22

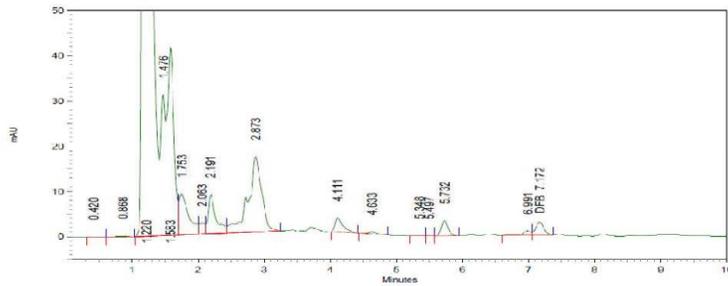


Fortificado 13 Diflubenzur3n 25-11-2014



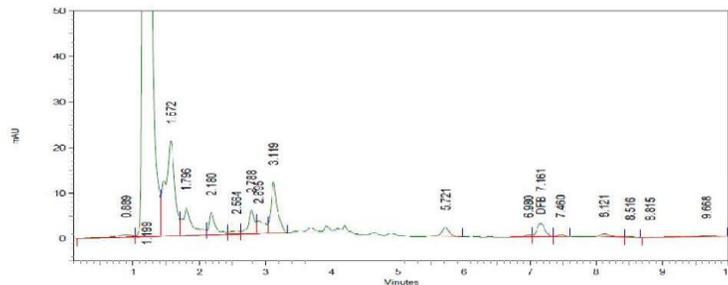
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.151	24935	15513.01

Fortificado 14 Diflubenzur3n 25-11-2014



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.172	23658	15244.81

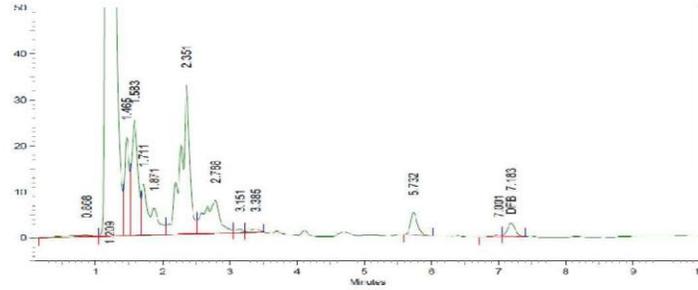
Fortificado 15 Diflubenzur3n 25-11-2014



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.161	24185	15924.51

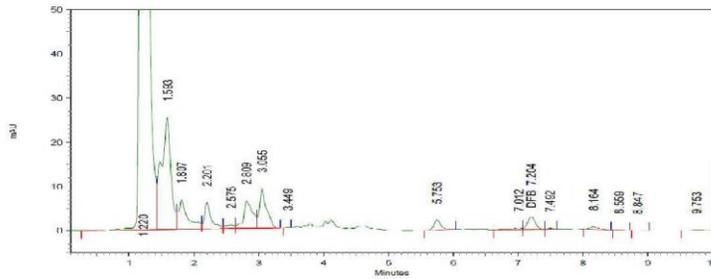


Fortificado 16 Diflubenzur3n 25-11-2014



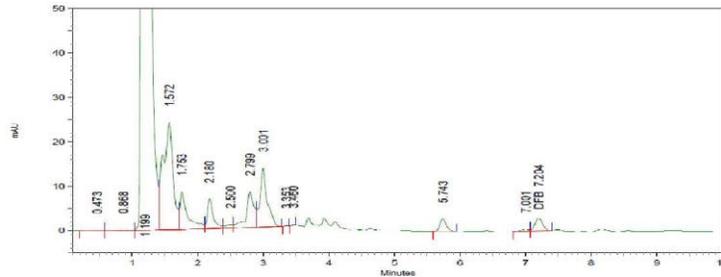
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DI 13	7.183	24221	16164.44

Fortificado 17 Diflubenzur3n 25-11-2014



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.204	23877	16043.13

Fortificado 18 Diflubenzur3n 25-11-2014

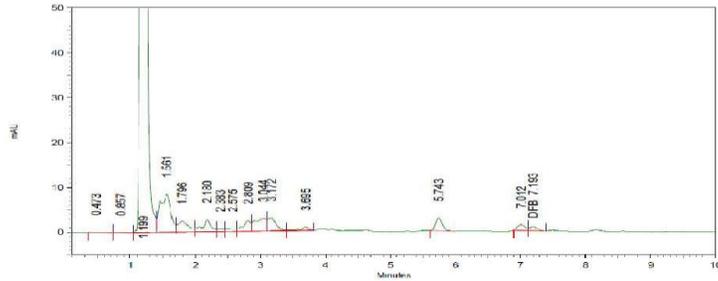


Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DI 13	7.204	23935	16645.82



Cromatogramas de Fortificados de Diflubenzurón 26-11-2014

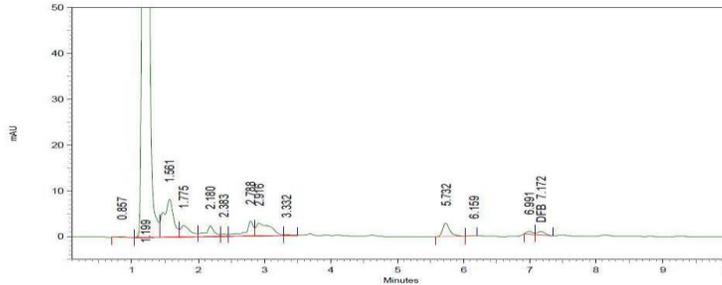
Fortificado 1 Diflubenzurón 26-11-2014



3: 258 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.193	6830	10189.23

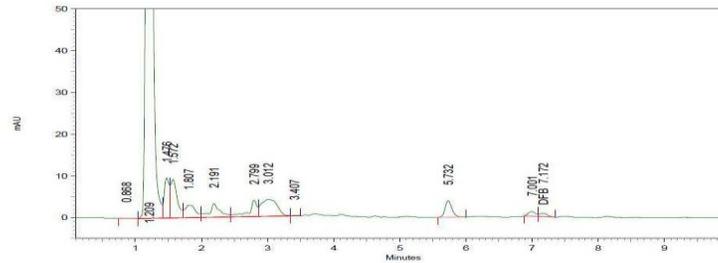
Fortificado 2 Diflubenzurón 26-11-2014



3: 258 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.172	6129	15080.63

Fortificado 3 Diflubenzurón 26-11-2014

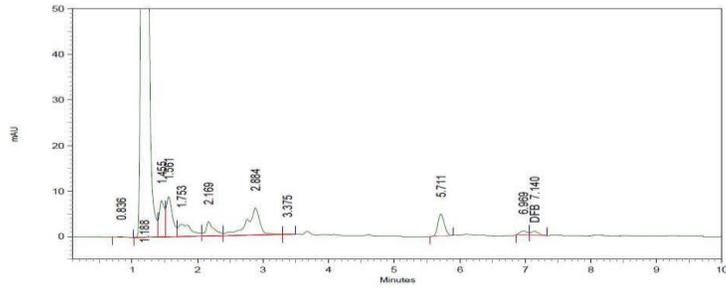


3: 258 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.172	6630	10250.85

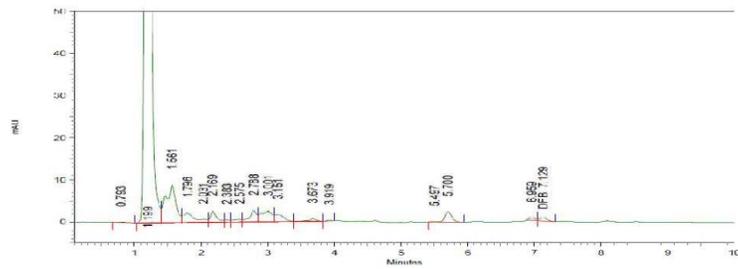


Fortificado 4 Diflubenzur3n 26-11-2014



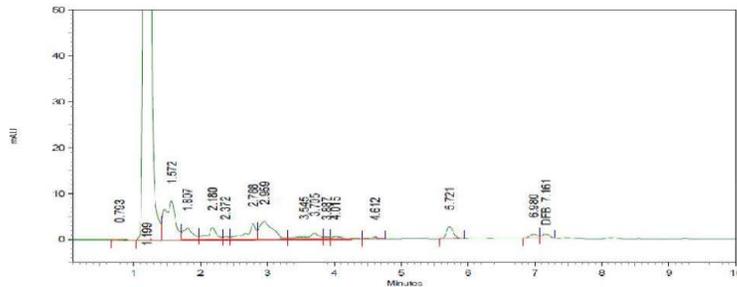
3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.140	6928	10817.43

Fortificado 5 Diflubenzur3n 26-11-2014



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.129	6432	14878.79

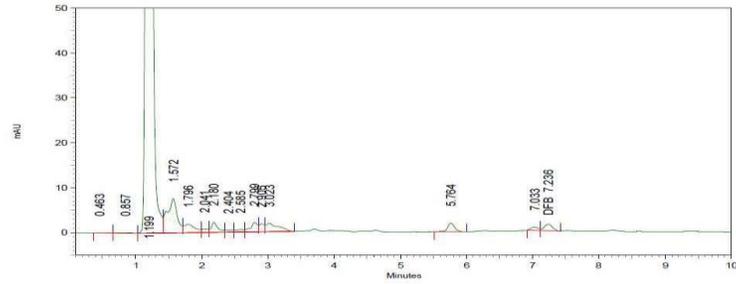
Fortificado 6 Diflubenzur3n 26-11-2014



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.161	6547	13476.63

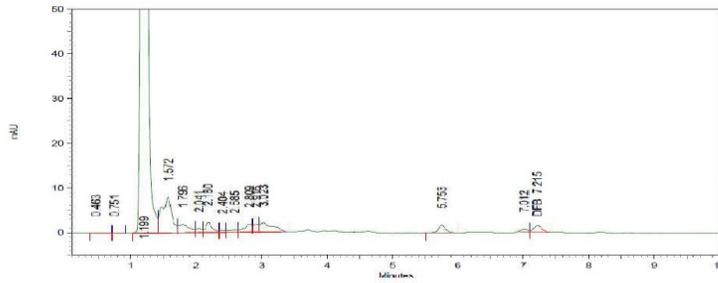


Fortificado 7 Diflubenzur3n 26-11-2014



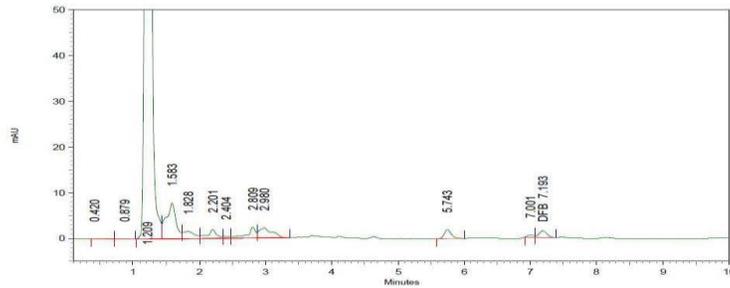
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.236	12505	15152.72

Fortificado 8 Diflubenzur3n 26-11-2014



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.215	12561	15330.01

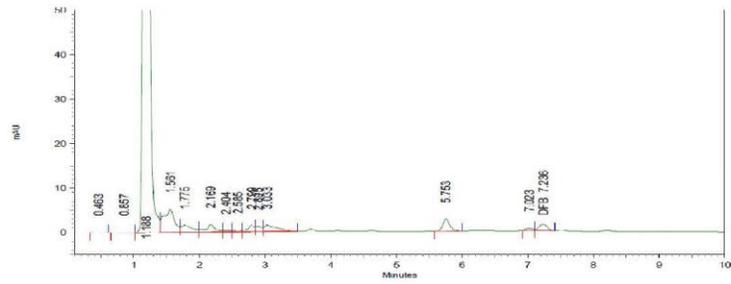
Fortificado 9 Diflubenzur3n 26-11-2014



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.193	12342	15200.12

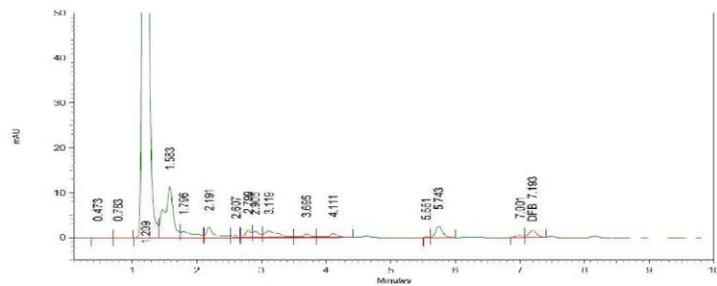


Fortificado 10 Diflubenzurón 26-11-2014



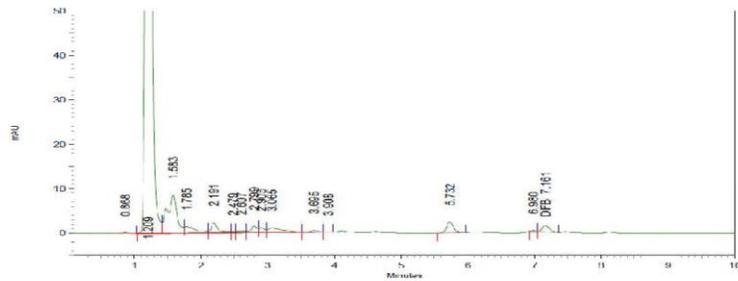
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.236	12438	15234.13

Fortificado 11 Diflubenzurón 26-11-2014



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.193	12773	14998.74

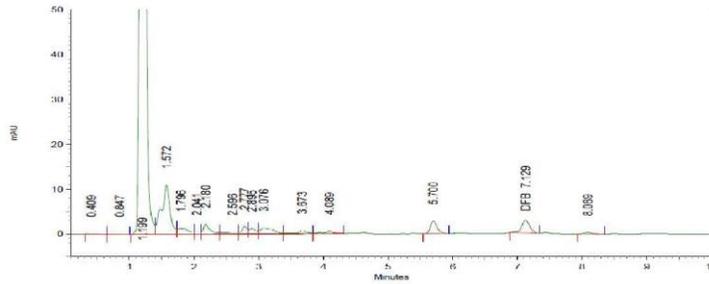
Fortificado 12 Diflubenzurón 26-11-2014



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.161	11962	16114.67



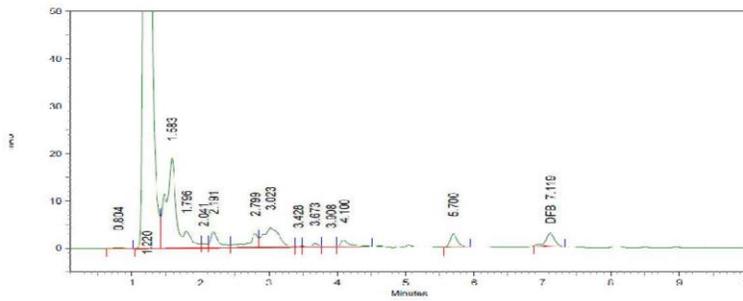
Fortificado 13 Diflubenzurón 26-11-2014



3: 258 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.129	24957	15908.24

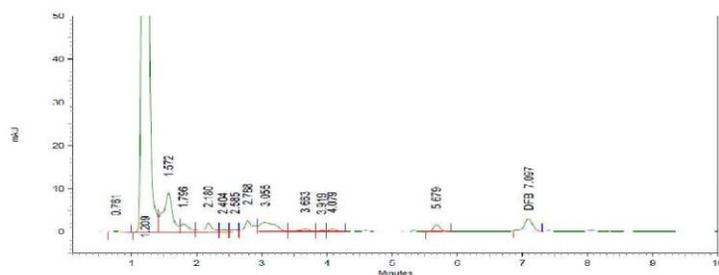
Fortificado 14 Diflubenzurón 26-11-2014



3: 258 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.119	24776	15887.67

Fortificado 15 Diflubenzurón 26-11-2014

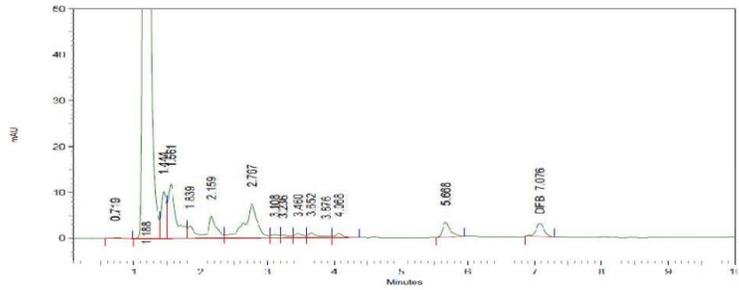


3: 258 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.067	24366	16126.19

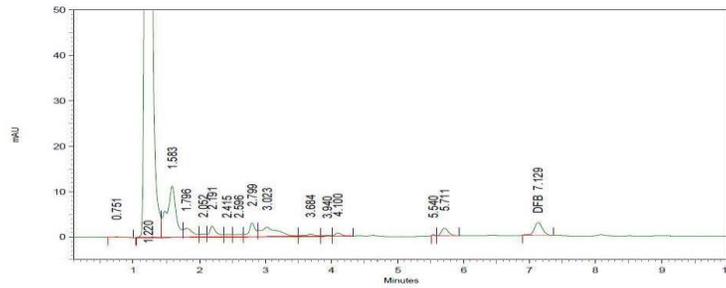


Fortificado 16 Diflubenzur3n 26-11-2014



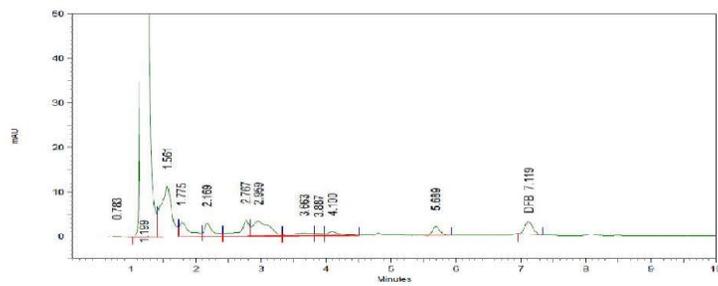
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.076	24359	16332.83

Fortificado 17 Diflubenzur3n 26-11-2014



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.129	24484	16026.41

Fortificado 18 Diflubenzur3n 26-11-2014

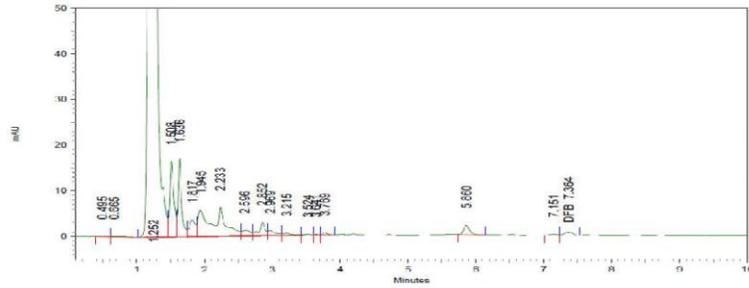


Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.119	24337	14215.48



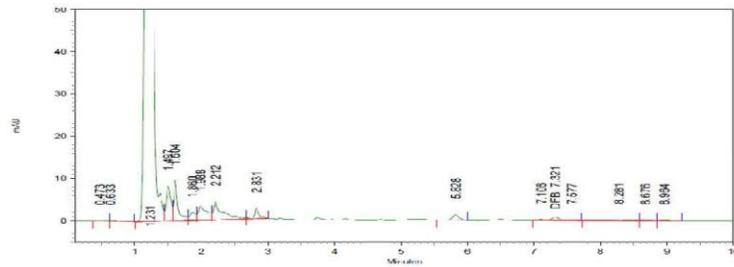
Cromatogramas de Fortificados de Diflubenzur3n 03-12-2014

Fortificado 1 Diflubenzur3n 03-12-2014



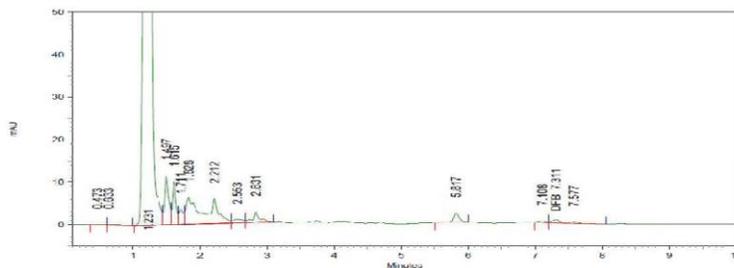
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.364	5957	17368.91

Fortificado 2 Diflubenzur3n 03-12-2014



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.321	5601	18274.58

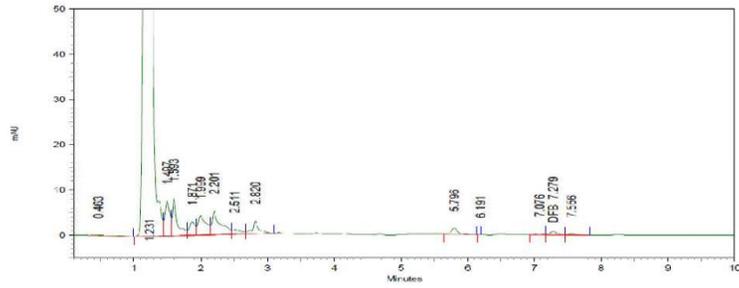
Fortificado 3 Diflubenzur3n 03-12-2014



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.311	5563	17892.92

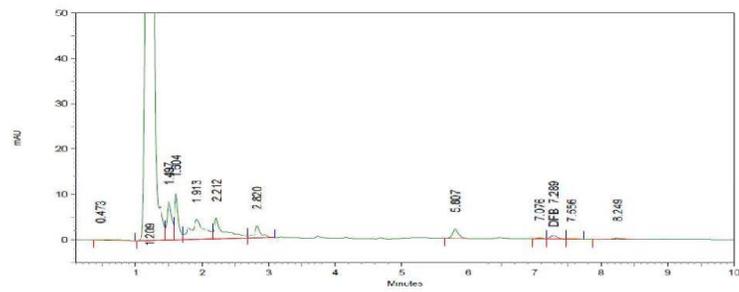


Fortificado 4 Diflubenzur3n 03-12-2014



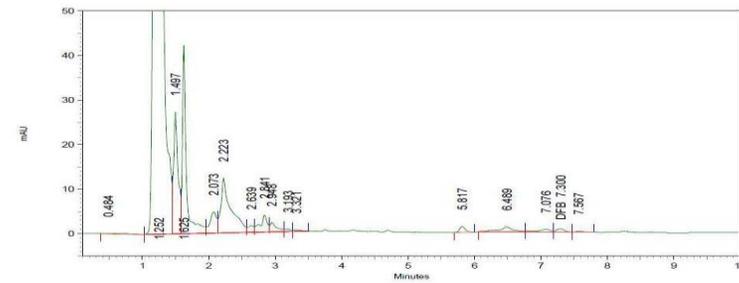
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.279	5723	18787.62

Fortificado 5 Diflubenzur3n 03-12-2014



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.289	5413	19370.07

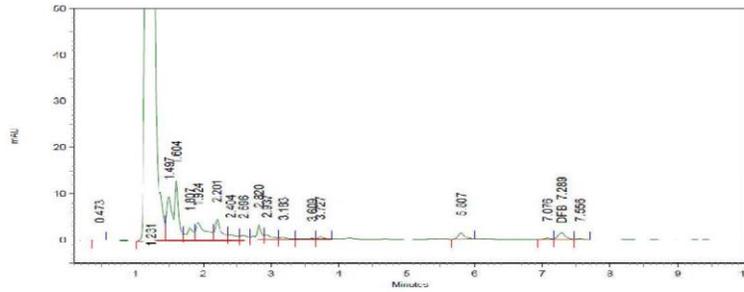
Fortificado 6 Diflubenzur3n 03-12-2014



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.300	5775	18709.01

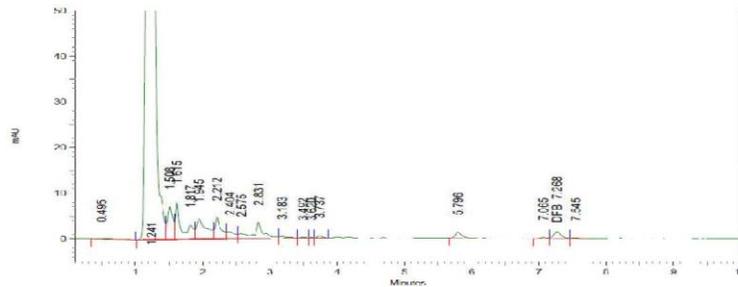


Fortificado 7 Diflubenzur3n 03-12-2014



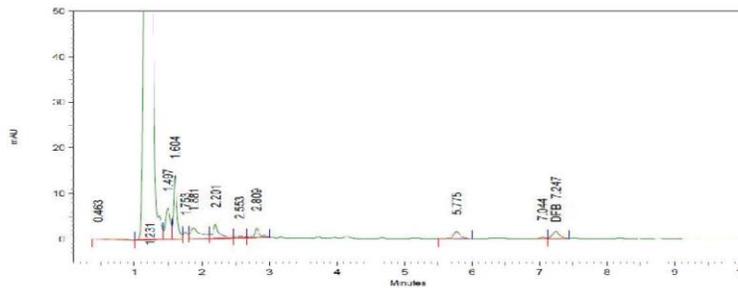
3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DF7	7.289	11751	19251.27

Fortificado 8 Diflubenzur3n 03-12-2014



5: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DF8	7.268	11520	20507.70

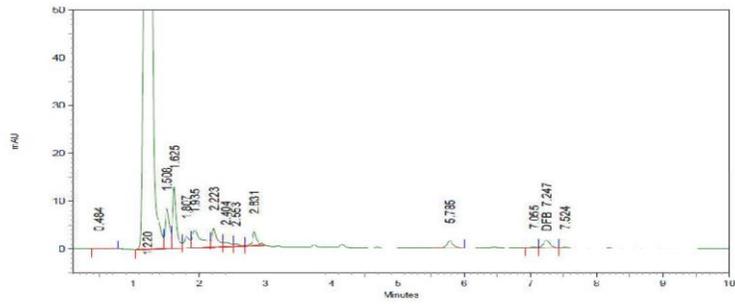
Fortificado 9 Diflubenzur3n 03-12-2014



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DF9	7.247	11149	20774.57



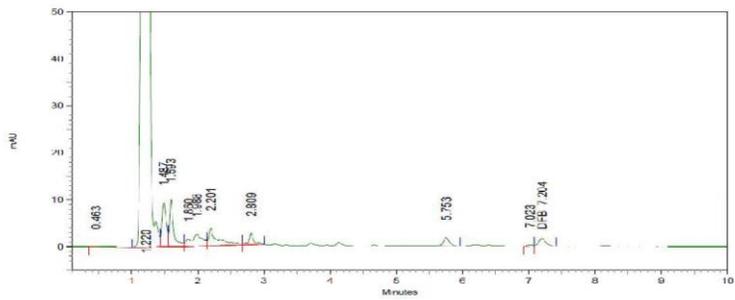
Fortificado 10 Diflubenzurón 03-12-2014



3: 258 nm, 8 nm:

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.247	11796	20578.42

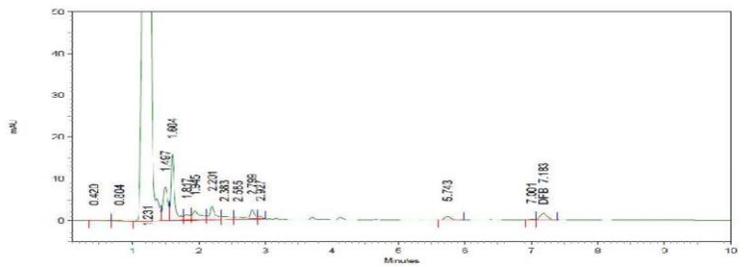
Fortificado 11 Diflubenzurón 03-12-2014



3: 258 nm, 8 nm:

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.204	11837	20749.97

Fortificado 12 Diflubenzurón 03-12-2014

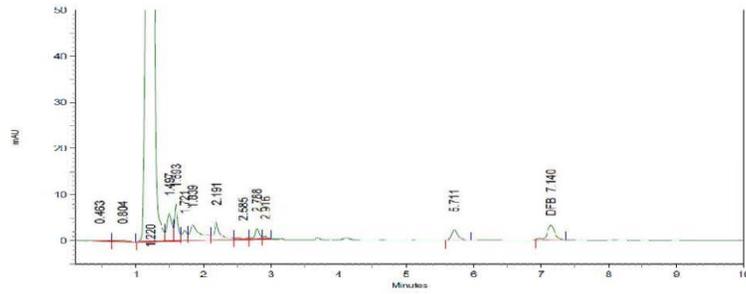


3: 258 nm, 8 nm:

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.183	11479	21890.46

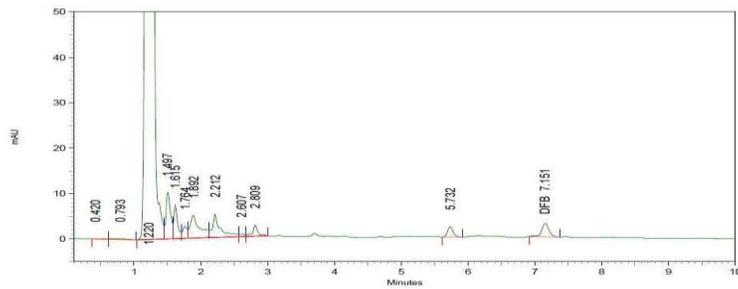


Fortificado 13 Diflubenzur3n 03-12-2014



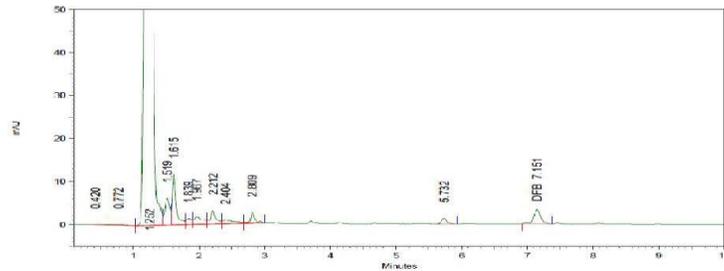
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.140	23899	21780.09

Fortificado 14 Diflubenzur3n 03-12-2014



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.151	23058	21677.73

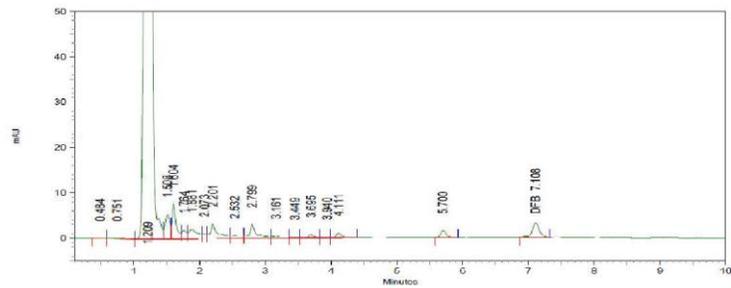
Fortificado 15 Diflubenzur3n 03-12-2014



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.151	24159	21480.10



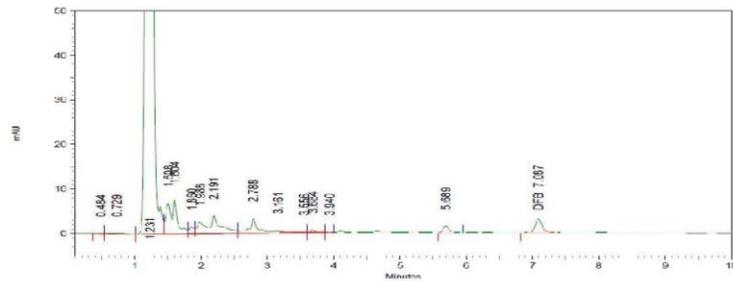
Fortificado 16 Diflubenzurón 03-12-2014



3: 258 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.108	24896	21669.62

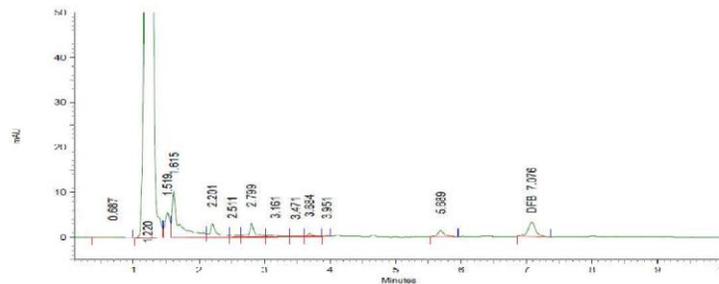
Fortificado 17 Diflubenzurón 03-12-2014



3: 258 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.087	24859	20994.87

Fortificado 18 Diflubenzurón 03-12-2014



3: 258 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.076	25834	20184.99

A N E X O 9

Cromatogramas de Muestras.



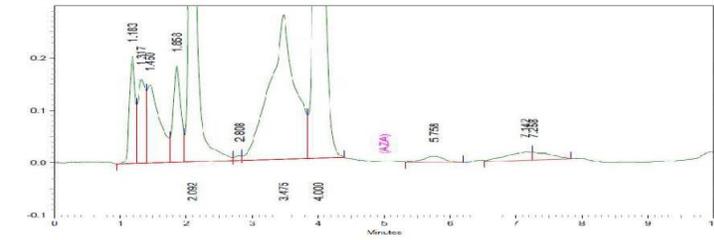
Cromatogramas de muestras de campo de azametifos 2015





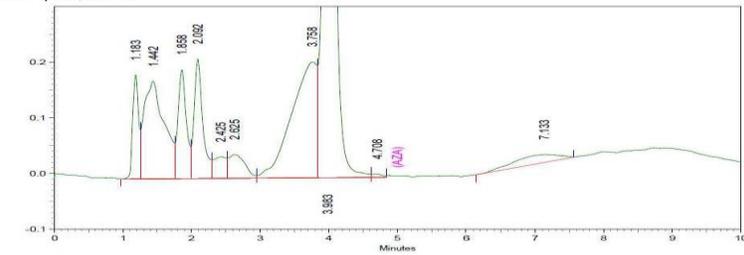
Cromatogramas de estudio de campo de Azametif3s 2015. Tiempo 0, antes del inicio del tratamiento.

Tiempo 0, Pool 1



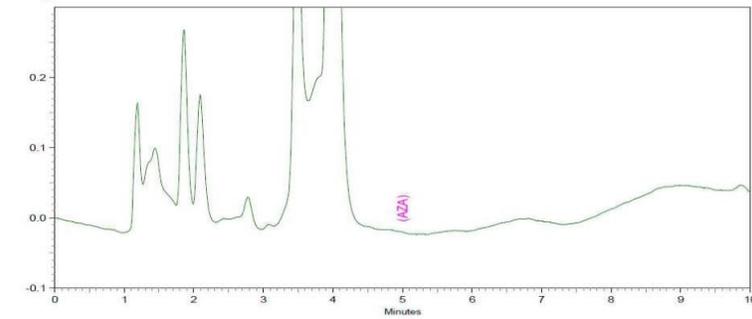
Detector A (Ex:230nm, Em:345nm)
Name Retention Time Area Theoretical plates

Tiempo 0, Pool 2



Detector A (Ex:230nm, Em:345nm)
Name Retention Time Area Theoretical plates

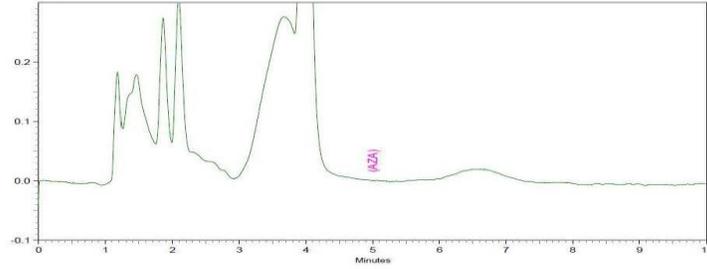
Tiempo 0, Pool 3



Detector A (Ex:230nm, Em:345nm)
Name Retention Time Area Theoretical plates



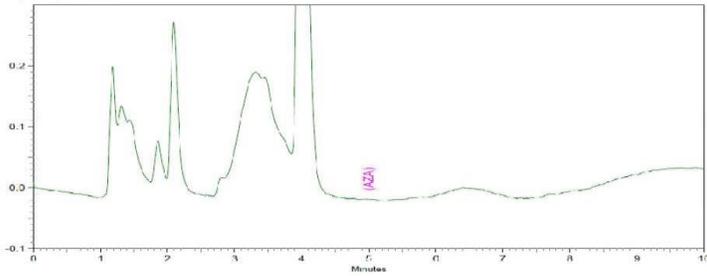
Tiempo 0, Pool 4



Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
------	----------------	------	--------------------

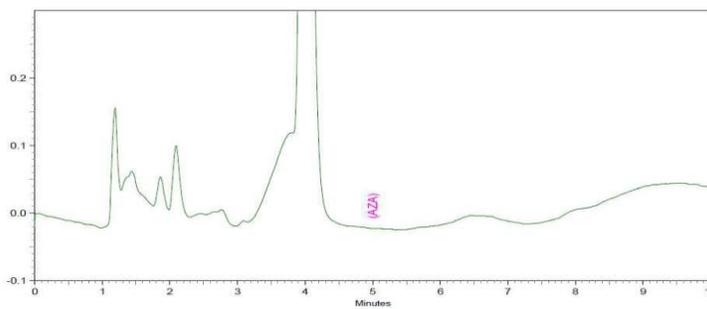
Tiempo 0, Pool 5



Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
------	----------------	------	--------------------

Tiempo 0, Pool 6

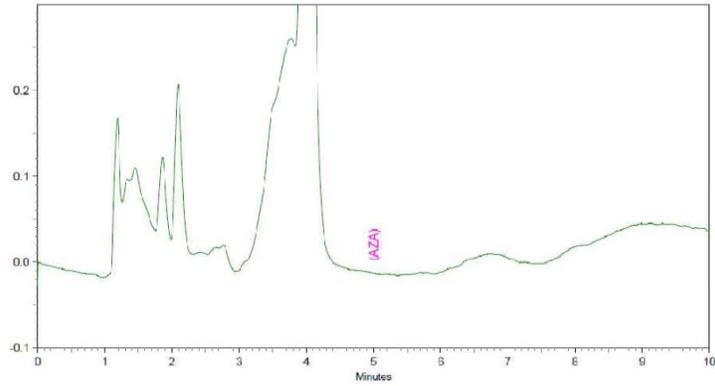


Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
------	----------------	------	--------------------



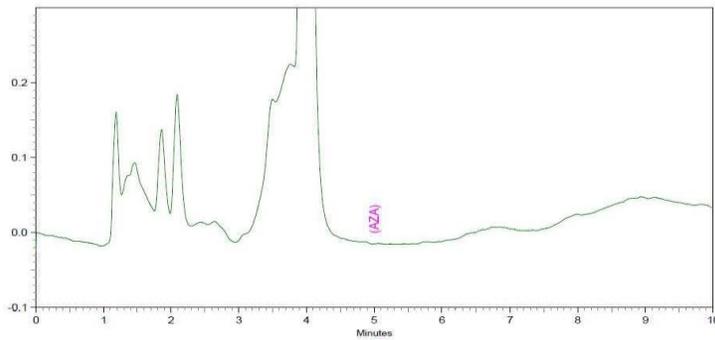
Tiempo 0, Pool 7



Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
------	----------------	------	--------------------

Tiempo 0, Pool 8

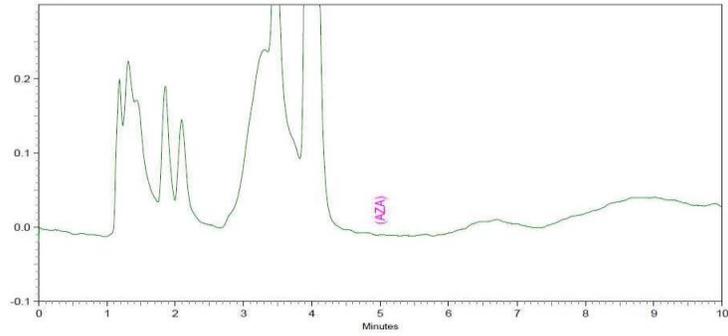


Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
------	----------------	------	--------------------



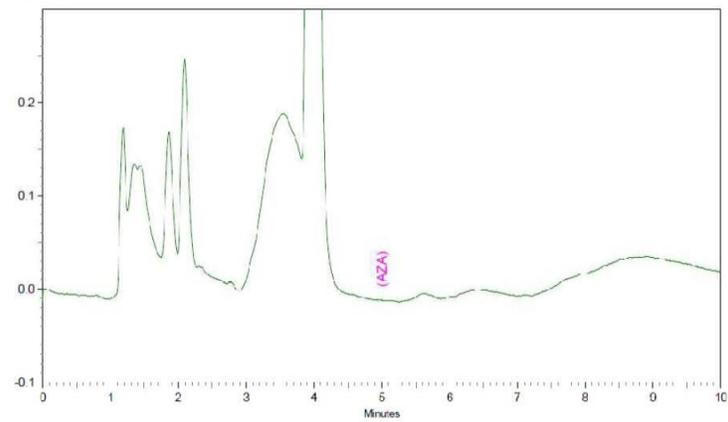
Tiempo 0, Pool 9



Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
------	----------------	------	--------------------

Tiempo 0, Pool 10



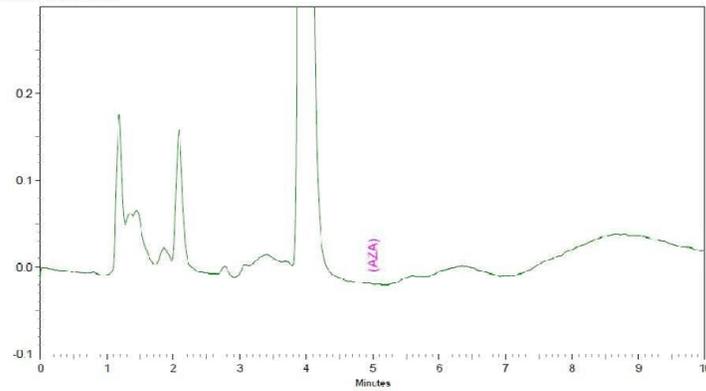
Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
------	----------------	------	--------------------



Cromatogramas de estudio de campo de Azametif3s 2015. Tiempo 1, durante el tratamiento.

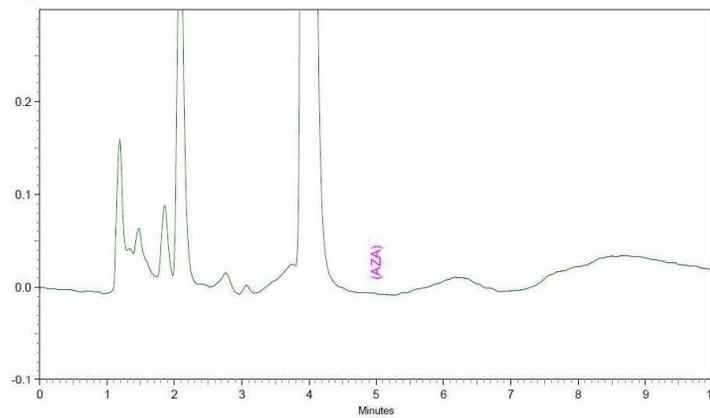
Tiempo 1, Pool 1



Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
------	----------------	------	--------------------

Tiempo 1, Pool 2

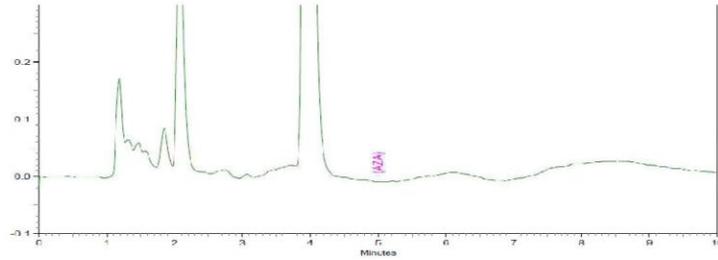


Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
------	----------------	------	--------------------



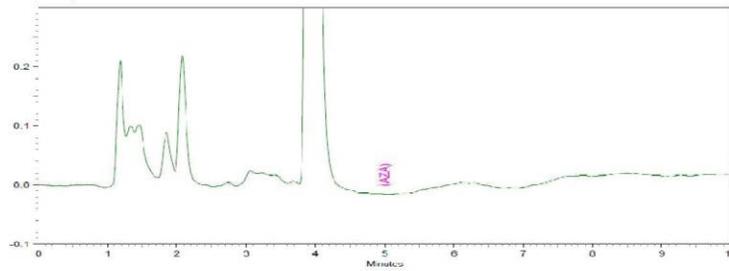
Tiempo 1, Pool 3



Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
------	----------------	------	--------------------

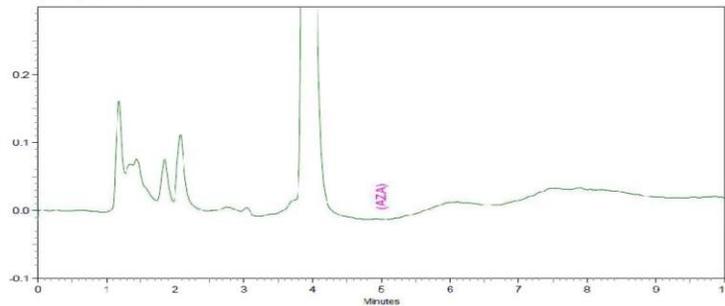
Tiempo 1, Pool 4



Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
------	----------------	------	--------------------

Tiempo 1, Pool 5

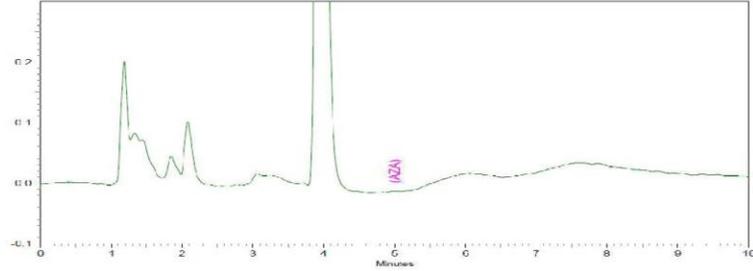


etector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
------	----------------	------	--------------------



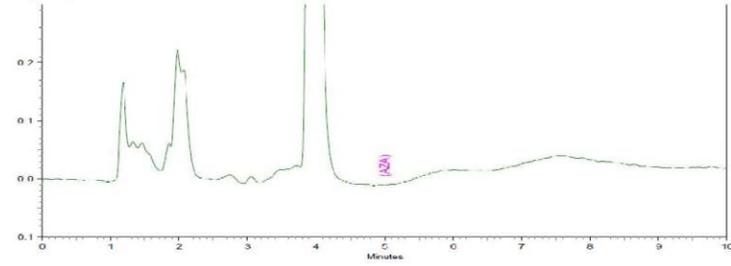
Tiempo 1, Pool 6



Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
------	----------------	------	--------------------

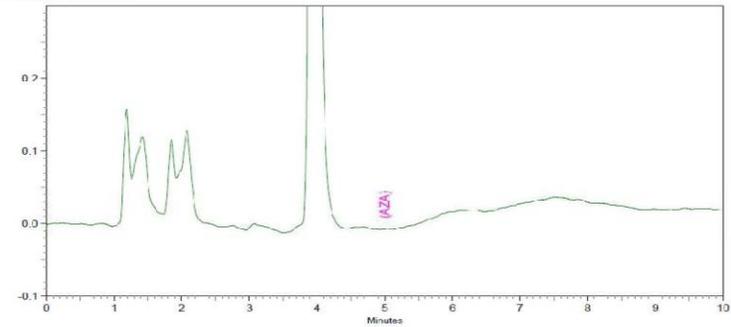
Tiempo 1, Pool 7



Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
------	----------------	------	--------------------

Tiempo 1, Pool 8

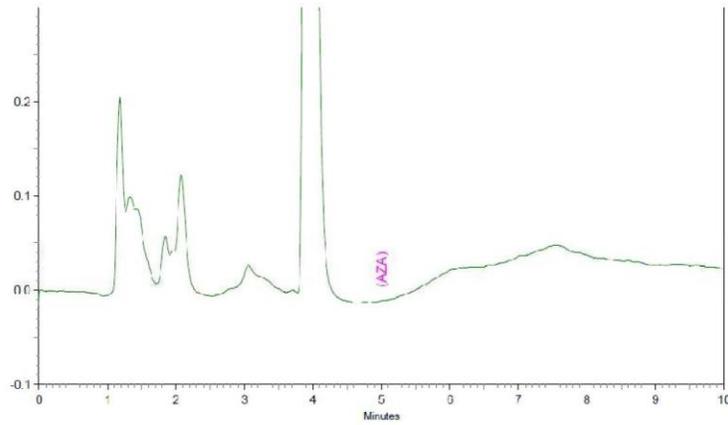


Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
------	----------------	------	--------------------



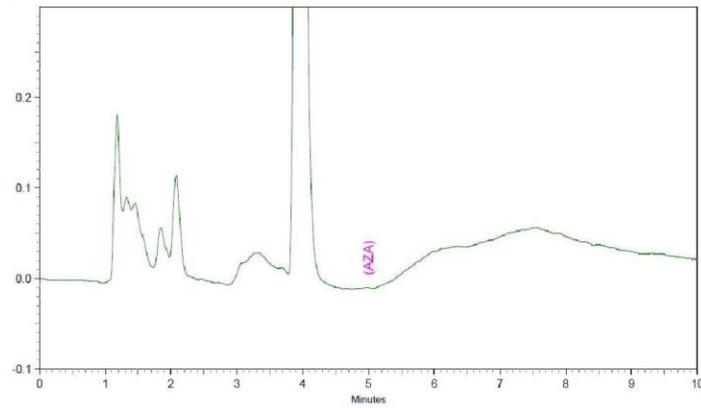
Tiempo 1, Pool 9



Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
------	----------------	------	--------------------

Tiempo 1, Pool 10



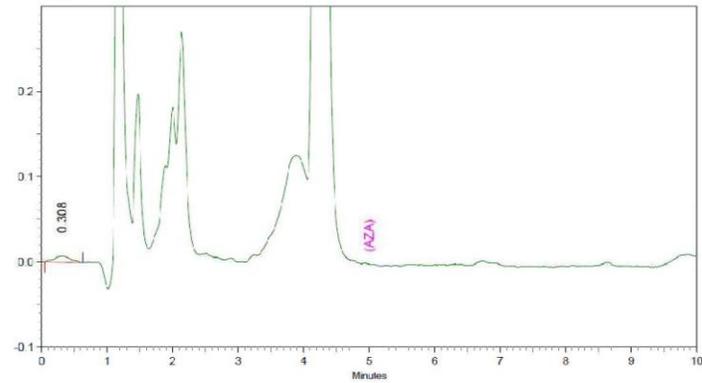
Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
------	----------------	------	--------------------



Cromatogramas de estudio de campo de Azametif3s 2015. Tiempo 2, despu3s del tratamiento.

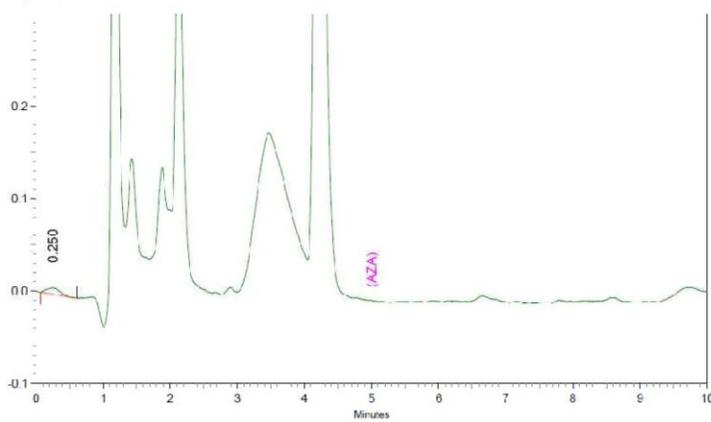
Tiempo 2, Pool 1



Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
------	----------------	------	--------------------

Tiempo 2, Pool 2

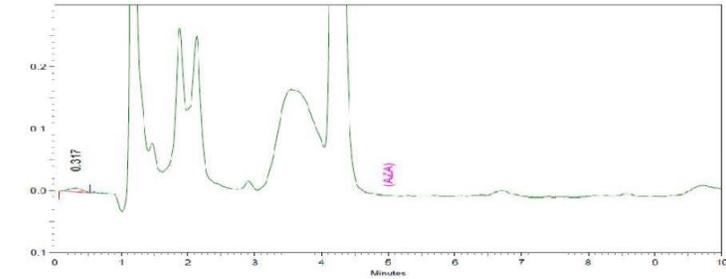


Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
------	----------------	------	--------------------



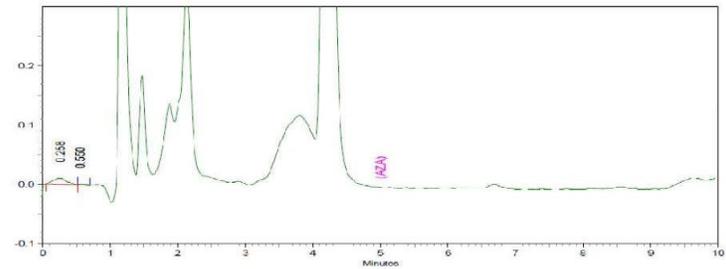
Tiempo 2, Pool 3



Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name Retention Time Area Theoretical plates

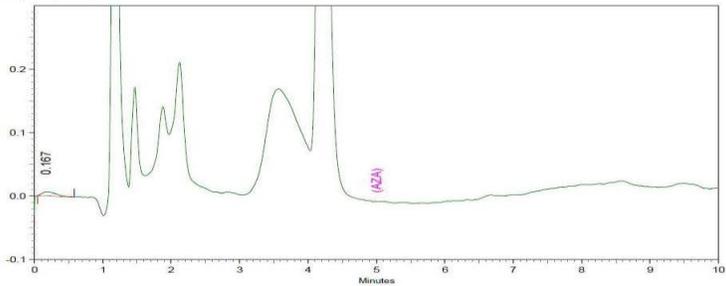
Tiempo 2, Pool 4



Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name Retention Time Area Theoretical plates

Tiempo 2, Pool 5

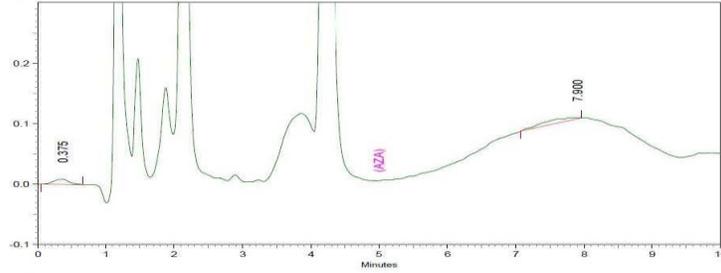


Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name Retention Time Area Theoretical plates



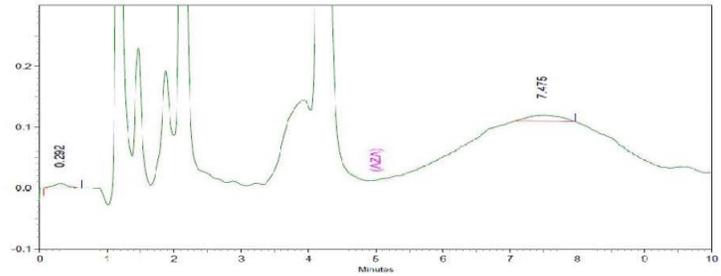
Tiempo 2, Pool 6



Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
------	----------------	------	--------------------

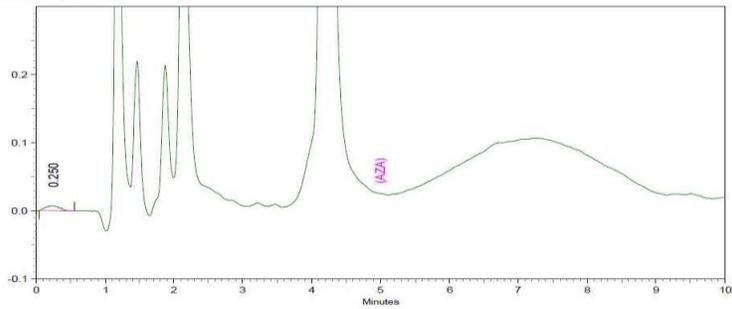
Tiempo 2, Pool 7



Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
------	----------------	------	--------------------

Tiempo 2, Pool 8

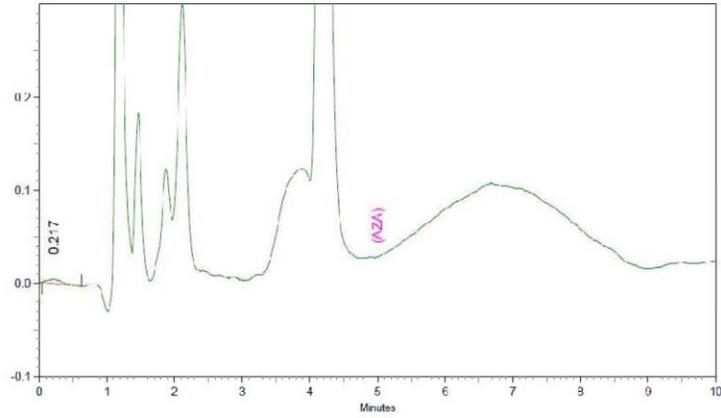


Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
------	----------------	------	--------------------



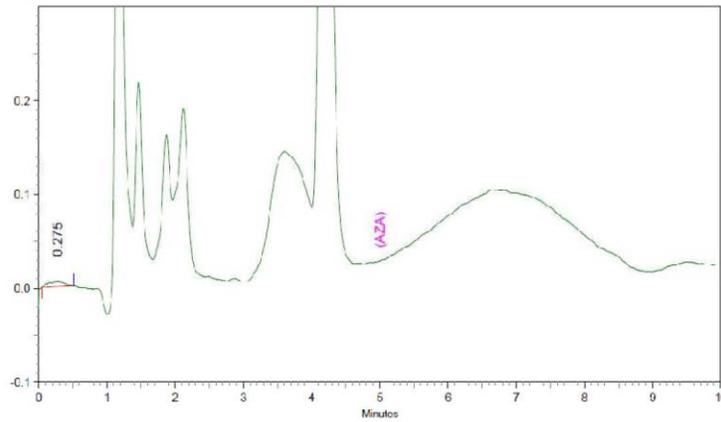
Tiempo 2, Pool 9



Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
------	----------------	------	--------------------

Tiempo 2, Pool 10



Detector A (Ex:230nm,
Em:345nm)

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
------	----------------	------	--------------------



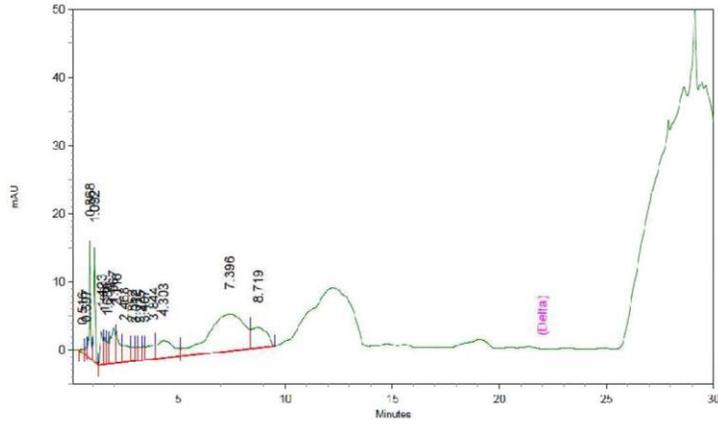
Cromatogramas de muestras de campo de Deltametrina 2015





Cromatogramas de estudio de campo de Deltametrina 2015. Tiempo 0, antes del inicio del tratamiento.

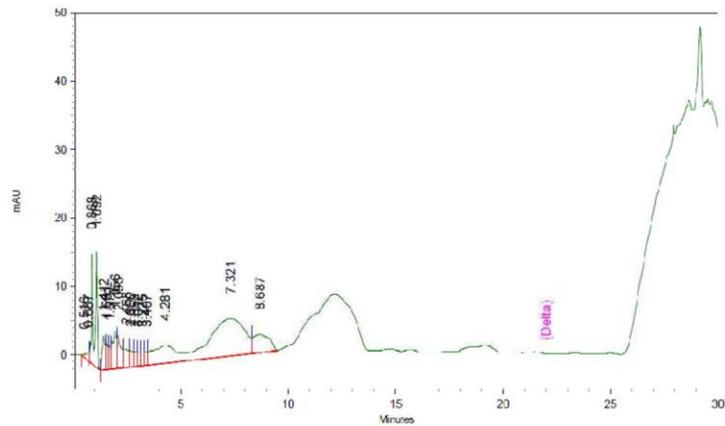
Tiempo 0, Pool 1



1: 210 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Delta			

Tiempo 0, Pool 2

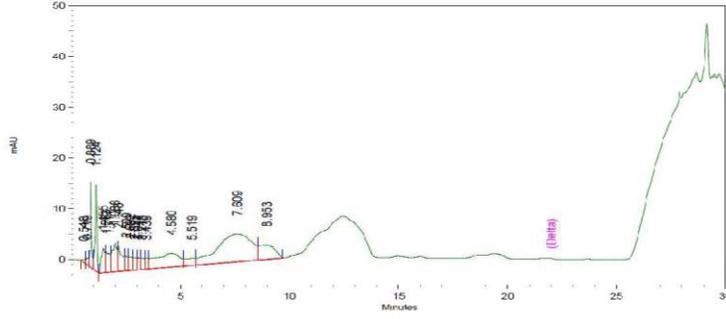


1: 210 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Delta			

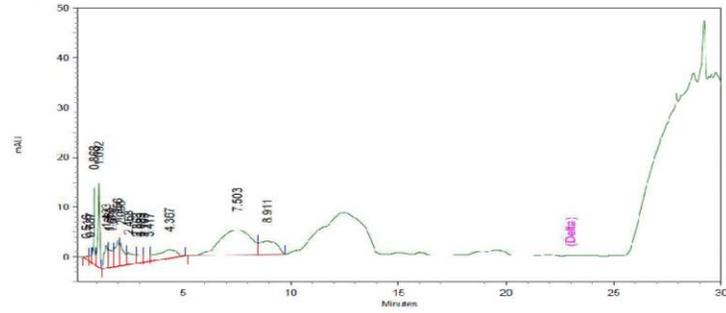


Tiempo 0, Pool 3



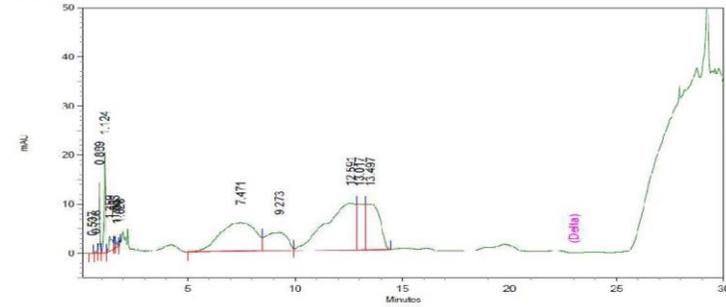
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Delta			

Tiempo 0, Pool 4



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Delta			

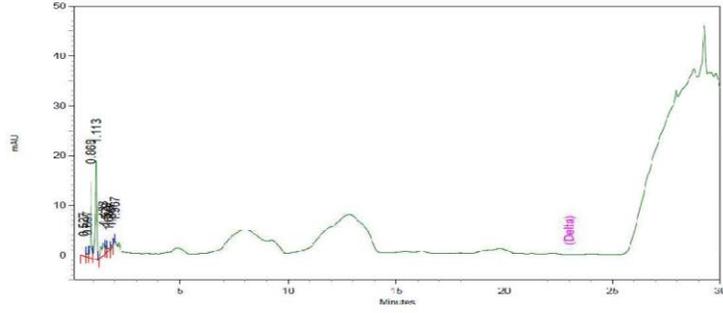
Tiempo 0, Pool 5



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Delta			

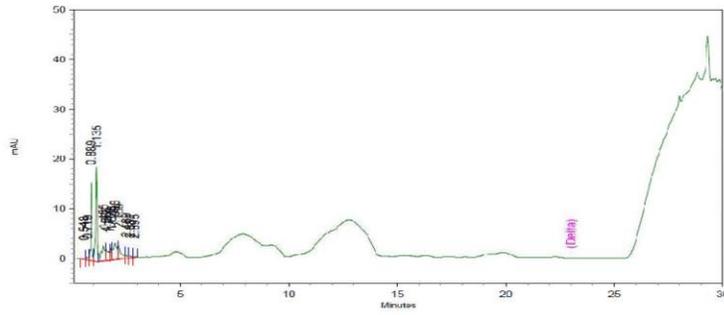


Tiempo 0, Pool 6



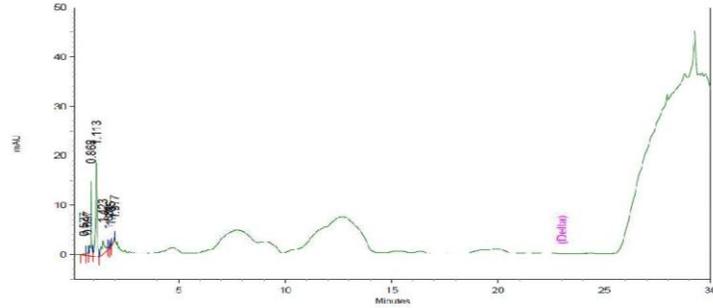
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Delta			

Tiempo 0, Pool 7



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Delta			

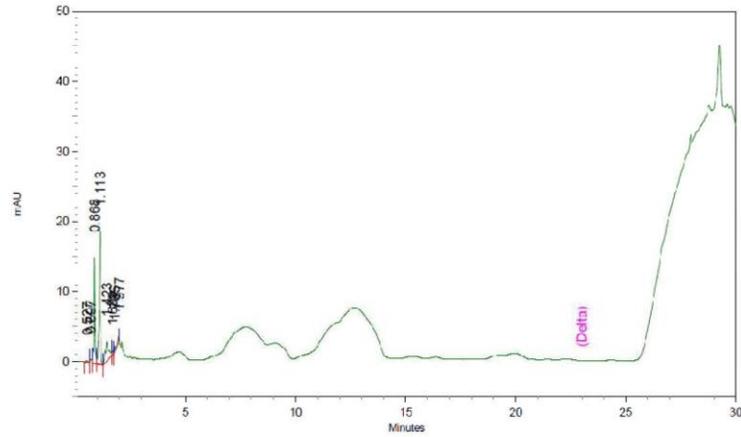
Tiempo 0, Pool 8



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Delta			



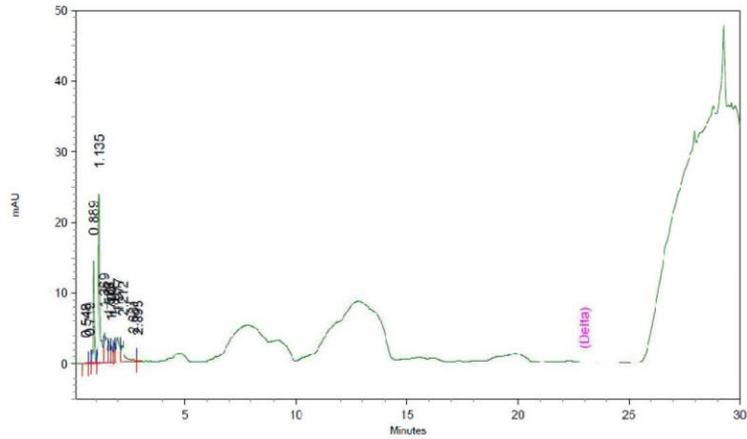
Tiempo 0, Pool 9



1: 210 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Delta			

Tiempo 0, Pool 10



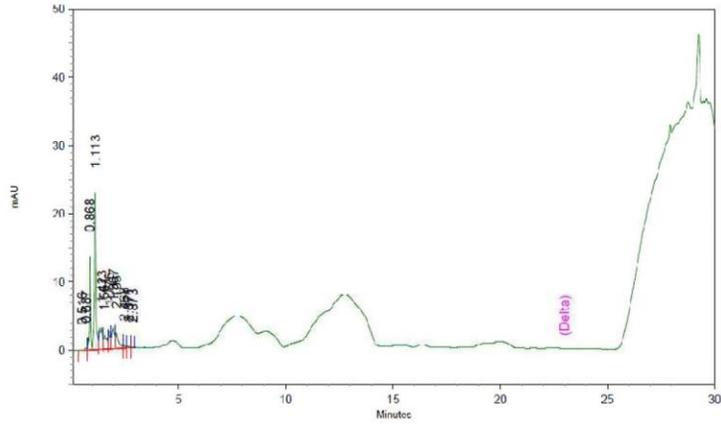
1: 210 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Delta			



Cromatogramas de estudio de campo de Deltametrina 2015. Tiempo 1, durante el tratamiento.

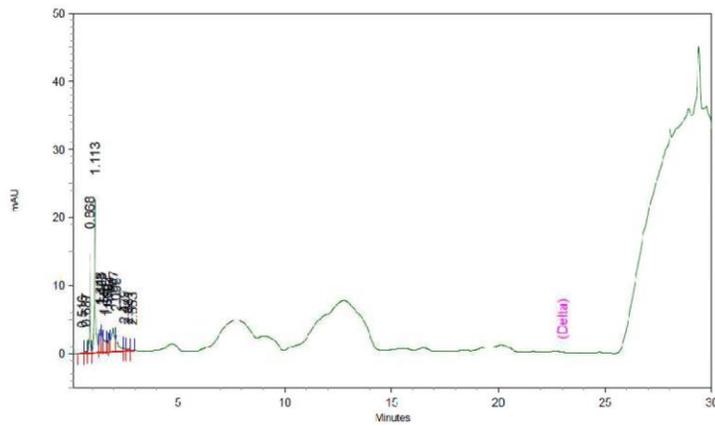
Tiempo 1, Pool 1



1: 210 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Delta			

Tiempo 1, Pool 2

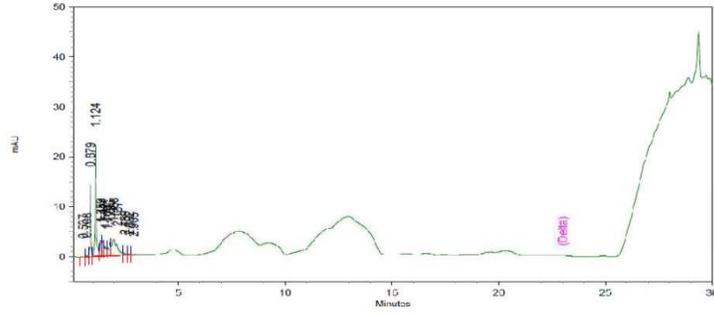


1: 210 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Delta			



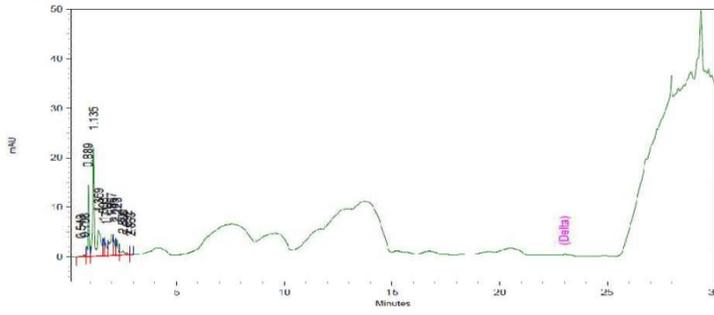
Tiempo 1, Pool 3



1: 210 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Delta			

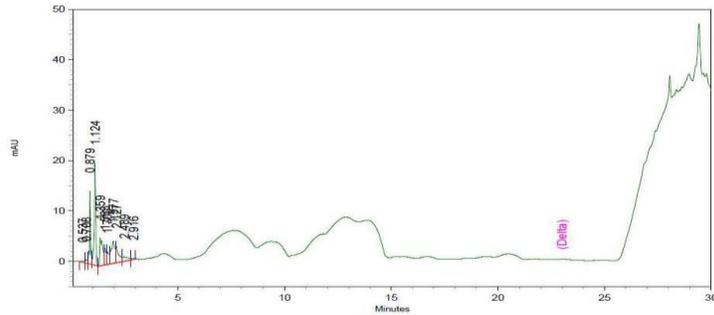
Tiempo 1, Pool 4



1: 210 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Delta			

Tiempo 1, Pool 5

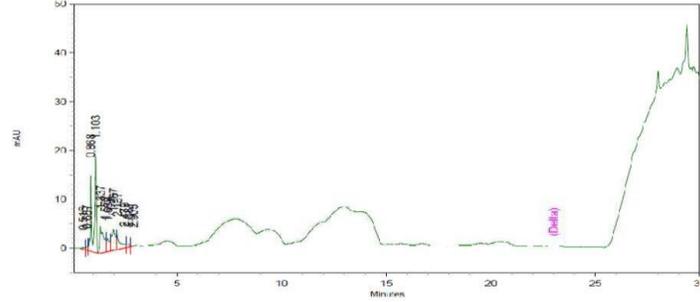


1: 210 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Delta			

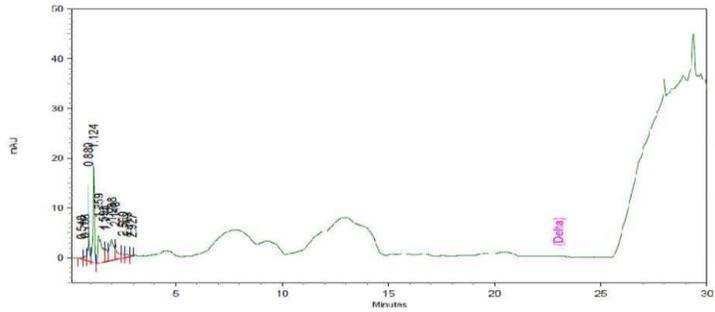


Tiempo 1, Pool 6



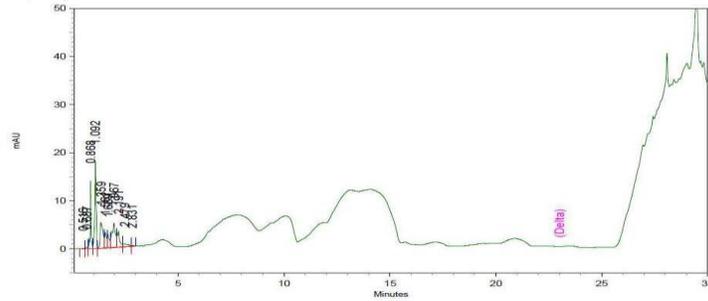
1: 210 nm, 8 nm	Retention Time	Area	Theoretical plates
Name			
Delta			

Tiempo 1, Pool 7



1: 210 nm, 8 nm	Retention Time	Area	Theoretical plates
Name			
Delta			

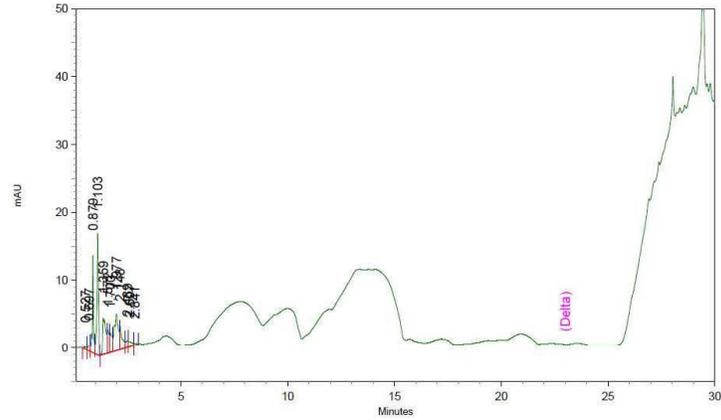
Tiempo 1, Pool 8



1: 210 nm, 8 nm	Retention Time	Area	Theoretical plates
Name			
Delta			



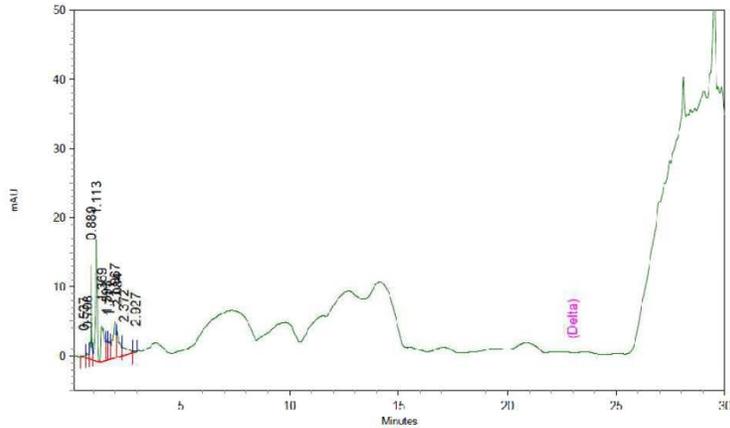
Tiempo 1, Pool 9



1: 210 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Delta			

Tiempo 1, Pool 10



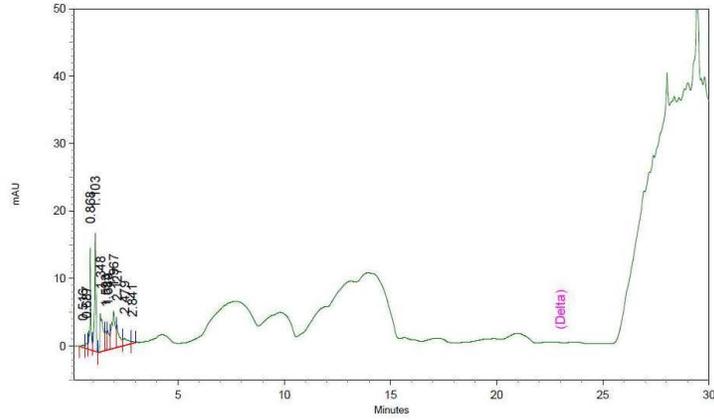
1: 210 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Delta			



Cromatogramas de estudio de campo de Deltametrina 2015. Tiempo 2, despu3s del tratamiento.

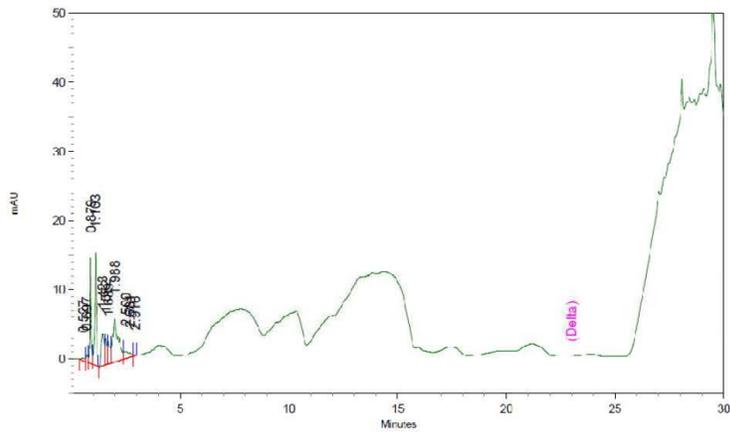
Tiempo 2, Pool 1



1: 210 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Delta			

Tiempo 2, Pool 2

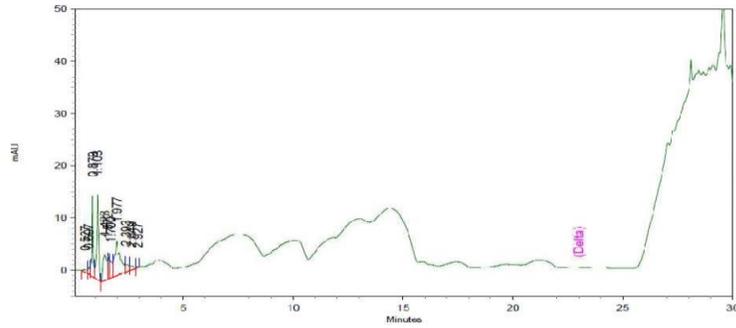


1: 210 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Delta			

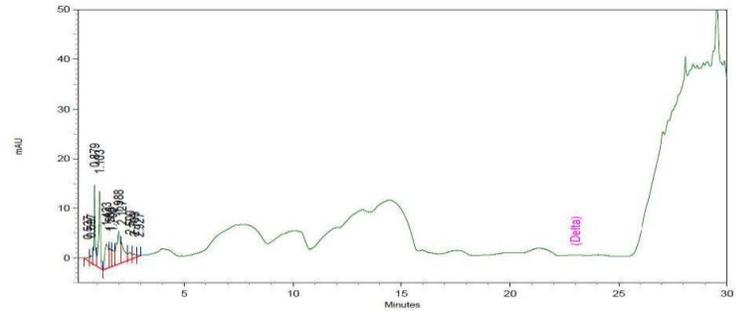


Tiempo 2, Pool 3



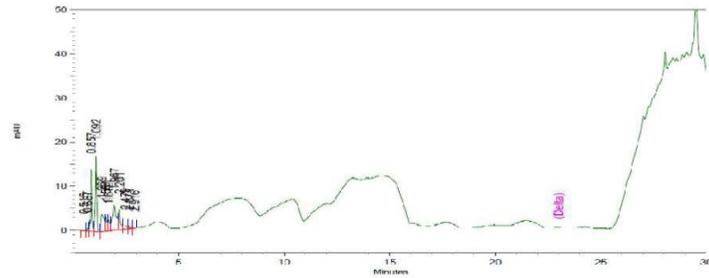
1: 210 nm, 8 nm	Retention Time	Area	Theoretical plates
Name			
Delta			

Tiempo 2, Pool 4



1: 210 nm, 8 nm	Retention Time	Area	Theoretical plates
Name			
Delta			

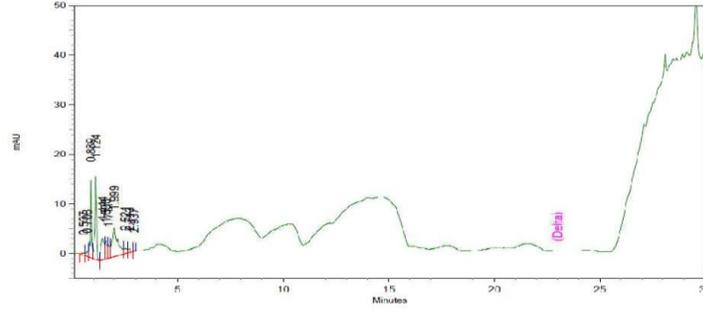
Tiempo 2, Pool 5



1: 210 nm, 8 nm	Retention Time	Area	Theoretical plates
Name			
Delta			



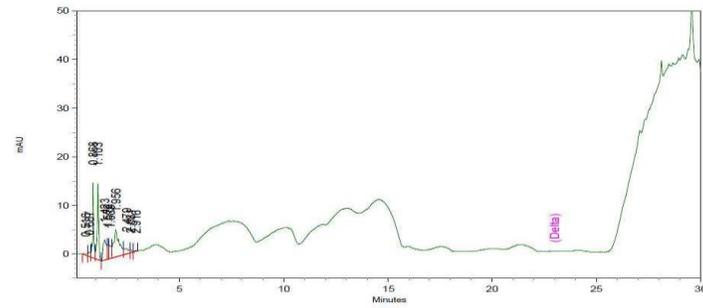
Tiempo 2, Pool 6



1: 210 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Delta			

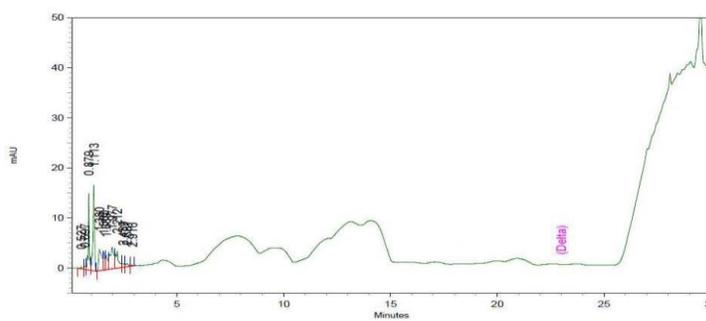
Tiempo 2, Pool 7



1: 210 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Delta			

Tiempo 2, Pool 8

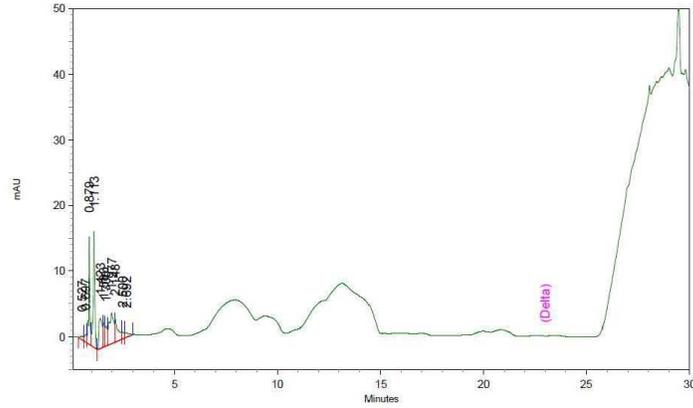


1: 210 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Delta			



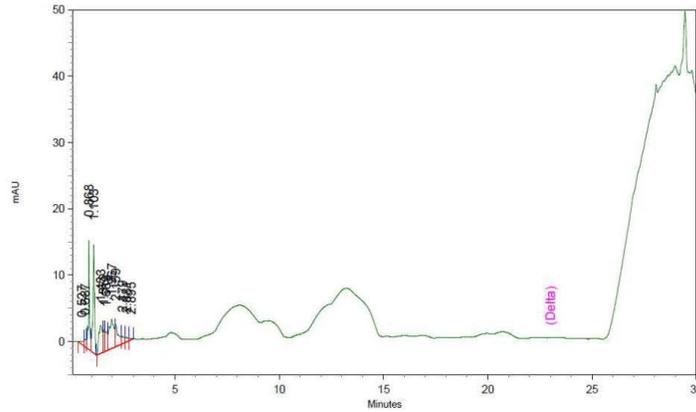
Tiempo 2, Pool 9



1: 210 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Delta			

Tiempo 2, Pool 10



1: 210 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
Delta			



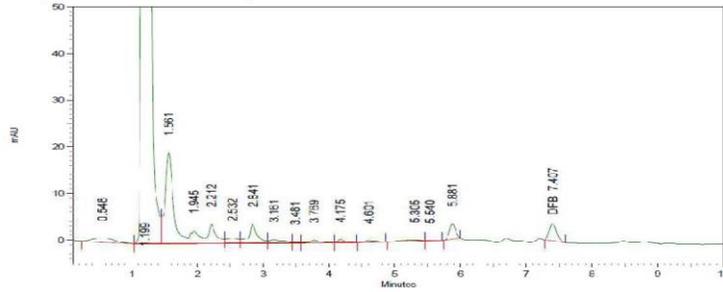
Cromatogramas de muestras de campo de Diflubenzurón 2015





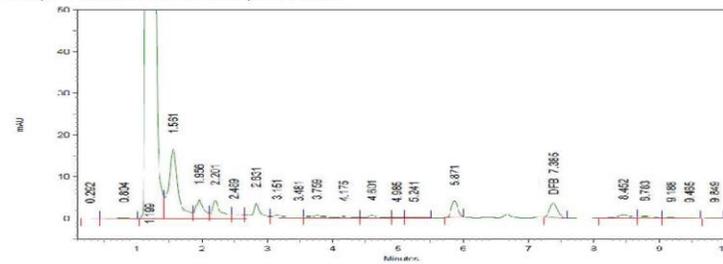
Cromatogramas de Tiempo 1 de estudio de bioacumulaci3n-depleci3n de Diflubenzur3n 2015.

Tiempo 1 Diflubenzur3n Estanque 1 Pool 1



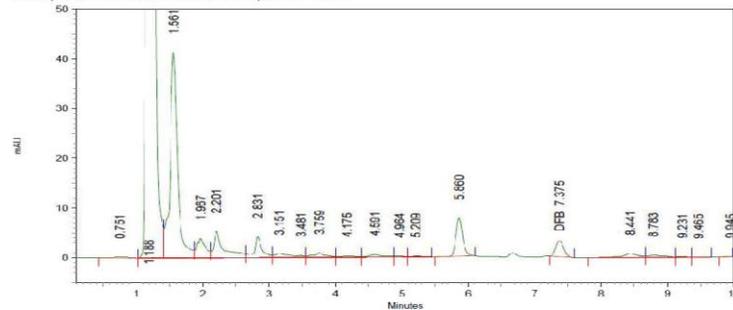
3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.407	28883	18174.13

Tiempo 1 Diflubenzur3n Estanque 1 Pool 2



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.385	28303	17106.13

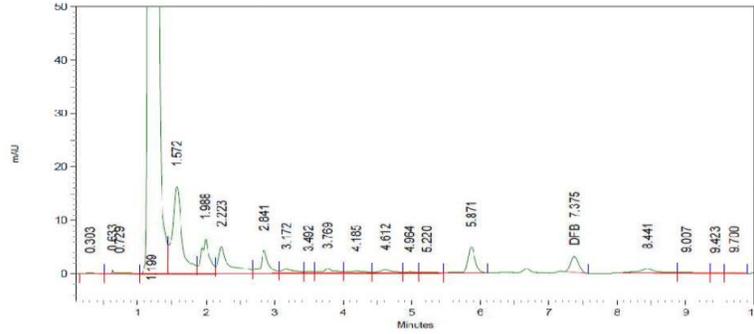
Tiempo 1 Diflubenzur3n Estanque 1 Pool 3



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.375	25809	17260.29

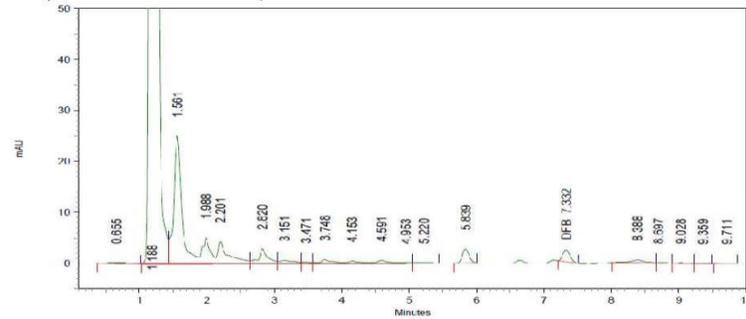


Tiempo 1 Diflubenzur3n Estanque 1 Pool 4



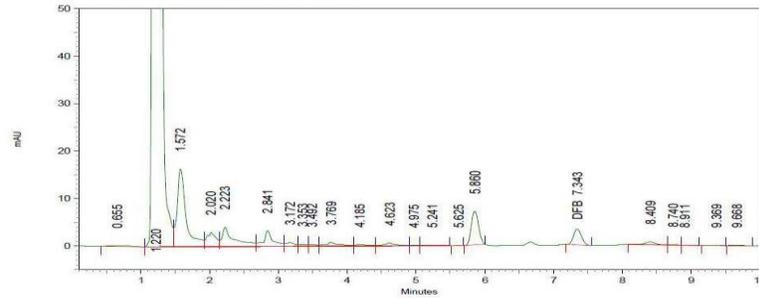
3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.375	24379	17861.66

Tiempo 1 Diflubenzur3n Estanque 1 Pool 5



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.332	17478	20121.83

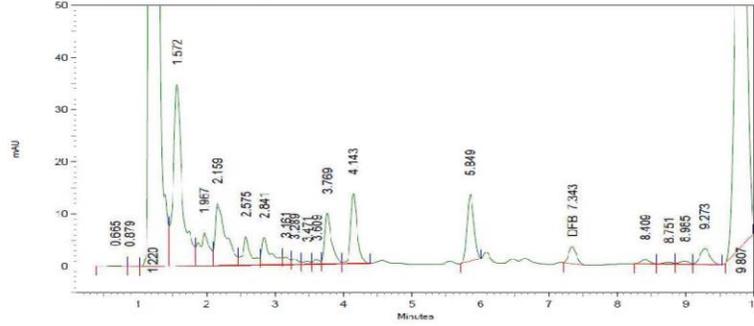
Tiempo 1 Diflubenzur3n Estanque 1 Pool 6



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.343	26860	17404.48



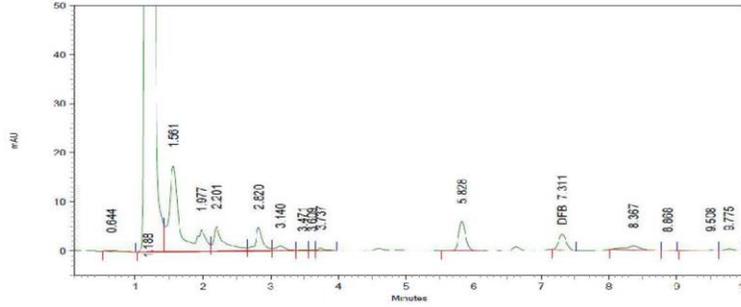
Tiempo 1 Diflubenzur3n Estanque 1 Pool 7



3: 258 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.343	24911	18022.81

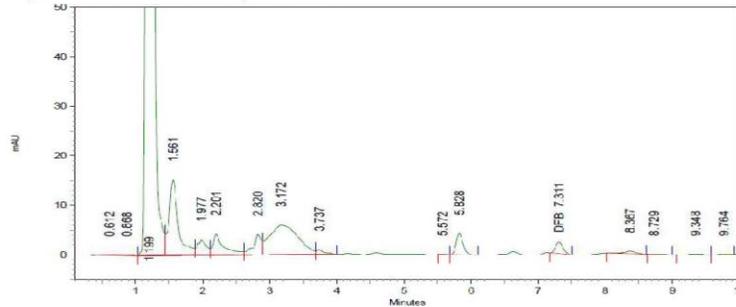
Tiempo 1 Diflubenzur3n Estanque 1 Pool 8



3: 258 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.311	24929	17836.19

Tiempo 1 Diflubenzur3n Estanque 1 Pool 9

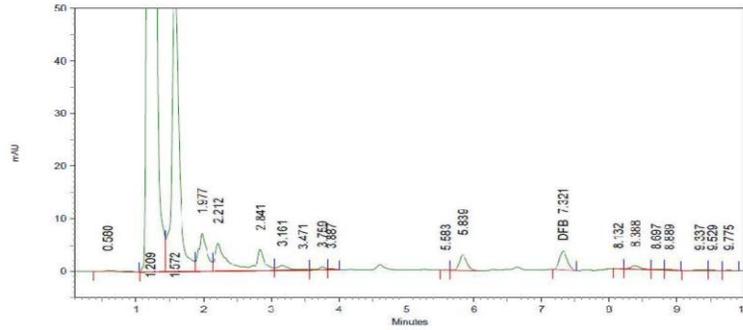


3: 258 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.311	17652	18527.61



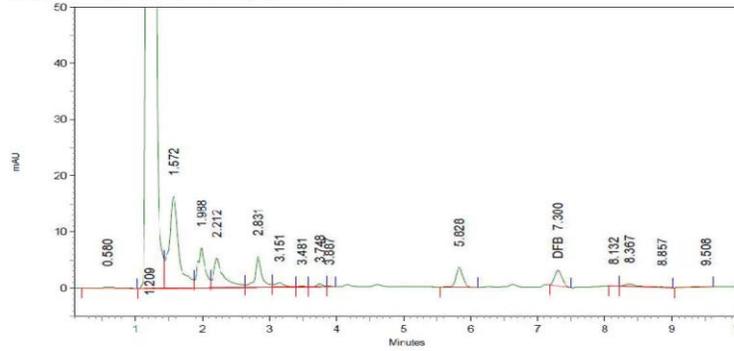
Tiempo 1 Diflubenzur3n Estanque 1 Pool 10



3: 258 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.321	28487	17485.42

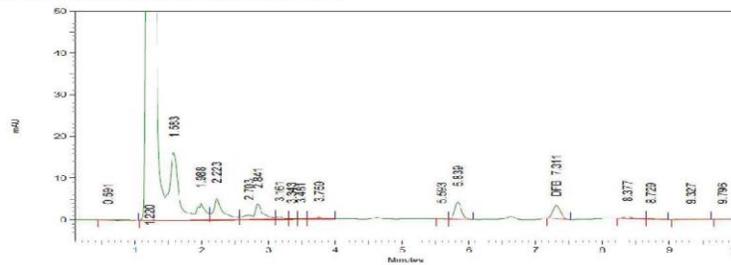
Tiempo 1 Diflubenzur3n Estanque 2 Pool 1



3: 258 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.300	21522	19106.97

Tiempo 1 Diflubenzur3n Estanque 2 Pool 2

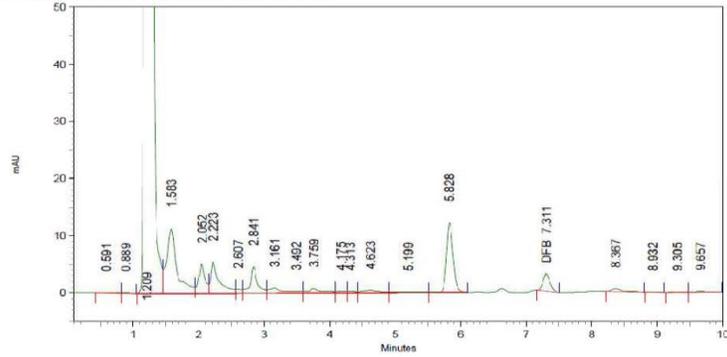


3: 258 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.311	25810	17953.44



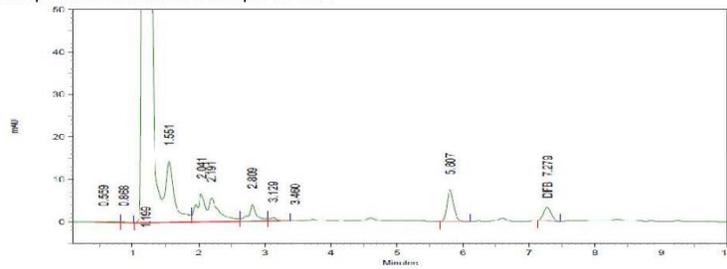
Tiempo 1 Diflubenzur3n Estanque 2 Pool 3



3: 258 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.311	23027	18894.31

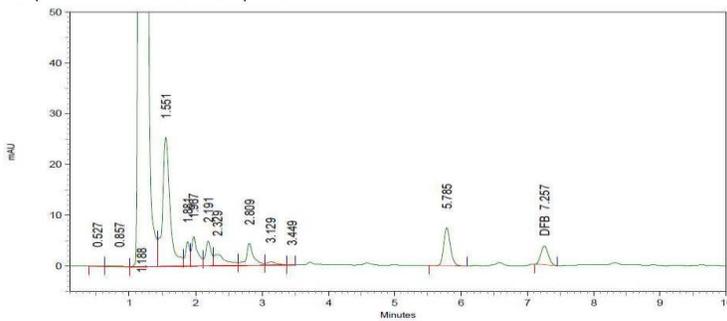
Tiempo 1 Diflubenzur3n Estanque 2 Pool 4



3: 258 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.279	24545	18300.54

Tiempo 1 Diflubenzur3n Estanque 2 Pool 5

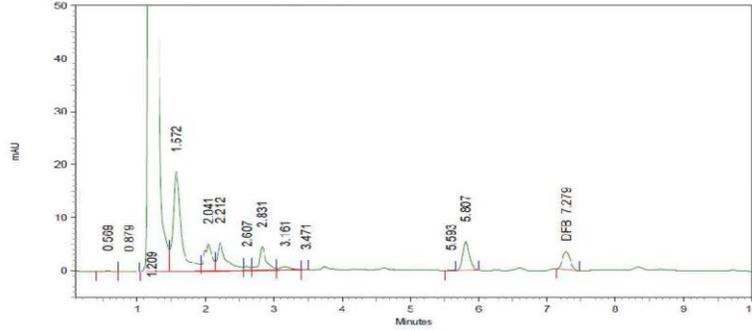


3: 258 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.257	28842	18585.15

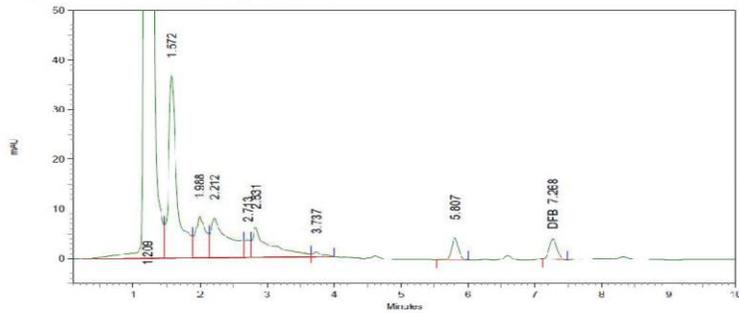


Tiempo 1 Diflubenzurón Estanque 2 Pool 6



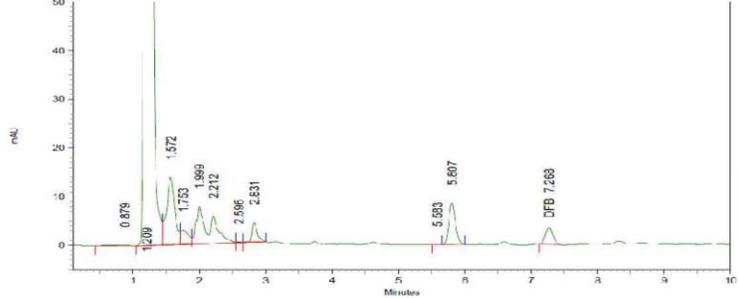
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.279	26108	18186.98

Tiempo 1 Diflubenzurón Estanque 2 Pool 7



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.268	32578	17607.82

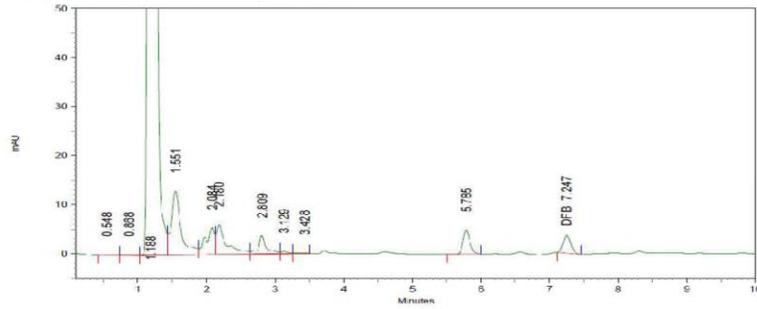
Tiempo 1 Diflubenzurón Estanque 2 Pool 8



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.268	27331	17583.73



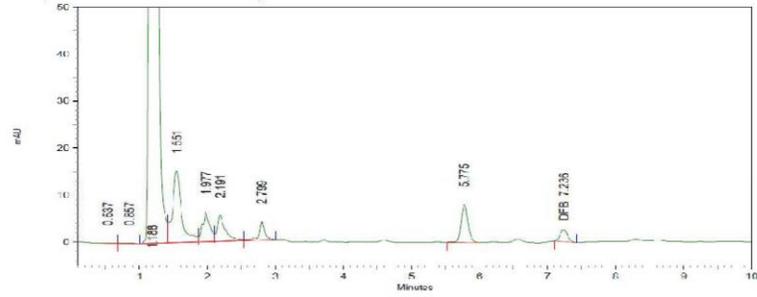
Tiempo 1 Diflubenzurón Estanque 2 Pool 9



3: 258 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.247	28687	17863.92

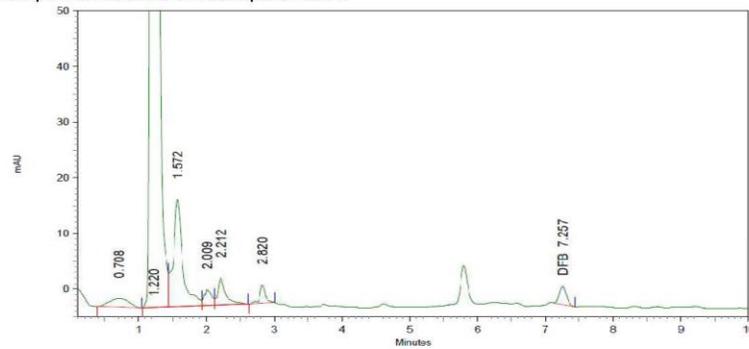
Tiempo 1 Diflubenzurón Estanque 2 Pool 10



3: 258 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.236	19521	18288.77

Tiempo 1 Diflubenzurón Estanque 3 Pool 1

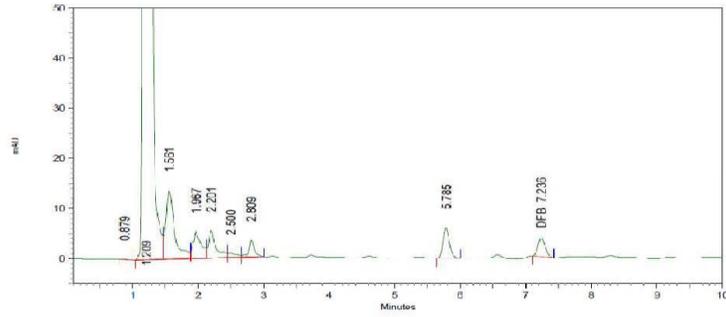


3: 258 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.257	23994	19522.19



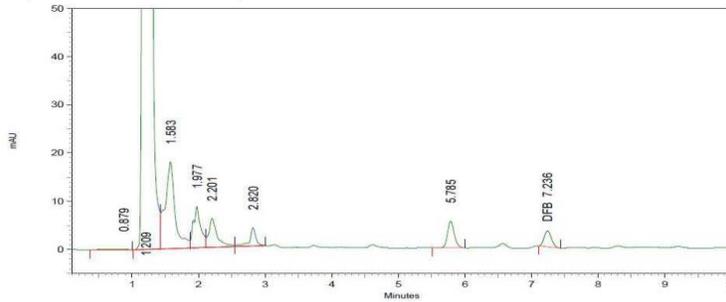
Tiempo 1 Diflubenzur3n Estanque 3 Pool 2



3: 258 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.236	29077	18018.77

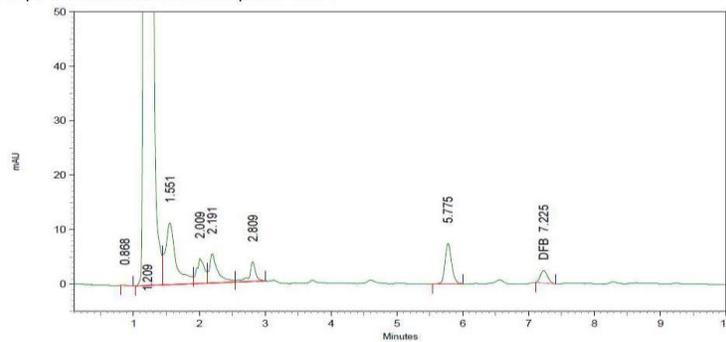
Tiempo 1 Diflubenzur3n Estanque 3 Pool 3



3: 258 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.236	25357	18739.20

Tiempo 1 Diflubenzur3n Estanque 3 Pool 4

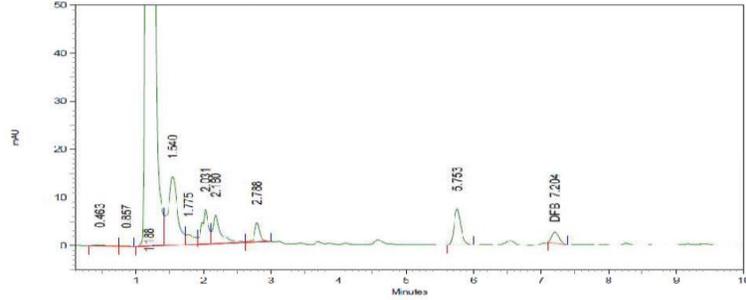


3: 258 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.225	17450	18668.00

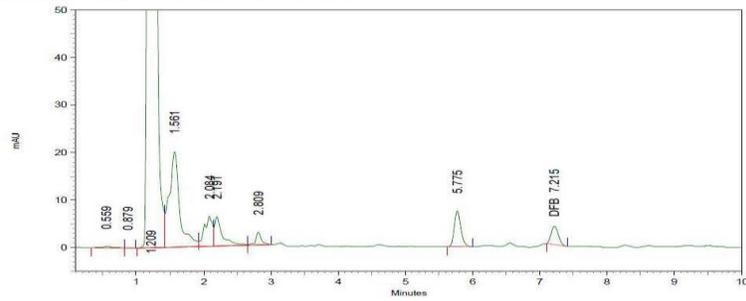


Tiempo 1 Diflubenzur3n Estanque 3 Pool 5



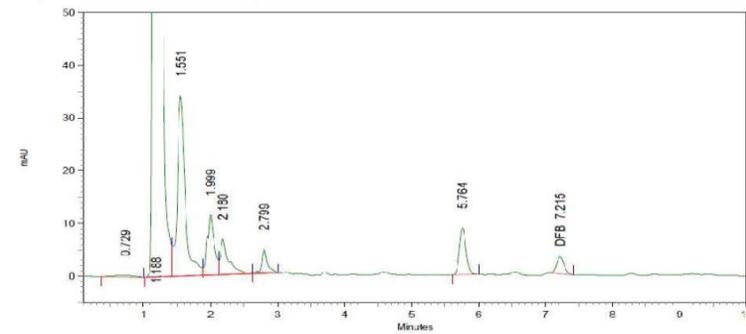
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.204	17035	20195.86

Tiempo 1 Diflubenzur3n Estanque 3 Pool 6



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.215	28678	19561.14

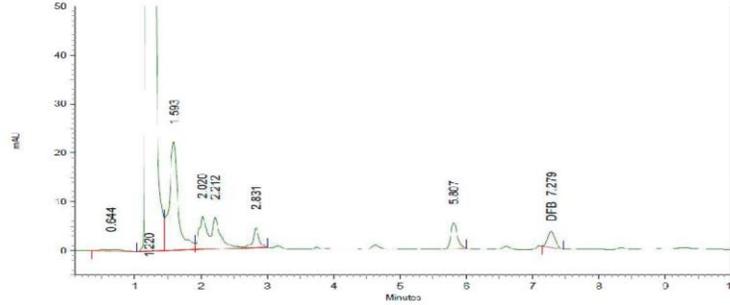
Tiempo 1 Diflubenzur3n Estanque 3 Pool 7



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.215	24781	17969.35

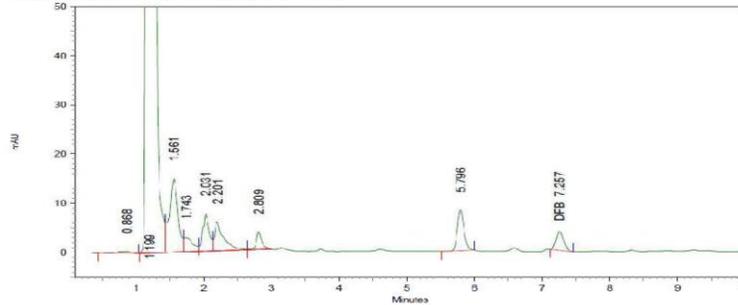


Tiempo 1 Diflubenzur3n Estanque 3 Pool 8



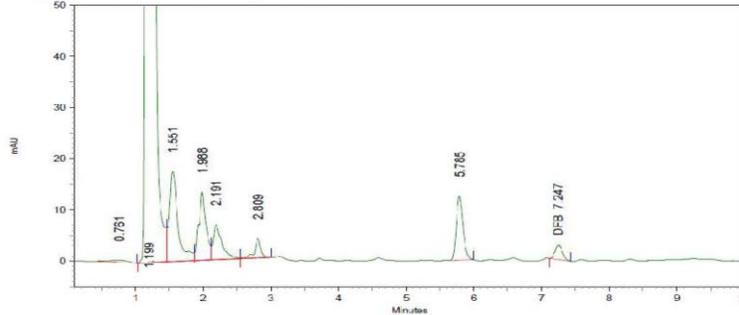
3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.279	25656	18821.01

Tiempo 1 Diflubenzur3n Estanque 3 Pool 9



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.257	30166	18379.21

Tiempo 1 Diflubenzur3n Estanque 3 Pool 10

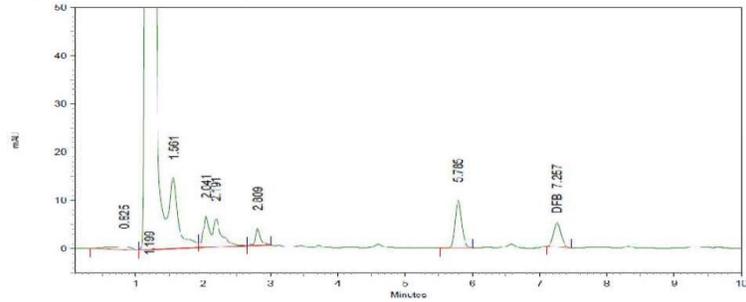


3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.247	20764	19436.29



Cromatogramas de Tiempo 2 de estudio de bioacumulación-depleción de Diflubenzurón 2015.

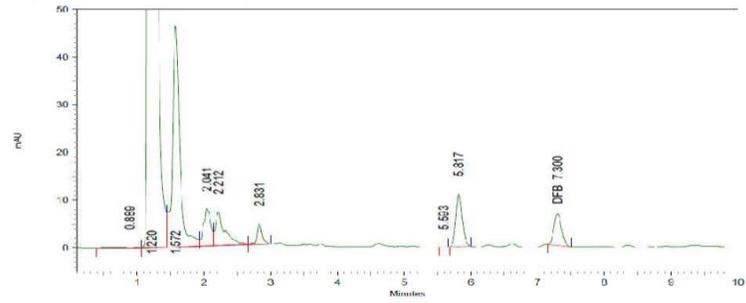
Tiempo 2 Diflubenzurón Estanque 1 Pool 1



3: 258 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.257	49762	17816.46

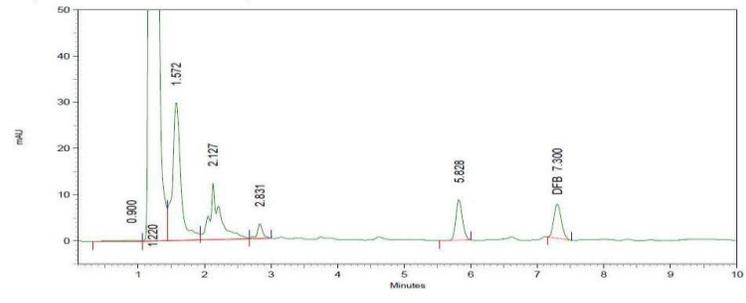
Tiempo 2 Diflubenzurón Estanque 1 Pool 2



3: 258 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.300	52798	17688.48

Tiempo 2 Diflubenzurón Estanque 1 Pool 3

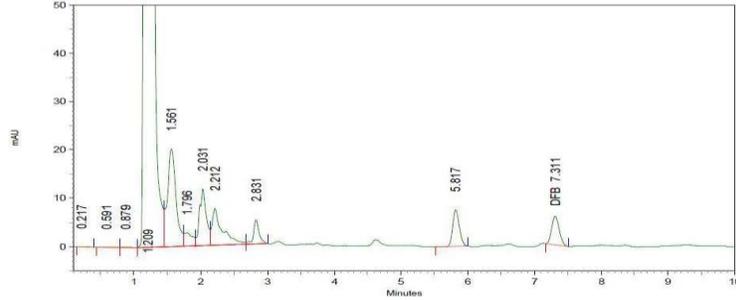


3: 258 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.300	58354	17738.09

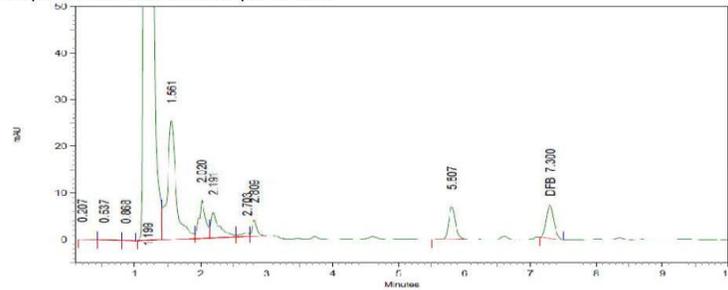


Tiempo 2 Diflubenzurón Estanque 1 Pool 4



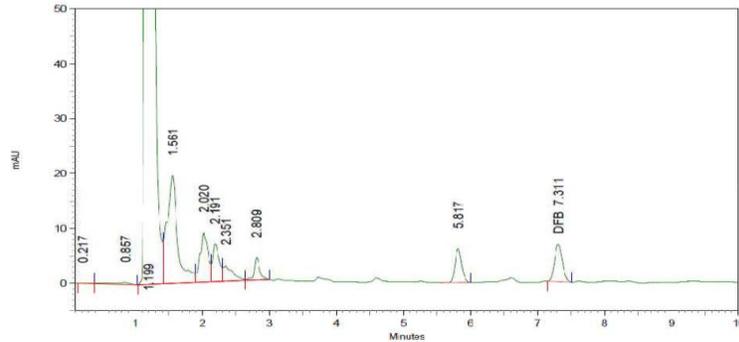
3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.311	46575	18556.42

Tiempo 2 Diflubenzurón Estanque 1 Pool 5



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
D111	7.300	56954	17678.98

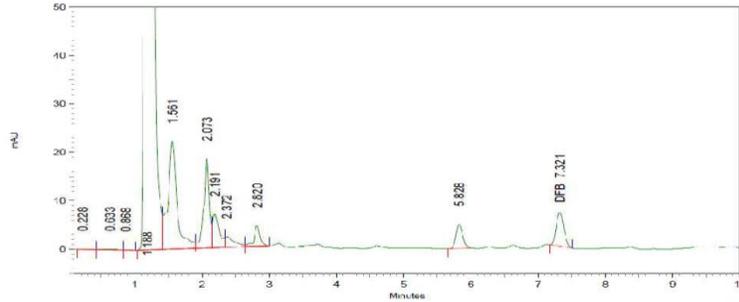
Tiempo 2 Diflubenzurón Estanque 1 Pool 6



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.311	54834	17119.09

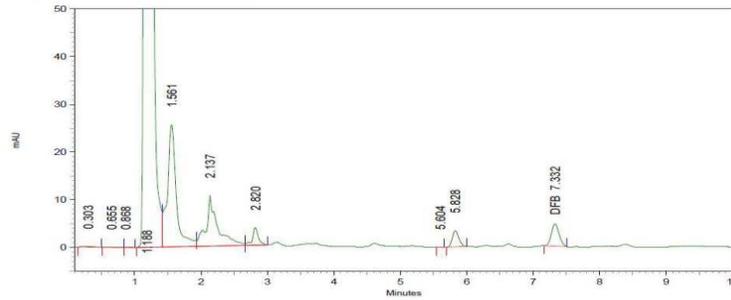


Tiempo 2 Diflubenzur3n Estanque 1 Pool 7



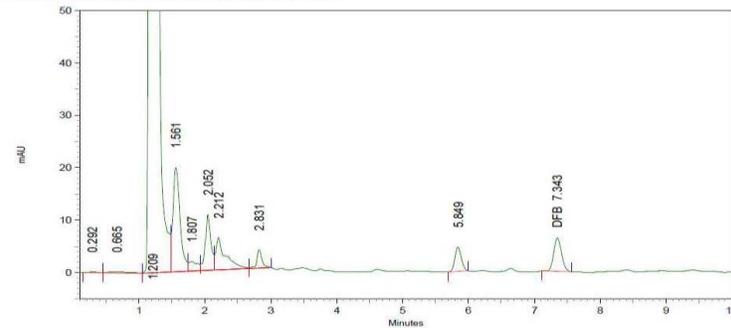
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.321	54980	17964.39

Tiempo 2 Diflubenzur3n Estanque 1 Pool 8



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.332	37604	17211.31

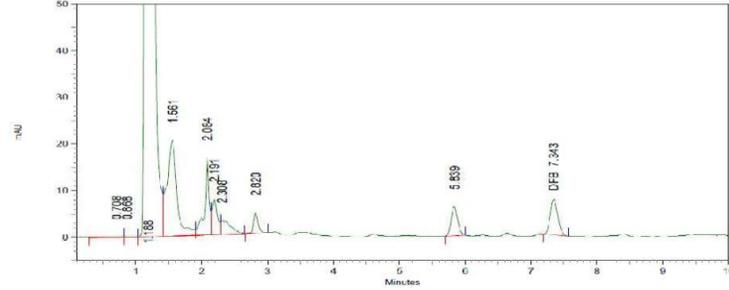
Tiempo 2 Diflubenzur3n Estanque 1 Pool 9



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.343	52821	17099.59



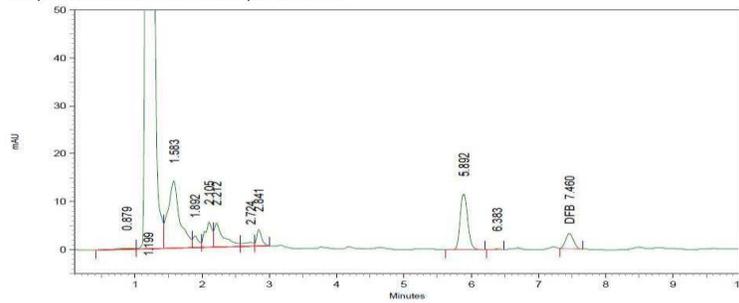
Tiempo 2 Diflubenzur3n Estanque 1 Pool 10



3: 258 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.343	60835	17649.43

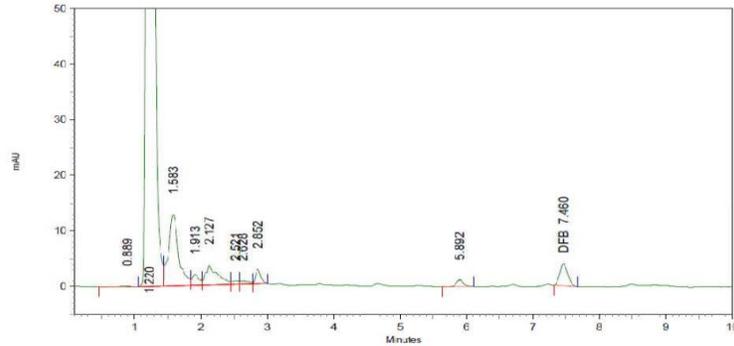
Tiempo 2 Diflubenzur3n Estanque 2 Pool 1



3: 258 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.460	25874	17346.57

Tiempo 2 Diflubenzur3n Estanque 2 Pool 2

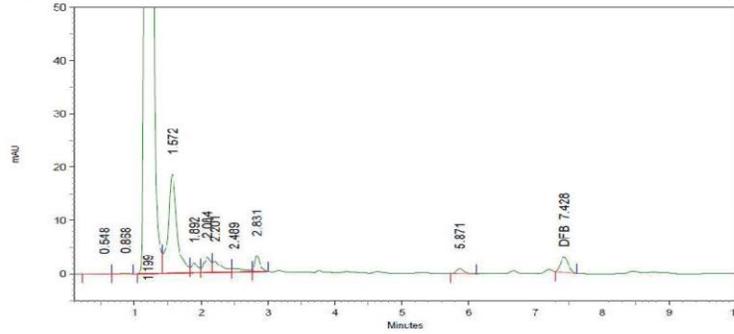


3: 258 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.460	33633	16789.32

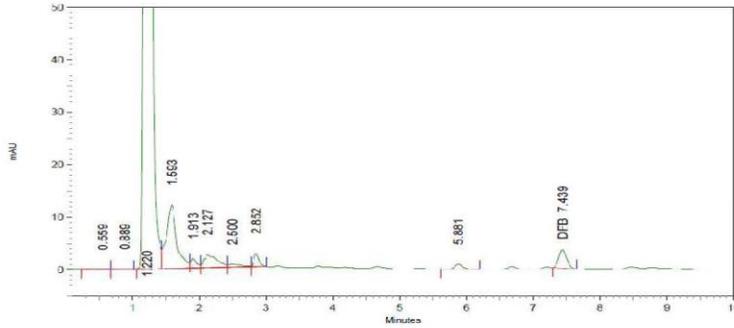


Tiempo 2 Diflubenzur3n Estanque 2 Pool 3



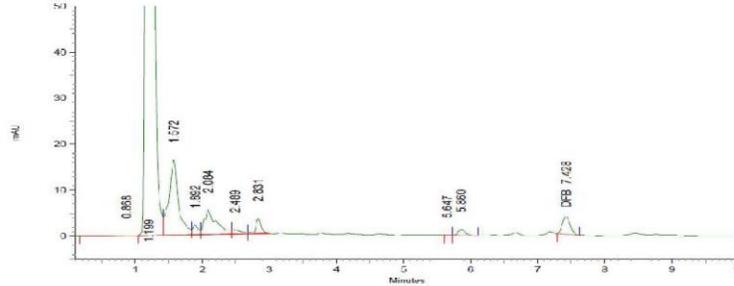
3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.428	22216	18271.62

Tiempo 2 Diflubenzur3n Estanque 2 Pool 4



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.439	29587	16961.94

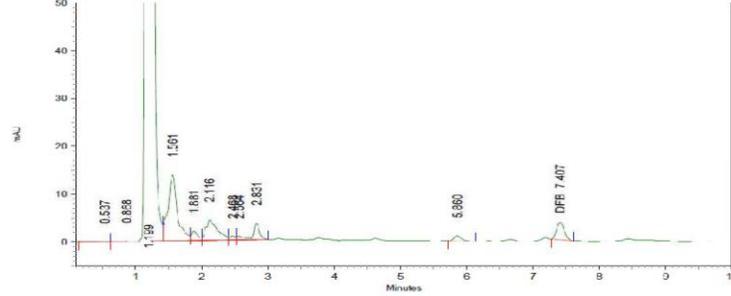
Tiempo 2 Diflubenzur3n Estanque 2 Pool 5



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.428	30803	18134.98

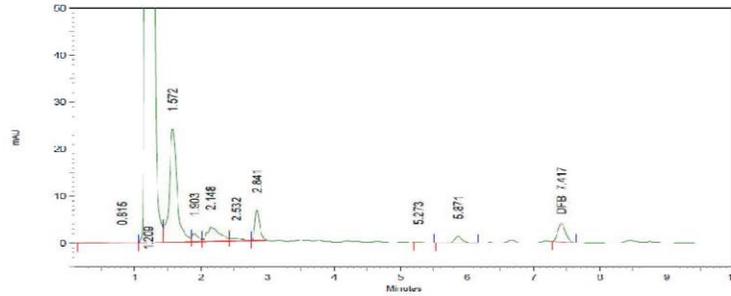


Tiempo 2 Diflubenzur3n Estanque 2 Pool 6



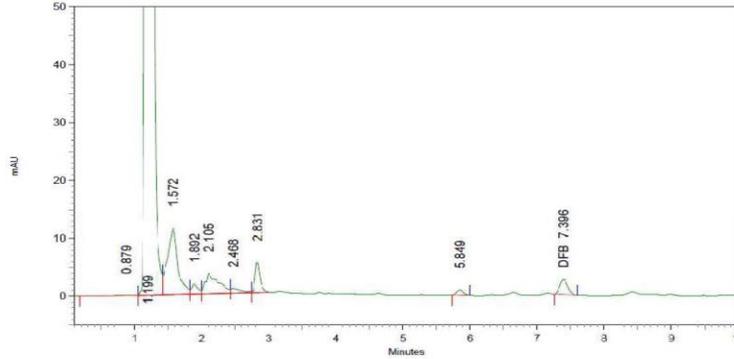
3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.407	29161	18024.31

Tiempo 2 Diflubenzur3n Estanque 2 Pool 7



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.417	31923	17343.47

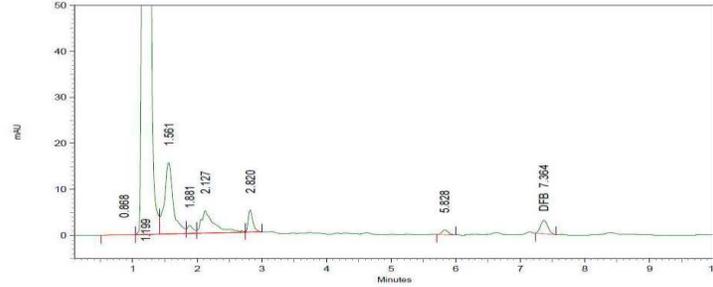
Tiempo 2 Diflubenzur3n Estanque 2 Pool 8



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.396	21637	17454.90

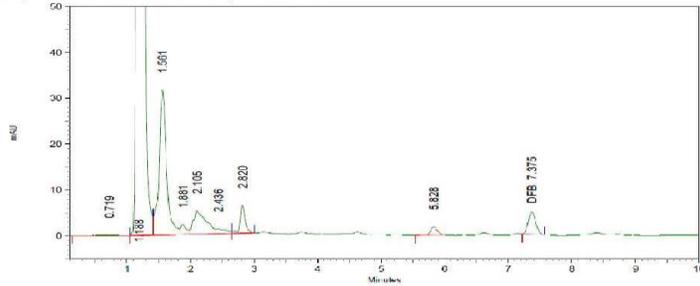


Tiempo 2 Diflubenzur3n Estanque 2 Pool 9



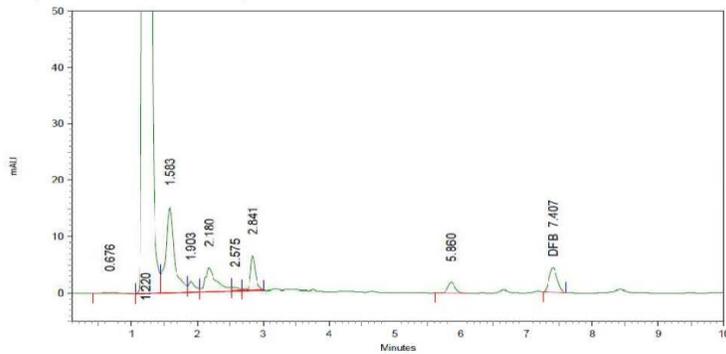
3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.364	23114	17859.13

Tiempo 2 Diflubenzur3n Estanque 2 Pool 10



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.375	39606	16663.76

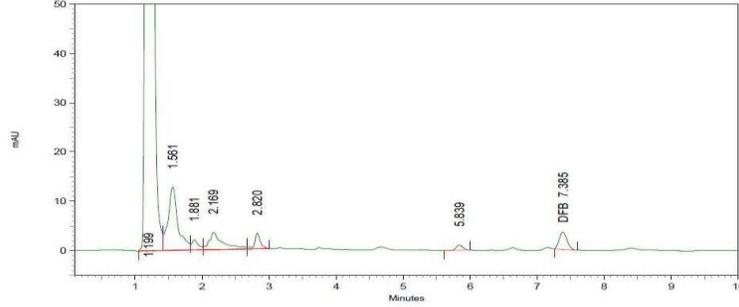
Tiempo 2 Diflubenzur3n Estanque 3 Pool 1



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.407	35317	16934.19

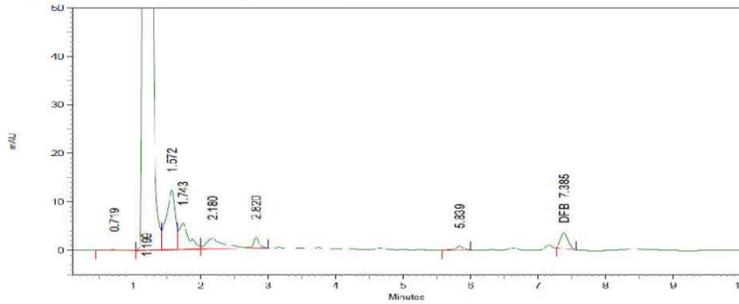


Tiempo 2 Diflubenzur3n Estanque 3 Pool 2



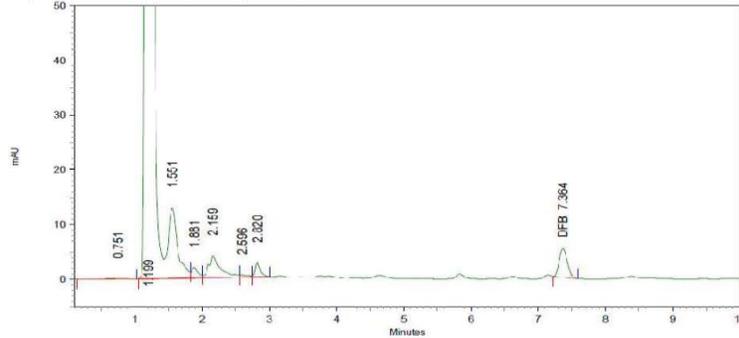
3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.385	28126	17397.16

Tiempo 2 Diflubenzur3n Estanque 3 Pool 3



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.385	25557	18680.61

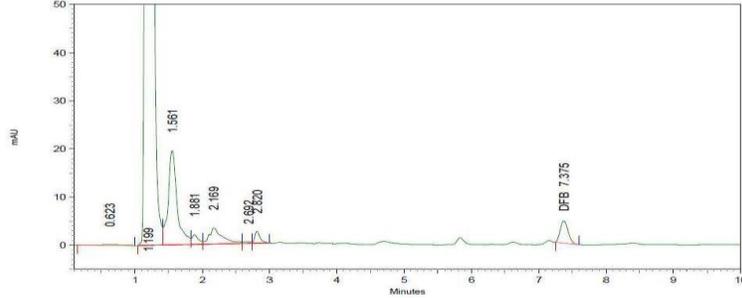
Tiempo 2 Diflubenzur3n Estanque 3 Pool 4



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.364	43766	16723.51



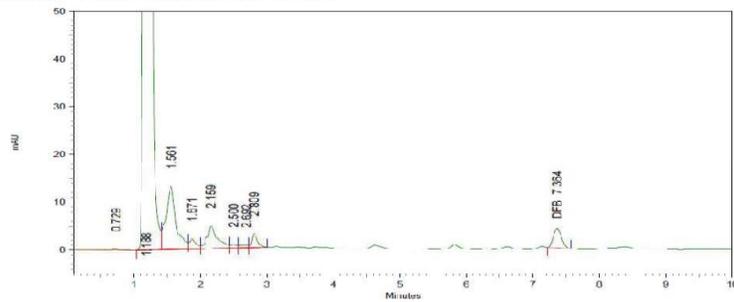
Tiempo 2 Diflubenzur3n Estanque 3 Pool 5



3: 258 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.375	37878	16959.84

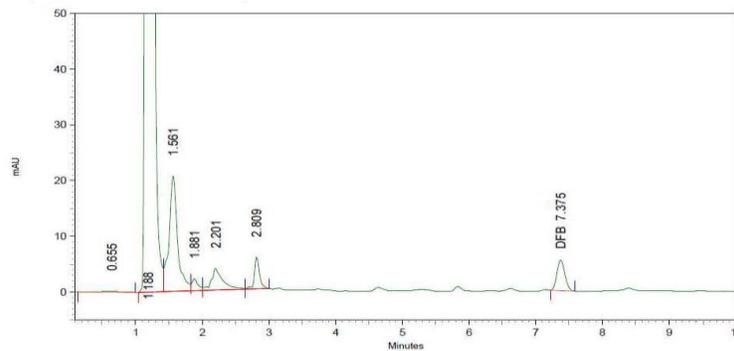
Tiempo 2 Diflubenzur3n Estanque 3 Pool 6



3: 258 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.364	33918	16669.57

Tiempo 2 Diflubenzur3n Estanque 3 Pool 7

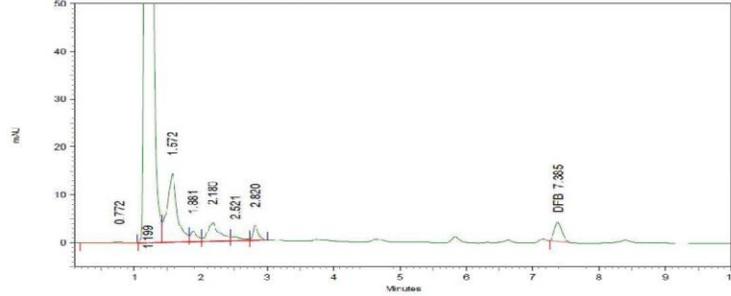


3: 258 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.375	44808	17021.47

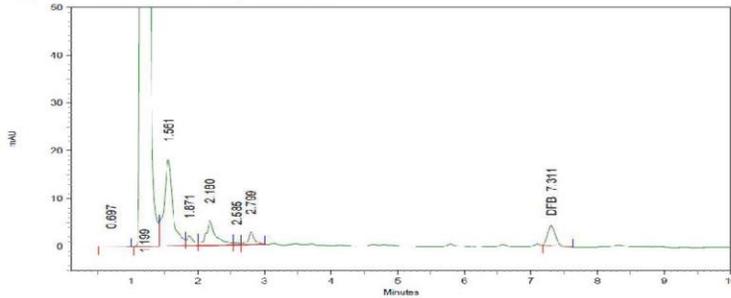


Tiempo 2 Diflubenzur3n Estanque 3 Pool 8



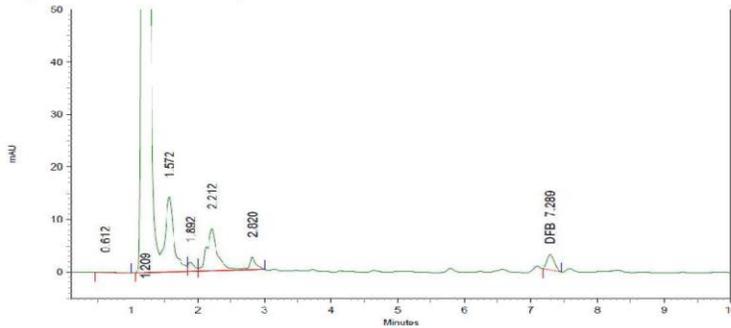
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.385	32257	16919.34

Tiempo 2 Diflubenzur3n Estanque 3 Pool 9



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.311	34140	17851.86

Tiempo 2 Diflubenzur3n Estanque 3 Pool 10

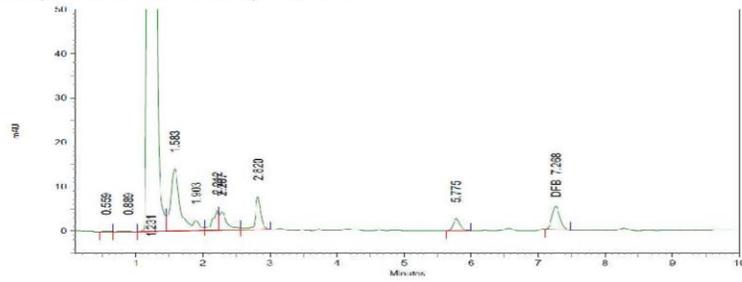


Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.289	22136	19732.97



Cromatogramas de Tiempo 3 de estudio de bioacumulaci3n-depleci3n de Diflubenzur3n 2015.

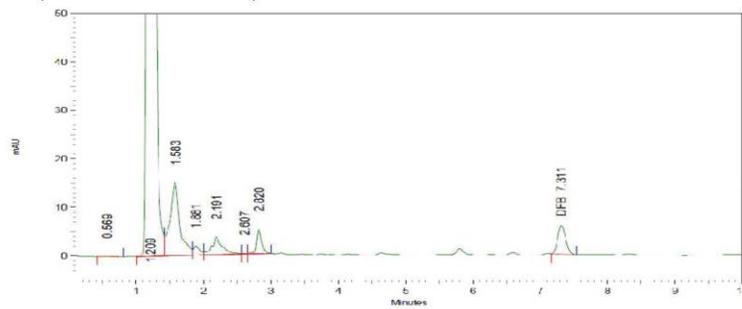
Tiempo 3 Diflubenzur3n Estanque 1 Pool 1



3: 258 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.268	12521	17262.66

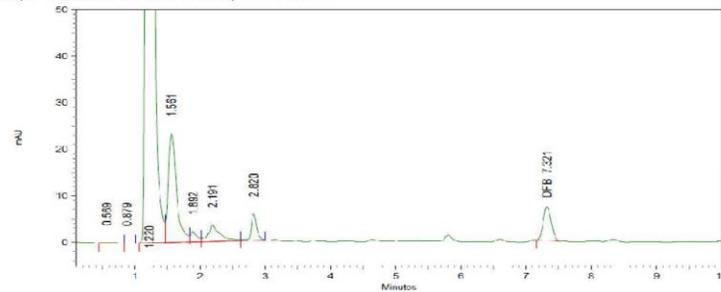
Tiempo 3 Diflubenzur3n Estanque 1 Pool 2



3: 258 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.311	47794	17180.02

Tiempo 3 Diflubenzur3n Estanque 1 Pool 3

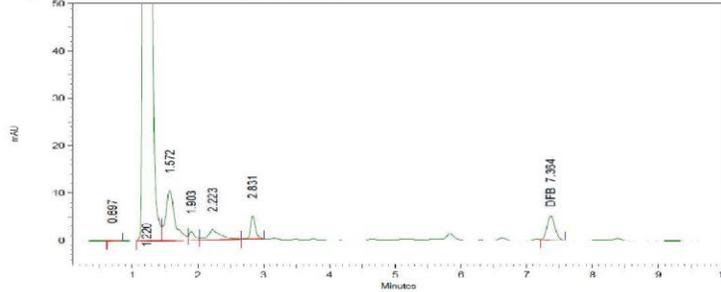


3: 258 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.321	62302	15568.67



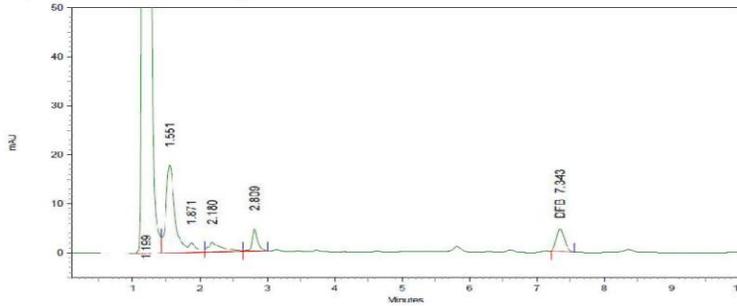
Tiempo 3 Diflubenzurón Estanque 1 Pool 4



3: 258 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.364	41191	17067.28

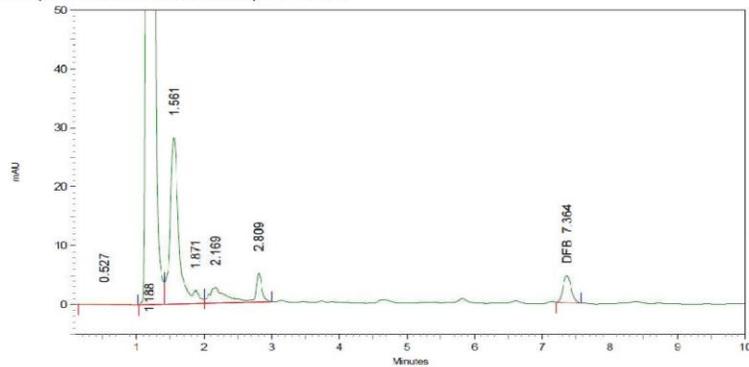
Tiempo 3 Diflubenzurón Estanque 1 Pool 5



3: 258 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.343	38497	15983.40

Tiempo 3 Diflubenzurón Estanque 1 Pool 6

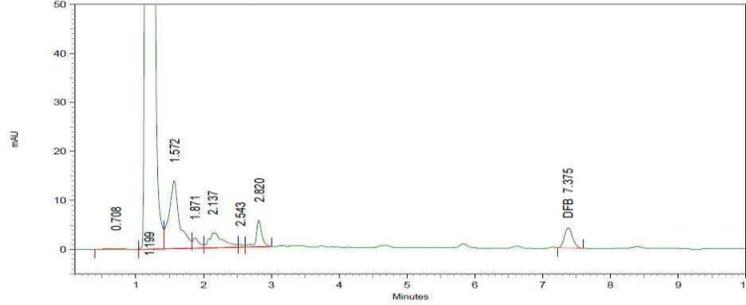


3: 258 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.364	38454	16379.30

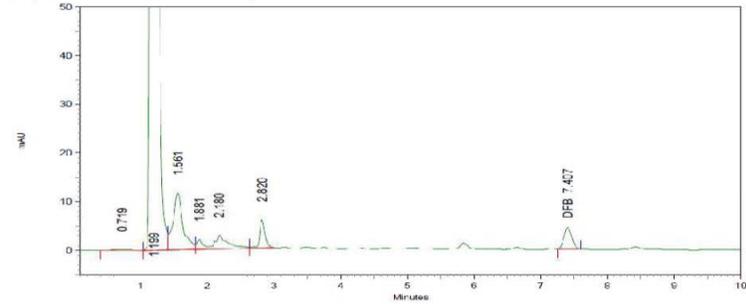


Tiempo 3 Diflubenzur3n Estanque 1 Pool 7



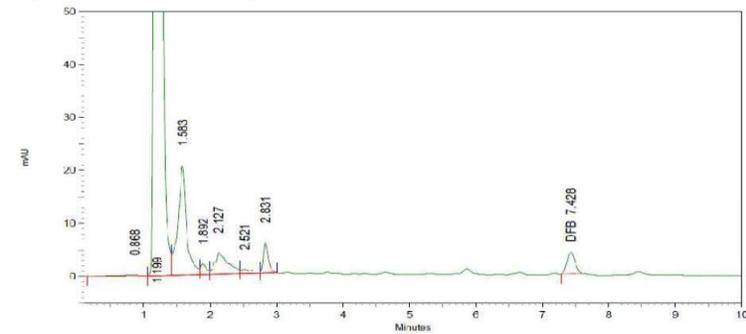
3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.375	34548	16642.71

Tiempo 3 Diflubenzur3n Estanque 1 Pool 8



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.407	36165	16962.75

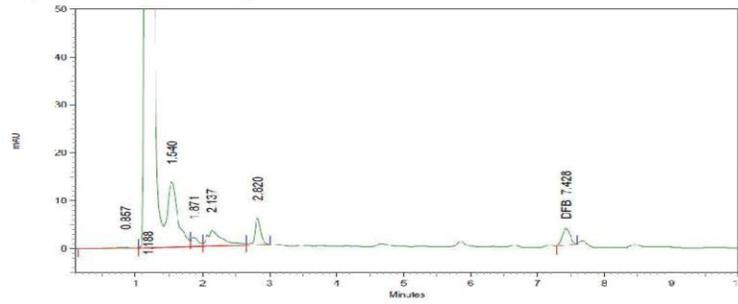
Tiempo 3 Diflubenzur3n Estanque 1 Pool 9



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.428	33974	16784.77

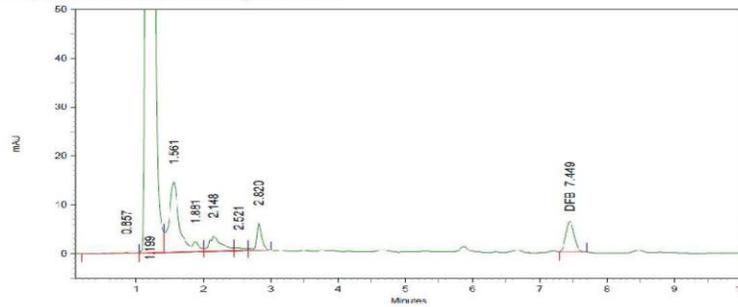


Tiempo 3 Diflubenzur3n Estanque 1 Pool 10



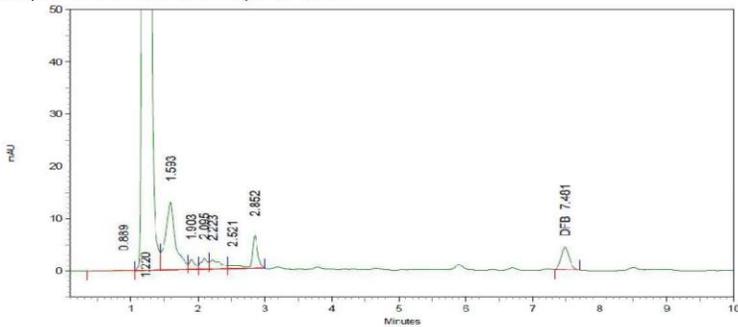
3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.428	28094	17002.70

Tiempo 3 Diflubenzur3n Estanque 2 Pool 1



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.449	53107	16516.04

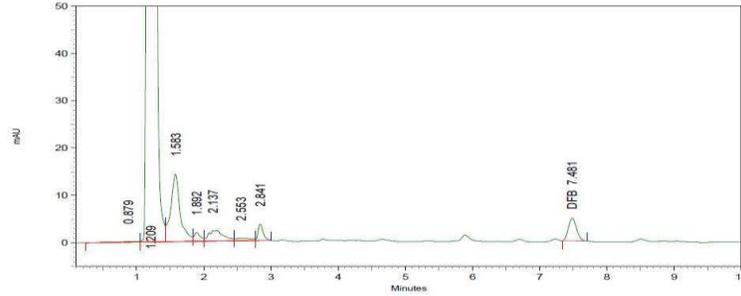
Tiempo 3 Diflubenzur3n Estanque 2 Pool 2



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.481	36380	16757.11



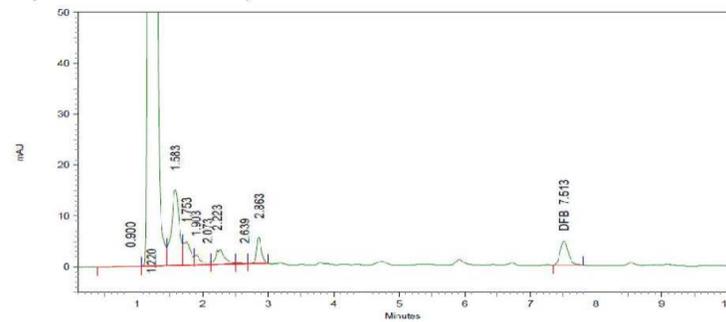
Tiempo 3 Diflubenzur3n Estanque 2 Pool 3



3: 258 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.481	39949	17000.79

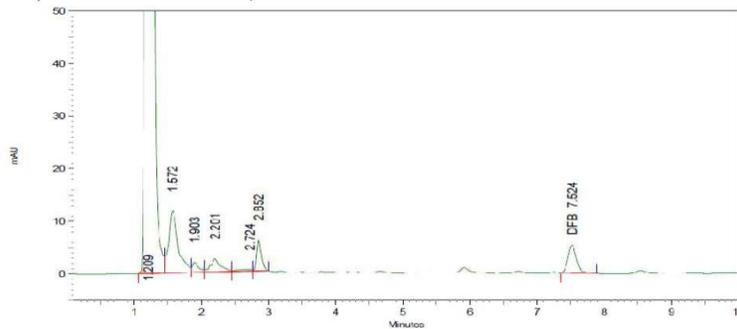
Tiempo 3 Diflubenzur3n Estanque 2 Pool 4



3: 258 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.513	40878	16631.54

Tiempo 3 Diflubenzur3n Estanque 2 Pool 5

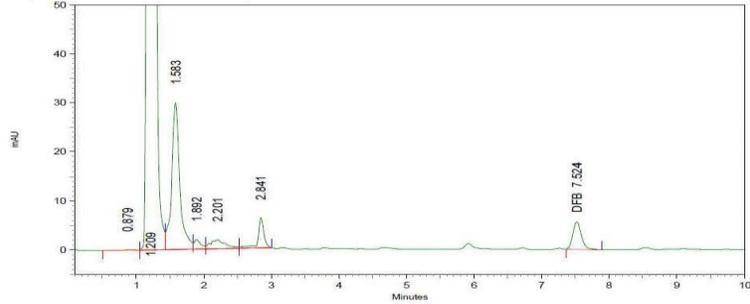


3: 258 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.524	47337	15786.61

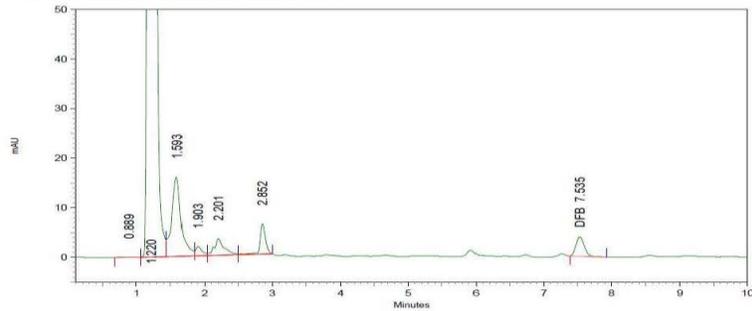


Tiempo 3 Diflubenzur3n Estanque 2 Pool 6



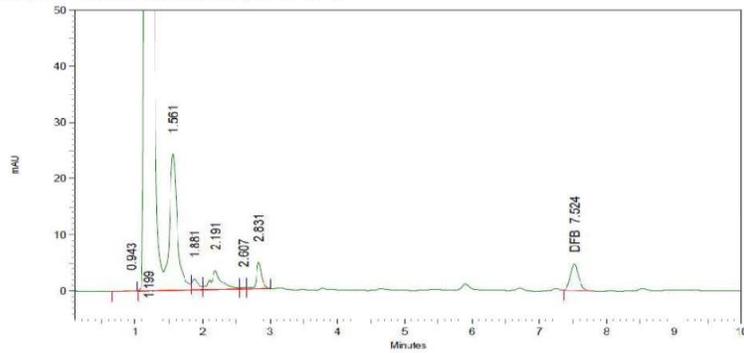
3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.524	49748	16139.84

Tiempo 3 Diflubenzur3n Estanque 2 Pool 7



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.535	33875	16214.94

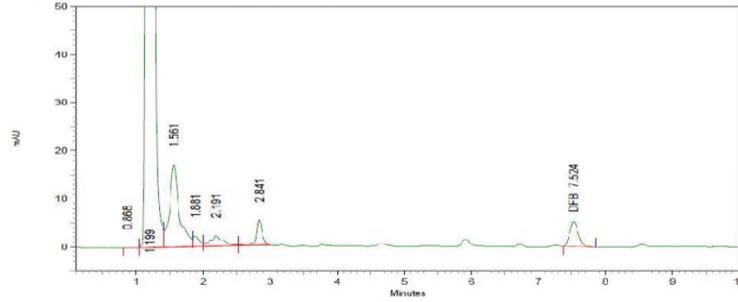
Tiempo 3 Diflubenzur3n Estanque 2 Pool 8



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.524	41687	15907.10

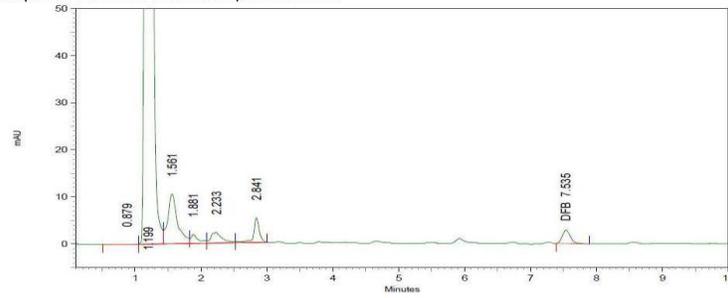


Tiempo 3 Diflubenzur3n Estanque 2 Pool 9



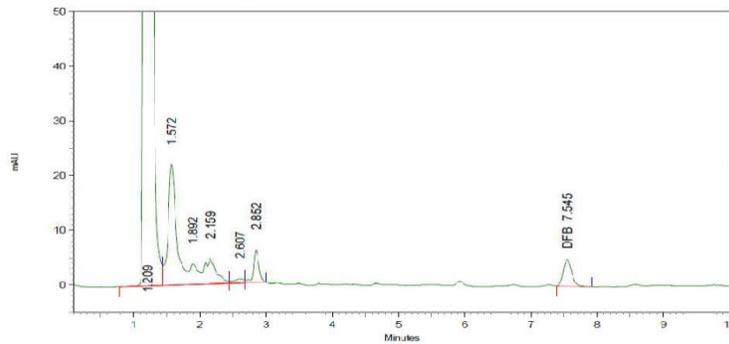
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.524	43927	15838.22

Tiempo 3 Diflubenzur3n Estanque 2 Pool 10



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.535	25684	16863.20

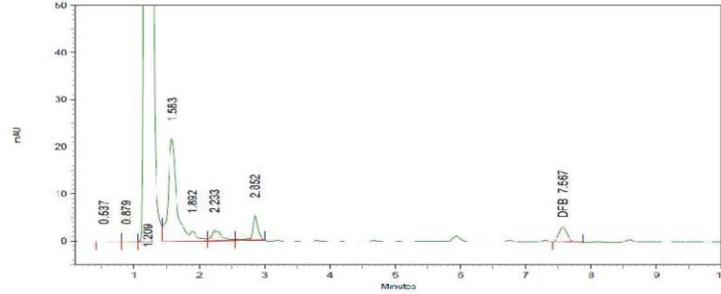
Tiempo 3 Diflubenzur3n Estanque 3 Pool 1



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.545	43340	16464.61

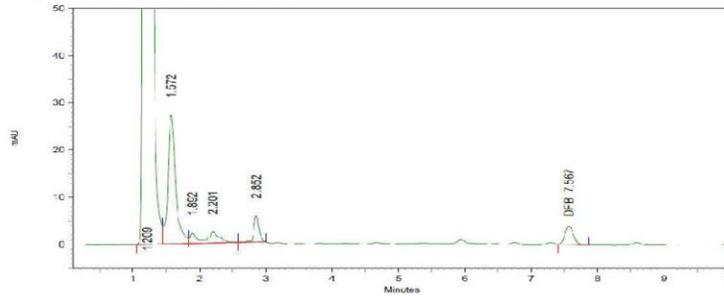


Tiempo 3 Diflubenzur3n Estanque 3 Pool 2



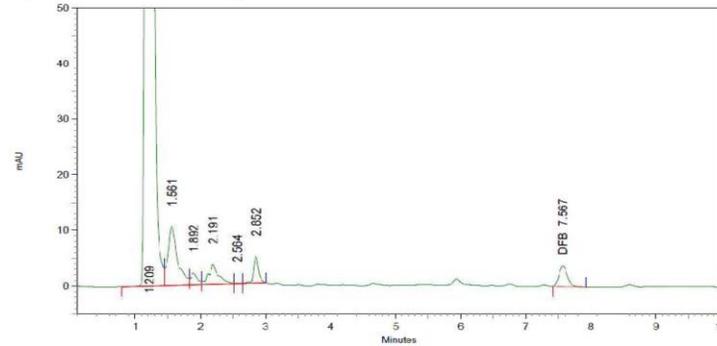
3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFH	7.567	27672	16601.76

Tiempo 3 Diflubenzur3n Estanque 3 Pool 3



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.567	33895	16783.33

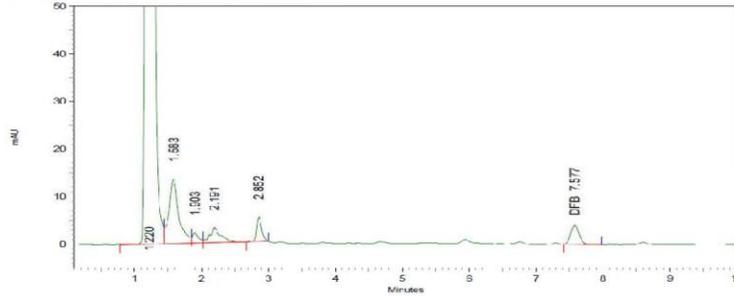
Tiempo 3 Diflubenzur3n Estanque 3 Pool 4



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.567	32929	16662.61

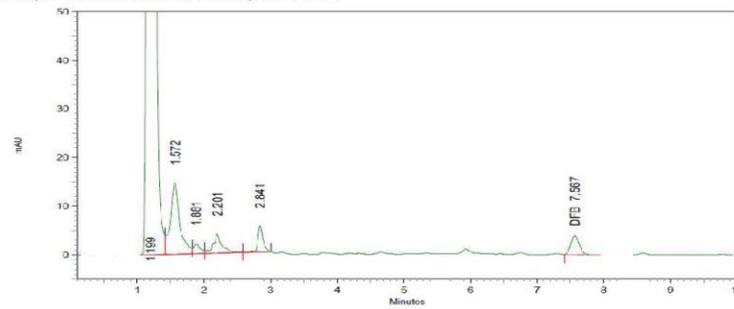


Tiempo 3 Diflubenzurón Estanque 3 Pool 5



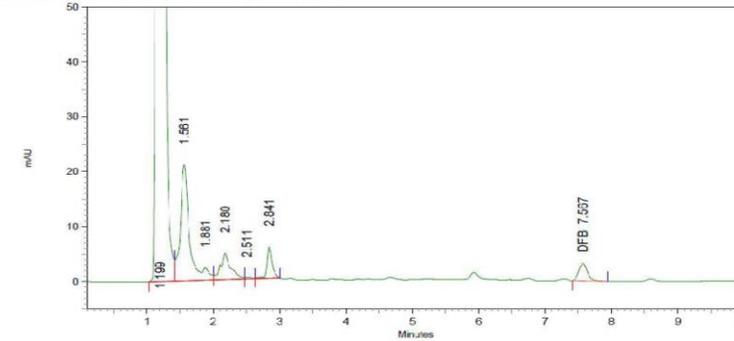
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.577	35752	16333.46

Tiempo 3 Diflubenzurón Estanque 3 Pool 6



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.567	34631	16318.79

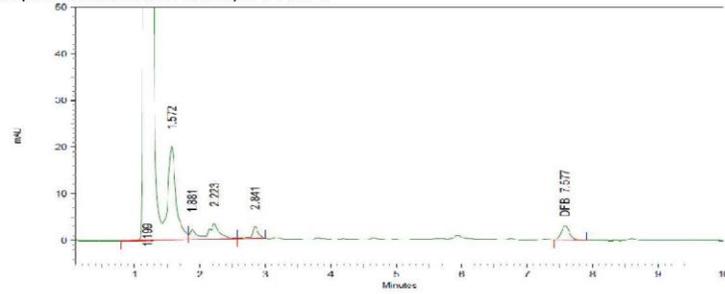
Tiempo 3 Diflubenzurón Estanque 3 Pool 7



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.567	28318	16462.73

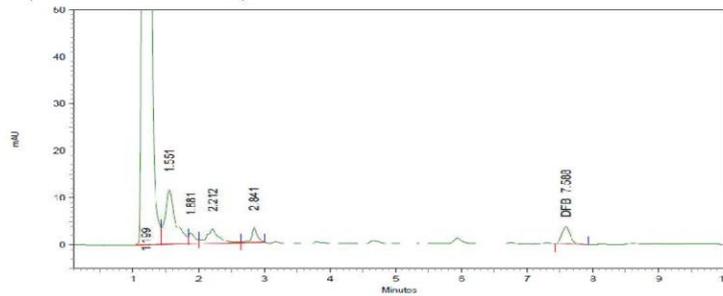


Tiempo 3 Diflubenzur3n Estanque 3 Pool 8



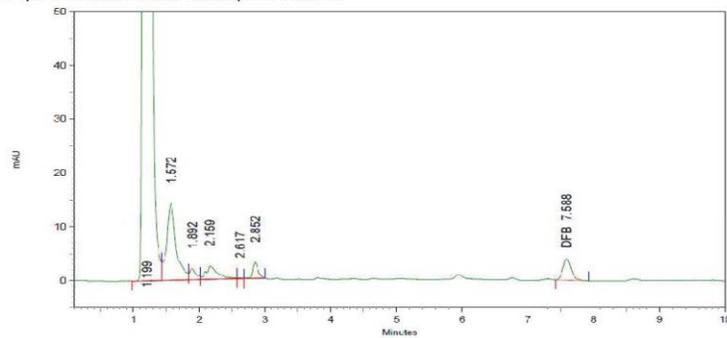
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.577	27376	15545.37

Tiempo 3 Diflubenzur3n Estanque 3 Pool 9



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.588	33491	15991.46

Tiempo 3 Diflubenzur3n Estanque 3 Pool 10

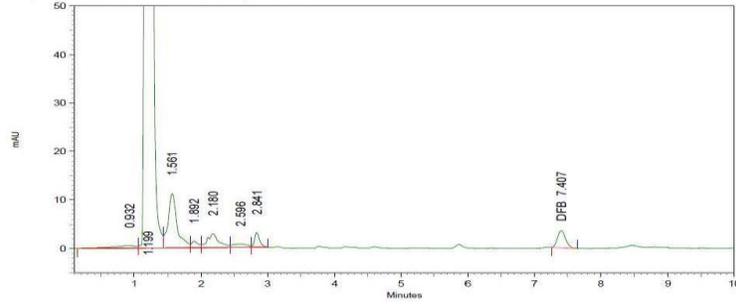


Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.588	35853	16363.55



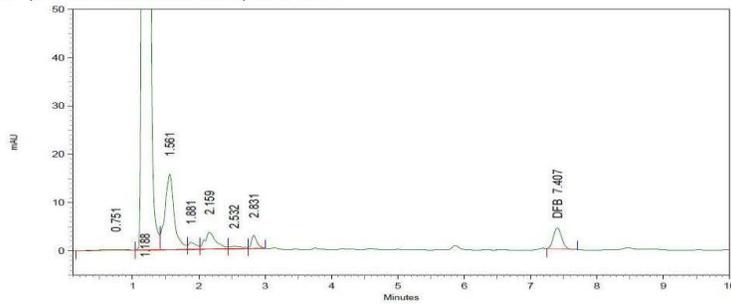
Cromatogramas de Tiempo 4 de estudio de bioacumulaci3n-depleci3n de Diflubenzur3n 2015.

Tiempo 4 Diflubenzur3n Estanque 1 Pool 1



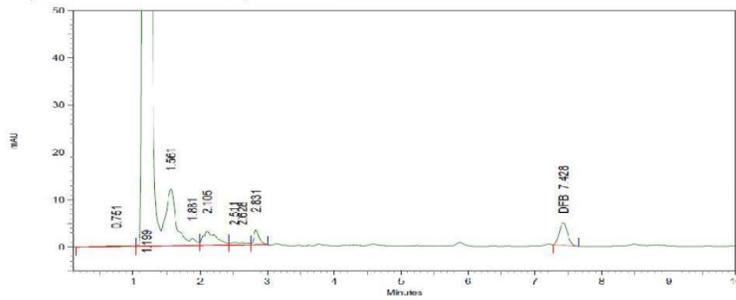
3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.407	30134	16285.98

Tiempo 4 Diflubenzur3n Estanque 1 Pool 2



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.407	37421	15646.69

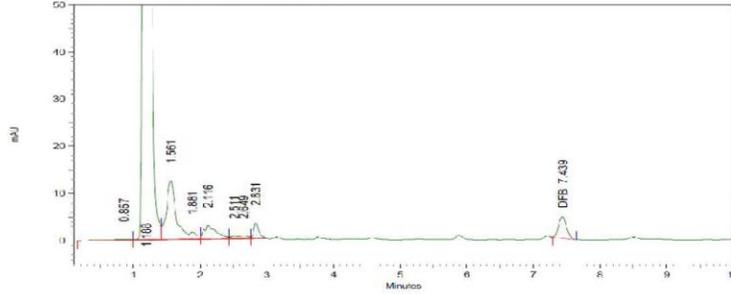
Tiempo 4 Diflubenzur3n Estanque 1 Pool 3



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.428	40032	16217.43



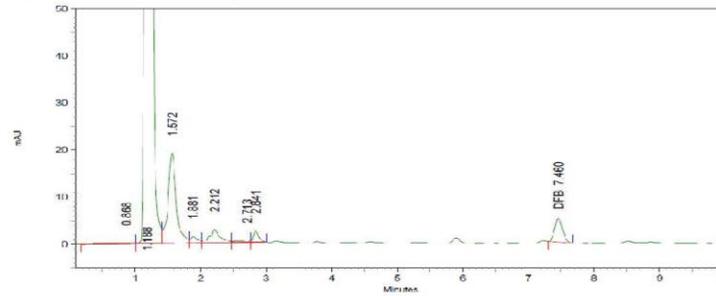
Tiempo 4 Diflubenzur3n Estanque 1 Pool 4



3: 258 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.439	36966	16845.86

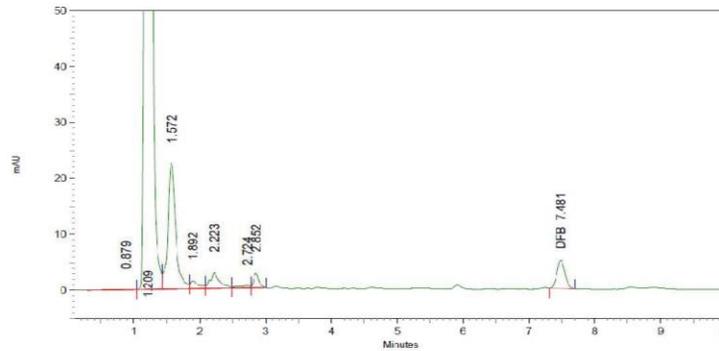
Tiempo 4 Diflubenzur3n Estanque 1 Pool 5



3: 258 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.460	42301	16408.07

Tiempo 4 Diflubenzur3n Estanque 1 Pool 6

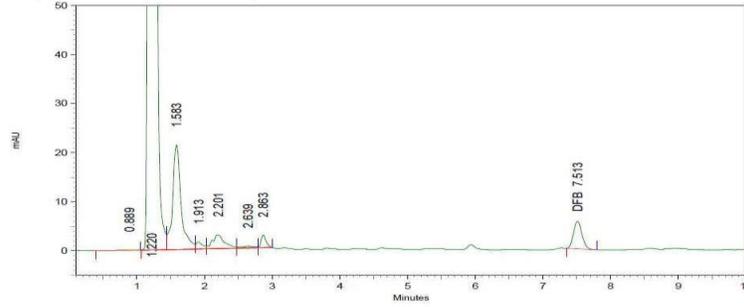


3: 258 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.481	43964	16190.13

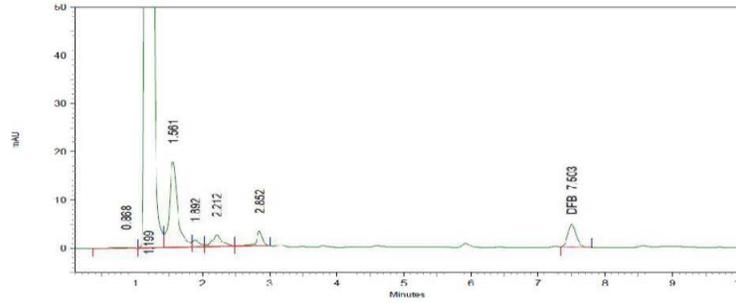


Tiempo 4 Diflubenzur3n Estanque 1 Pool 7



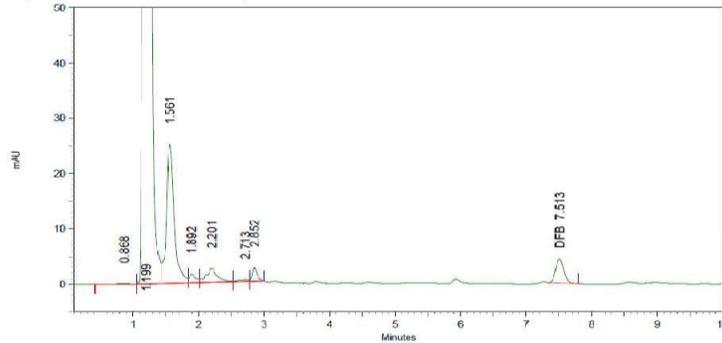
3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.513	49354	15839.60

Tiempo 4 Diflubenzur3n Estanque 1 Pool 8



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.503	40707	16302.12

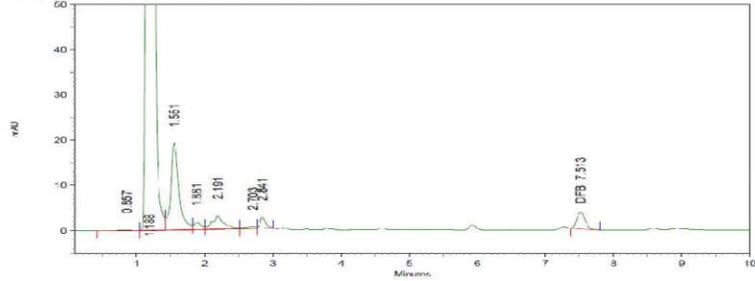
Tiempo 4 Diflubenzur3n Estanque 1 Pool 9



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.513	37081	16019.05



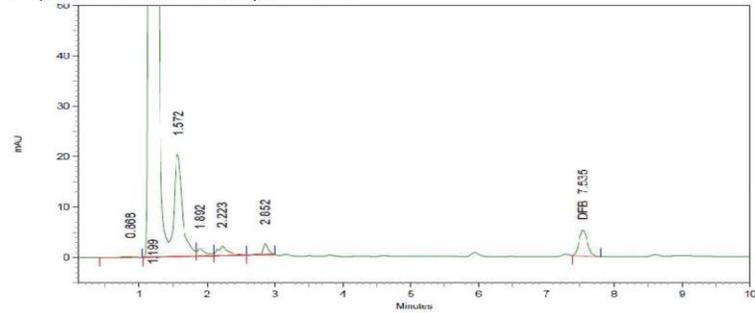
Tiempo 4 Diflubenzur3n Estanque 1 Pool 10



3: 258 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.513	31428	16172.77

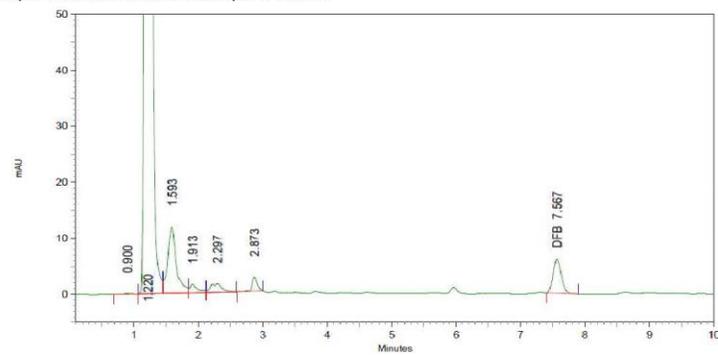
Tiempo 4 Diflubenzur3n Estanque 2 Pool 1



3: 258 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.535	44058	15784.17

Tiempo 4 Diflubenzur3n Estanque 2 Pool 2

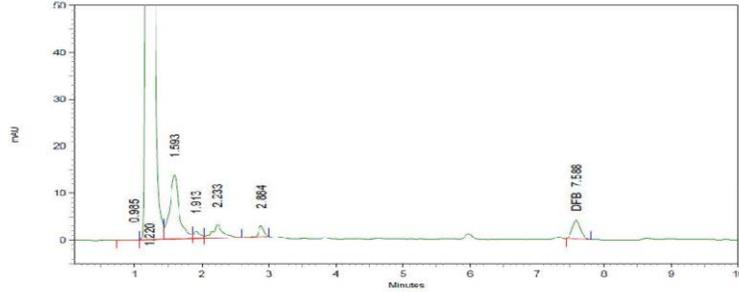


3: 258 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.567	53749	16118.17

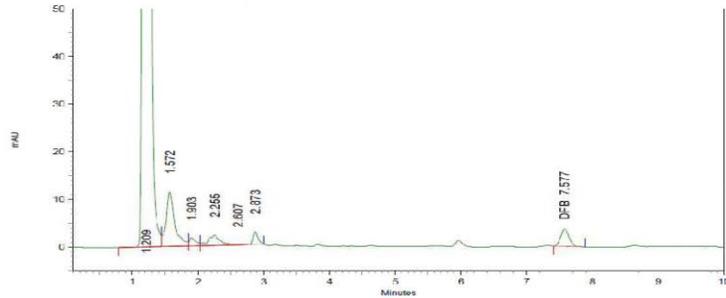


Tiempo 4 Diflubenzur3n Estanque 2 Pool 3



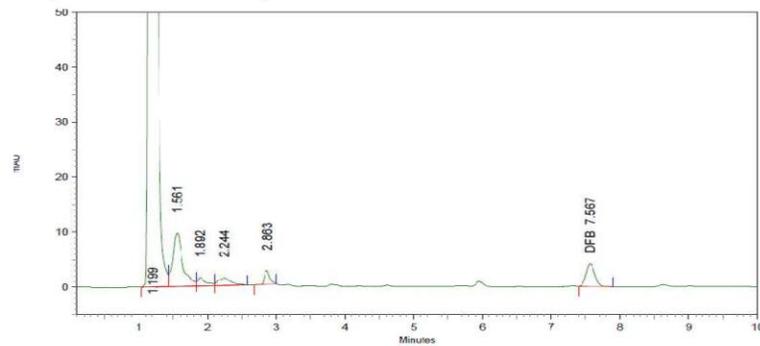
3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.588	33627	16346.65

Tiempo 4 Diflubenzur3n Estanque 2 Pool 4



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.577	31769	16187.40

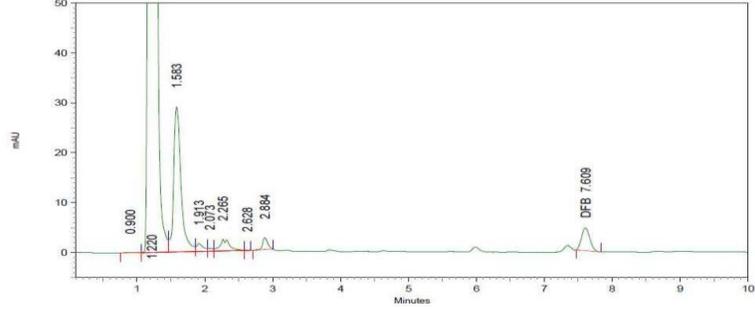
Tiempo 4 Diflubenzur3n Estanque 2 Pool 5



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.567	36950	16114.46

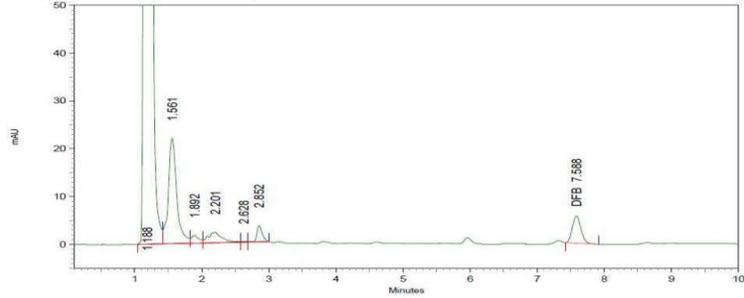


Tiempo 4 Diflubenzur3n Estanque 2 Pool 6



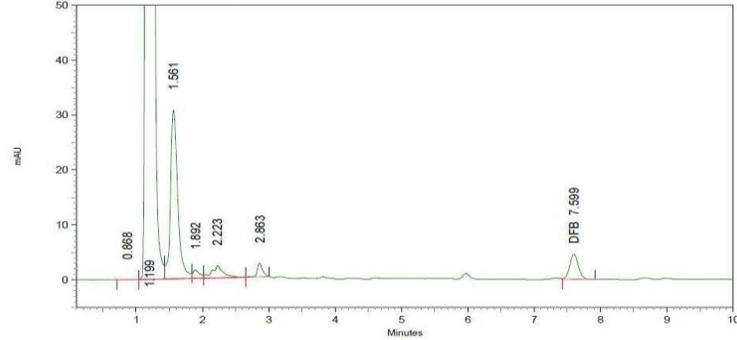
3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.609	38502	16855.14

Tiempo 4 Diflubenzur3n Estanque 2 Pool 7



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.588	50355	15619.61

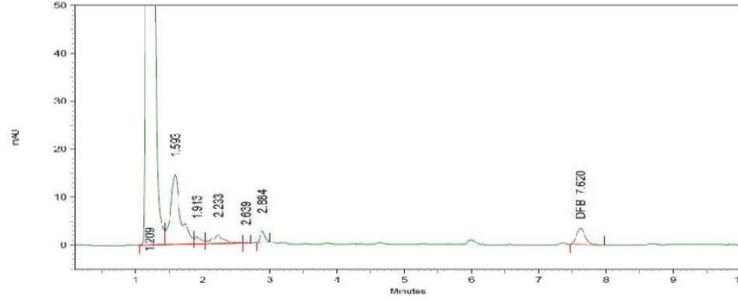
Tiempo 4 Diflubenzur3n Estanque 2 Pool 8



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.599	40019	15948.73

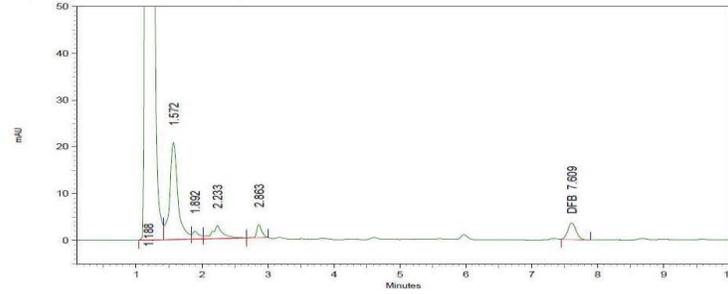


Tiempo 4 Diflubenzur3n Estanque 2 Pool 9



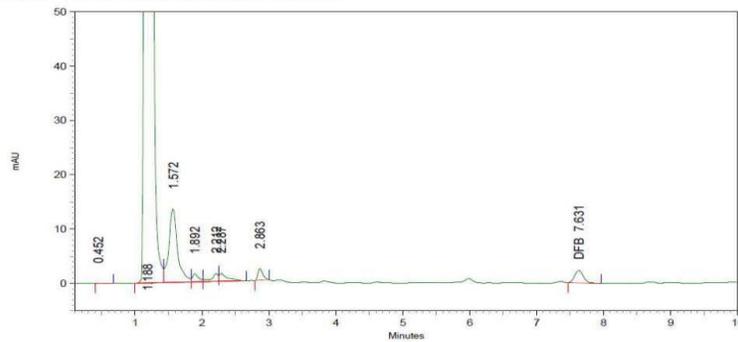
3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.620	29682	15669.81

Tiempo 4 Diflubenzur3n Estanque 2 Pool 10



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.609	31154	16102.79

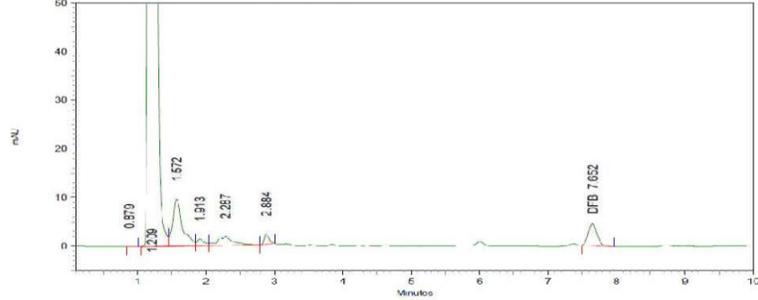
Tiempo 4 Diflubenzur3n Estanque 3 Pool 1



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.631	20677	15849.56

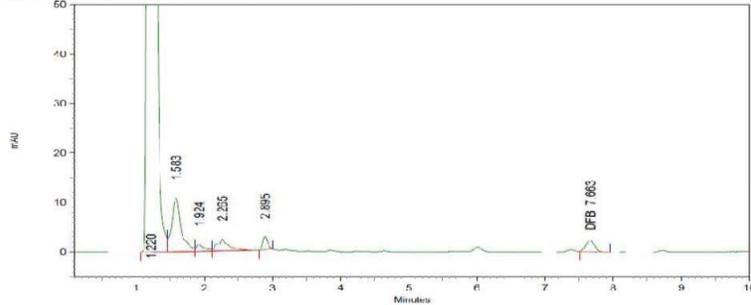


Tiempo 4 Diflubenzur3n Estanque 3 Pool 2



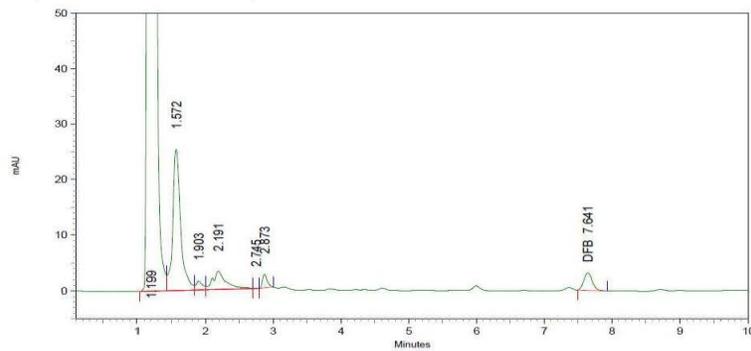
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.652	40565	15820.13

Tiempo 4 Diflubenzur3n Estanque 3 Pool 3



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.663	20258	15863.20

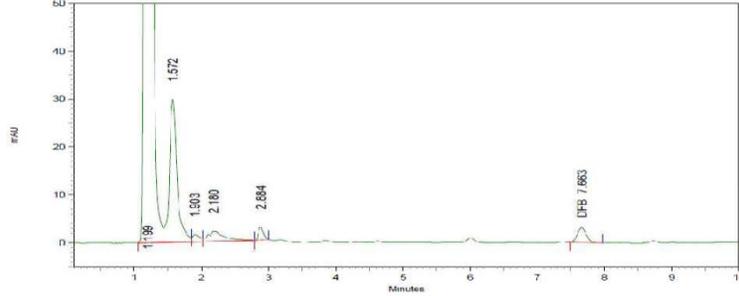
Tiempo 4 Diflubenzur3n Estanque 3 Pool 4



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.641	26543	16439.38

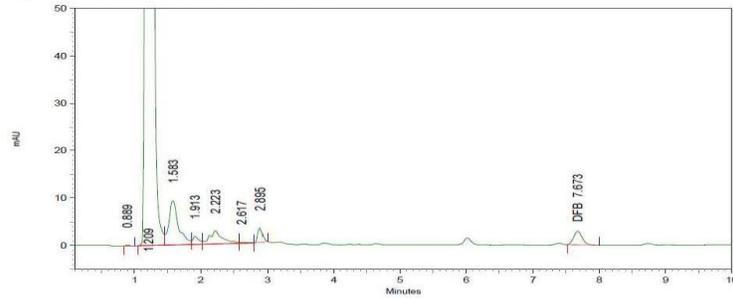


Tiempo 4 Diflubenzur3n Estanque 3 Pool 5



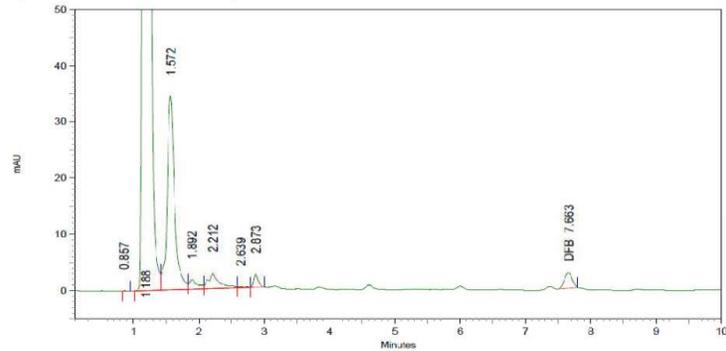
3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.663	28111	15344.54

Tiempo 4 Diflubenzur3n Estanque 3 Pool 6



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.673	26174	15784.96

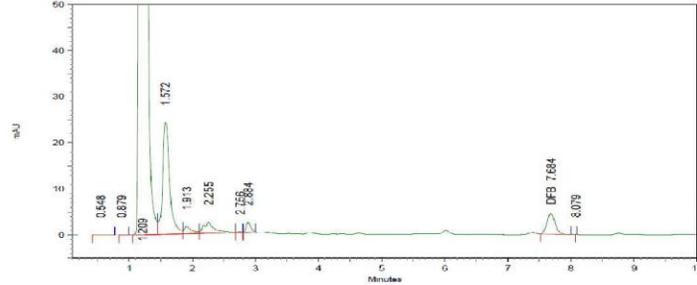
Tiempo 4 Diflubenzur3n Estanque 3 Pool 7



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.663	22622	17870.29

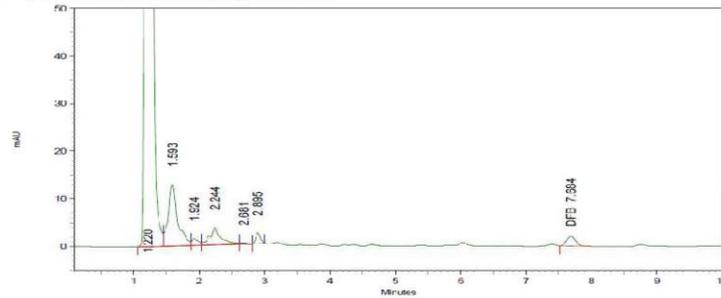


Tiempo 4 Diflubenzur3n Estanque 3 Pool 8



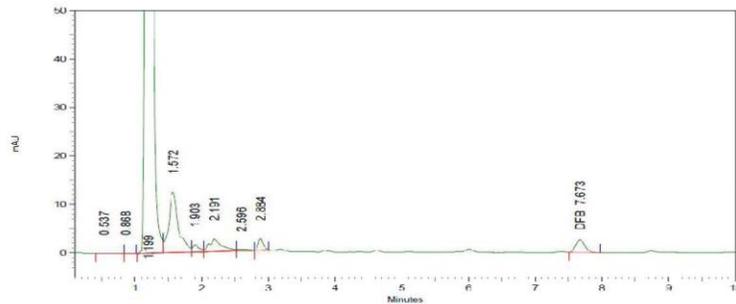
3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.684	40004	15728.07

Tiempo 4 Diflubenzur3n Estanque 3 Pool 9



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.684	18716	16044.75

Tiempo 4 Diflubenzur3n Estanque 3 Pool 10

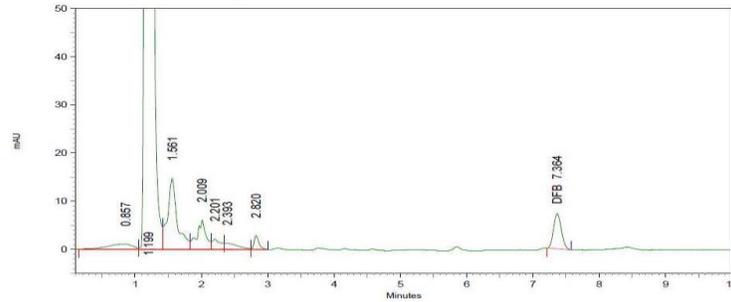


3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.673	24313	15315.24



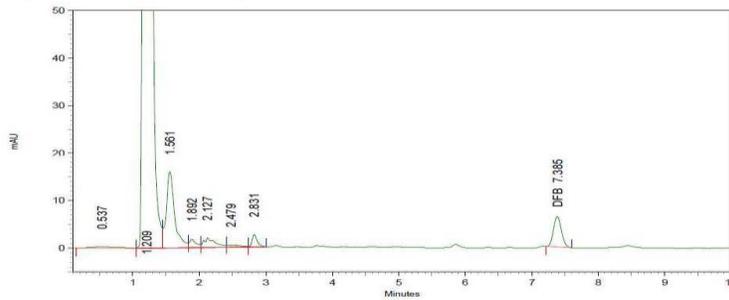
Cromatogramas de Tiempo 5 de estudio de bioacumulaci3n-depleci3n de Diflubenzur3n 2015.

Tiempo 5 Diflubenzur3n Estanque 1 Pool 1



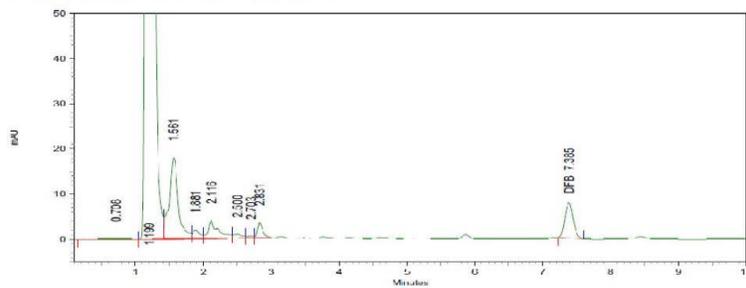
3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.364	60031	17227.56

Tiempo 5 Diflubenzur3n Estanque 1 Pool 2



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.385	52923	17119.47

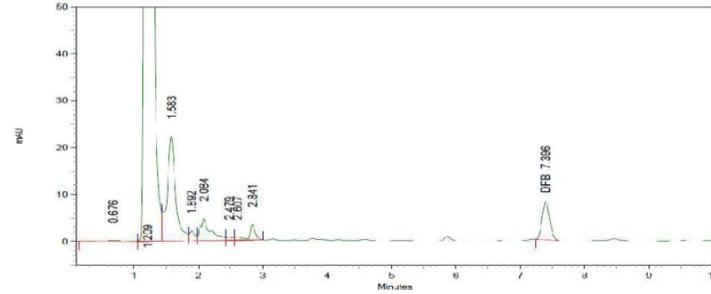
Tiempo 5 Diflubenzur3n Estanque 1 Pool 3



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.385	64945	16710.51

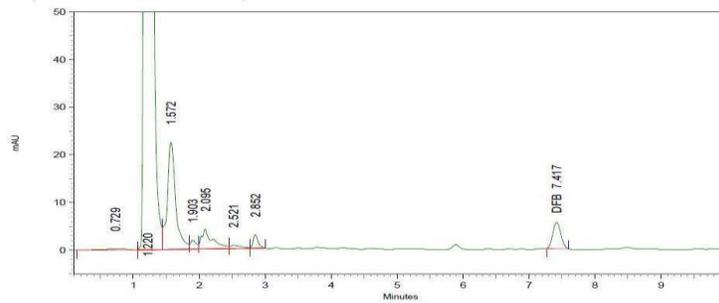


Tiempo 5 Diflubenzur3n Estanque 1 Pool 4



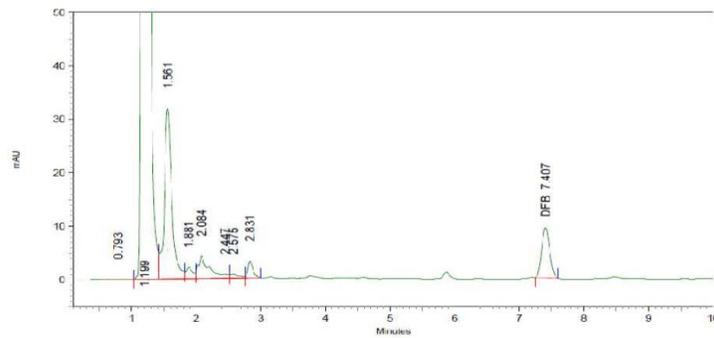
3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.396	65850	16907.20

Tiempo 5 Diflubenzur3n Estanque 1 Pool 5



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.417	45921	16642.49

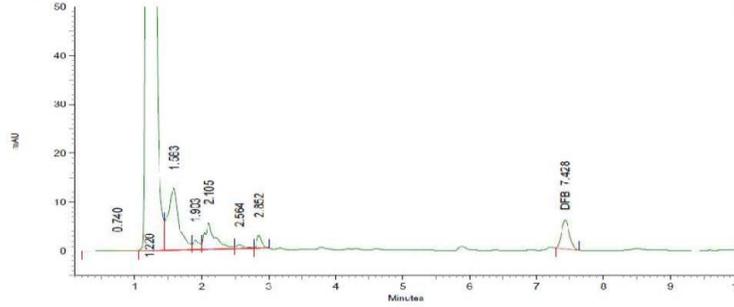
Tiempo 5 Diflubenzur3n Estanque 1 Pool 6



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.407	78992	16308.55



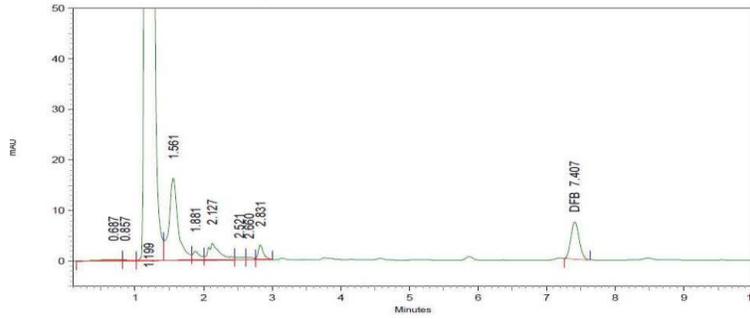
Tiempo 5 Diflubenzur3n Estanque 1 Pool 7



3: 258 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.428	17958	17308.96

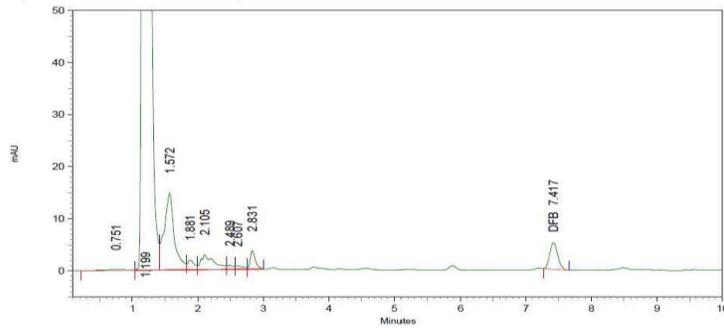
Tiempo 5 Diflubenzur3n Estanque 1 Pool 8



3: 258 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.407	61021	16854.80

Tiempo 5 Diflubenzur3n Estanque 1 Pool 9

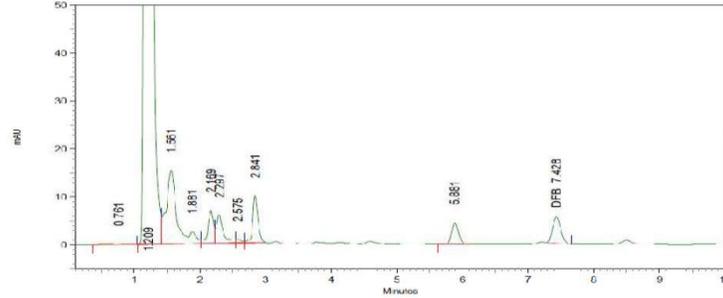


3: 258 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.417	43023	16660.39

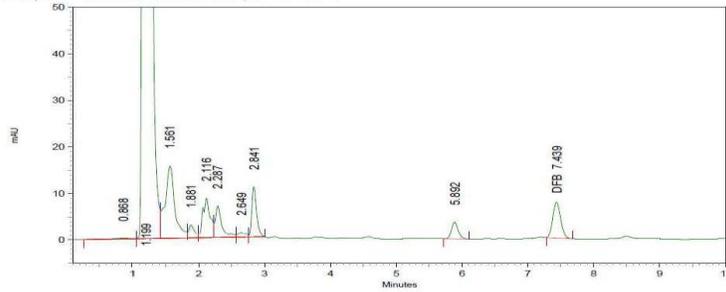


Tiempo 5 Diflubenzurón Estanque 1 Pool 10



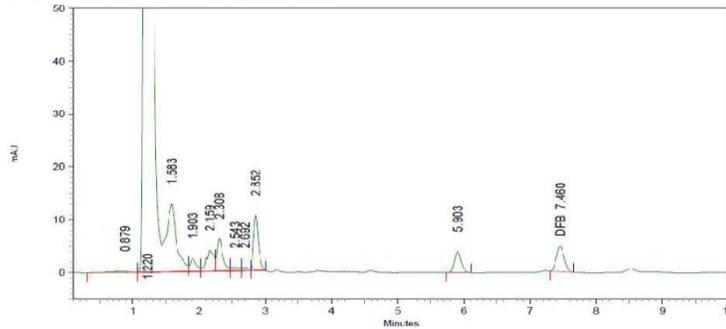
3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.428	46785	16386.32

Tiempo 5 Diflubenzurón Estanque 2 Pool 1



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.439	65874	16432.48

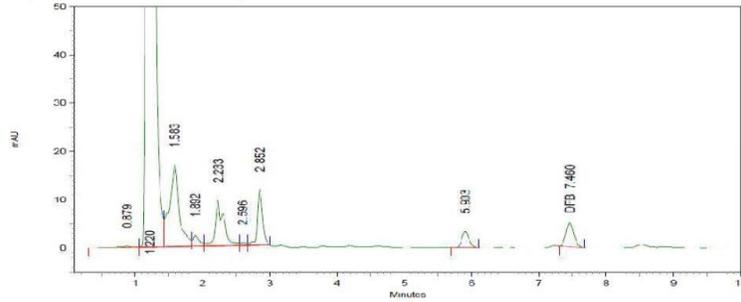
Tiempo 5 Diflubenzurón Estanque 2 Pool 2



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.460	39119	16739.23

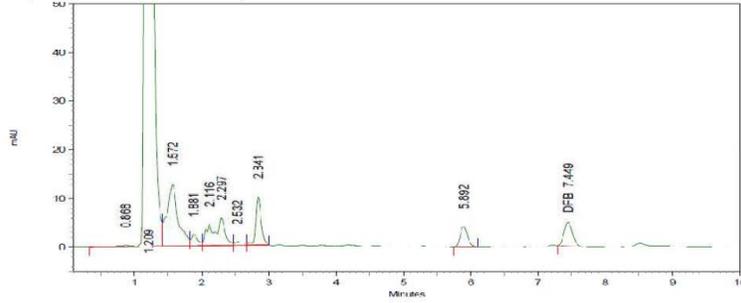


Tiempo 5 Diflubenzurón Estanque 2 Pool 3



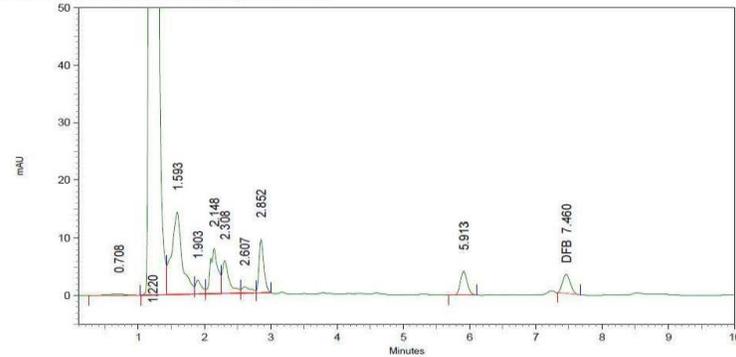
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.460	10744	16927.14

Tiempo 5 Diflubenzurón Estanque 2 Pool 4



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.449	12681	15964.01

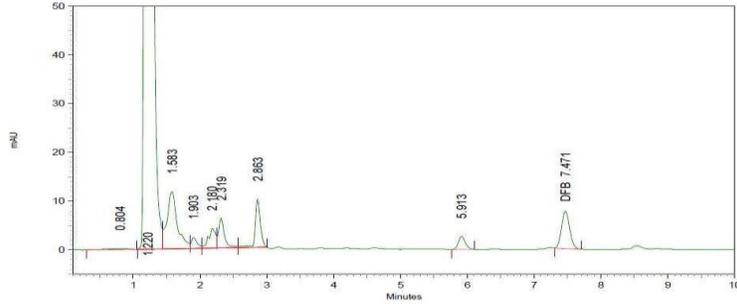
Tiempo 5 Diflubenzurón Estanque 2 Pool 5



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.460	27226	17389.49

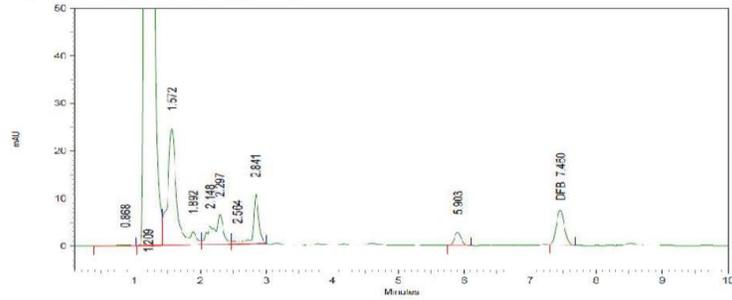


Tiempo 5 Diflubenzurón Estanque 2 Pool 6



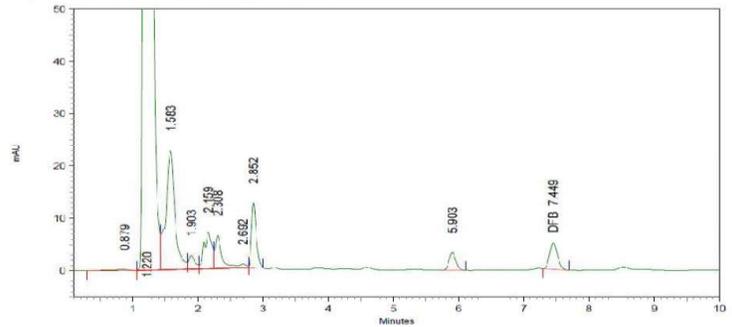
3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.471	65086	16301.13

Tiempo 5 Diflubenzurón Estanque 2 Pool 7



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.460	61571	16162.46

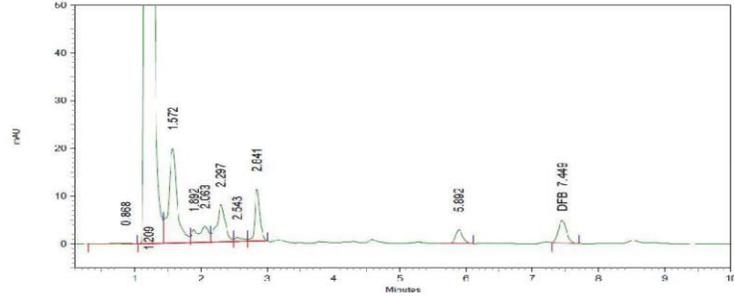
Tiempo 5 Diflubenzurón Estanque 2 Pool 8



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.449	43131	16567.16

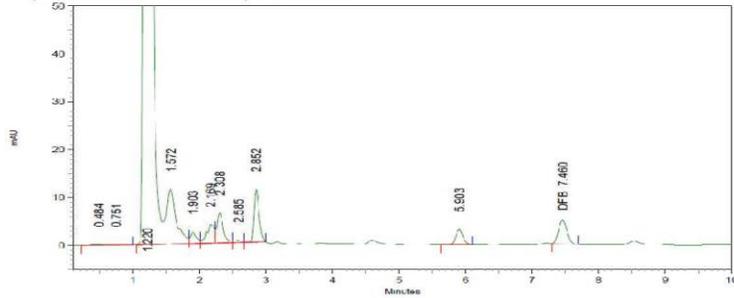


Tiempo 5 Diflubenzur3n Estanque 2 Pool 9



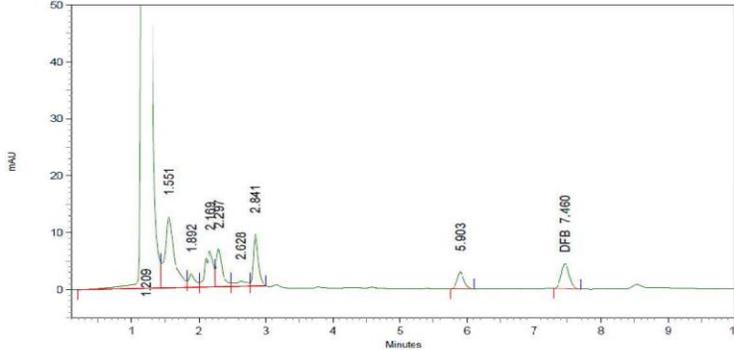
3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.449	39666	16701.93

Tiempo 5 Diflubenzur3n Estanque 2 Pool 10



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.460	43181	15748.48

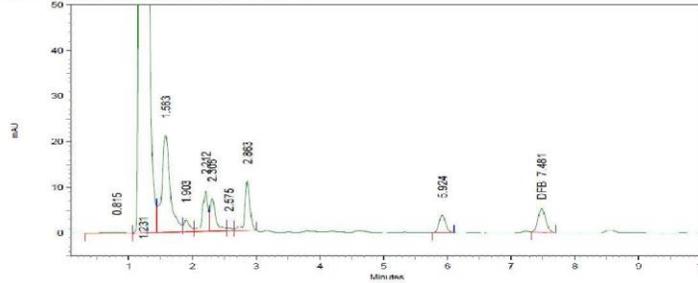
Tiempo 5 Diflubenzur3n Estanque 3 Pool 1



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.460	36767	16518.69

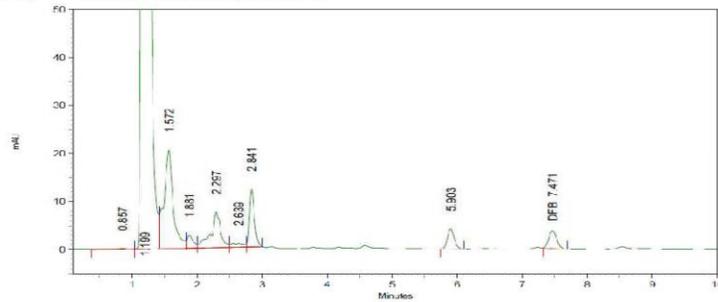


Tiempo 5 Diflubenzur3n Estanque 3 Pool 2



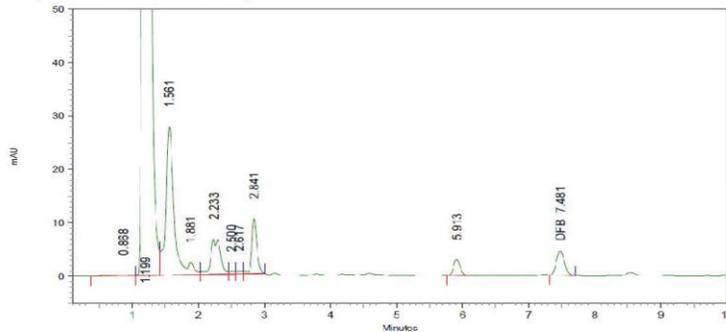
3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.481	44171	16529.04

Tiempo 5 Diflubenzur3n Estanque 3 Pool 3



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.471	30949	16316.37

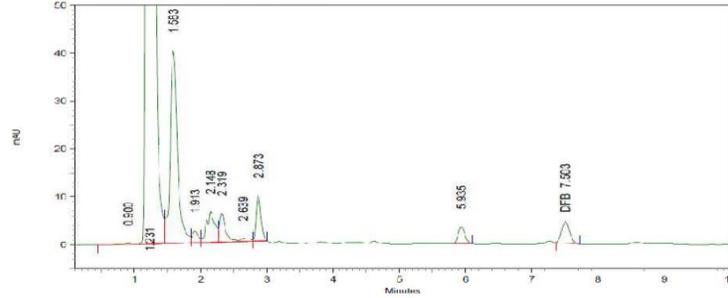
Tiempo 5 Diflubenzur3n Estanque 3 Pool 4



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.481	38407	16292.29

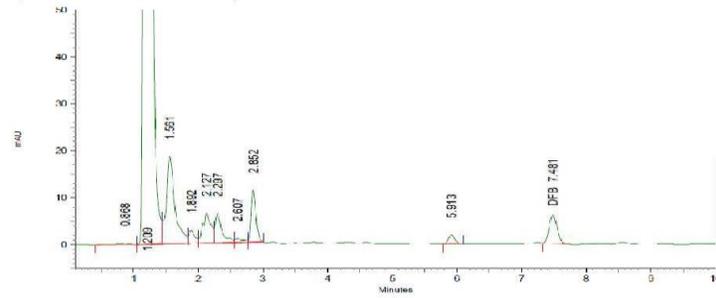


Tiempo 5 Diflubenzur3n Estanque 3 Pool 5



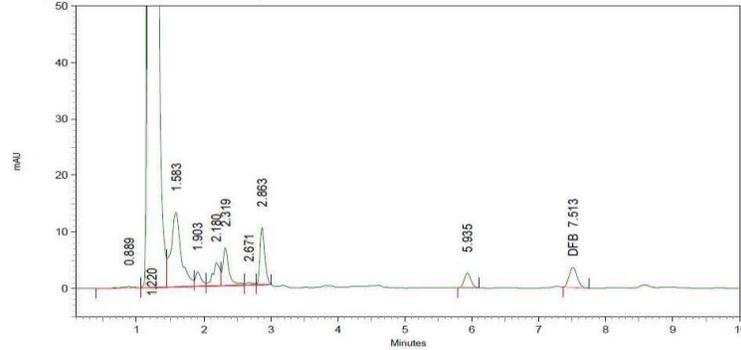
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.503	36956	17210.67

Tiempo 5 Diflubenzur3n Estanque 3 Pool 6



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.481	51813	15738.74

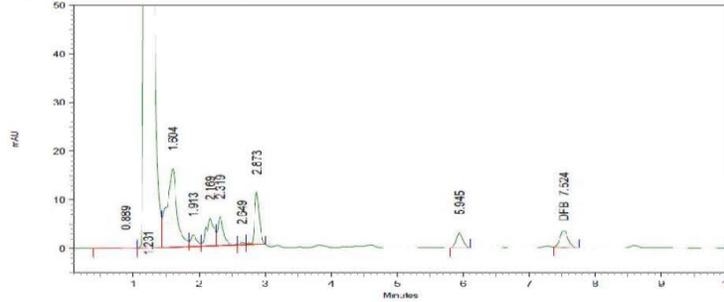
Tiempo 5 Diflubenzur3n Estanque 3 Pool 7



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.513	29704	16726.47



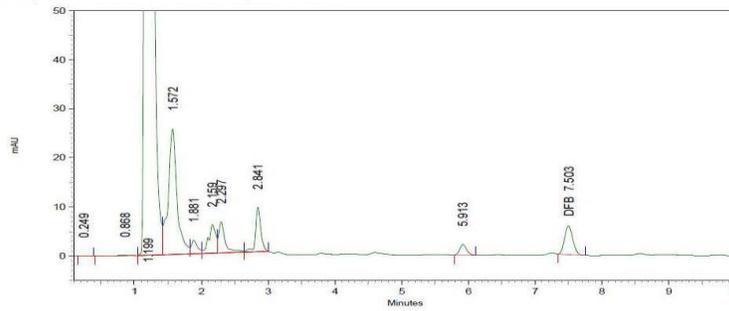
Tiempo 5 Diflubenzur3n Estanque 3 Pool 8



3: 258 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.524	28712	16715.77

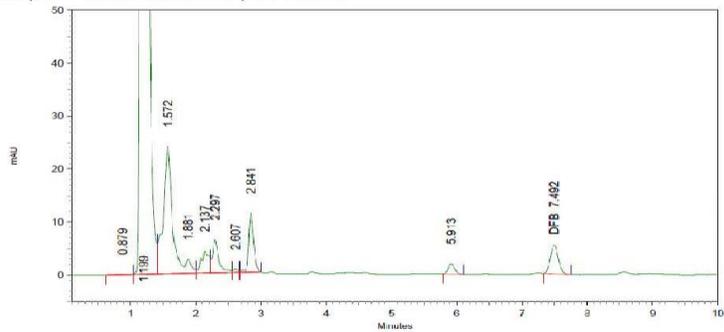
Tiempo 5 Diflubenzur3n Estanque 3 Pool 9



3: 258 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.503	49930	16035.98

Tiempo 5 Diflubenzur3n Estanque 3 Pool 10



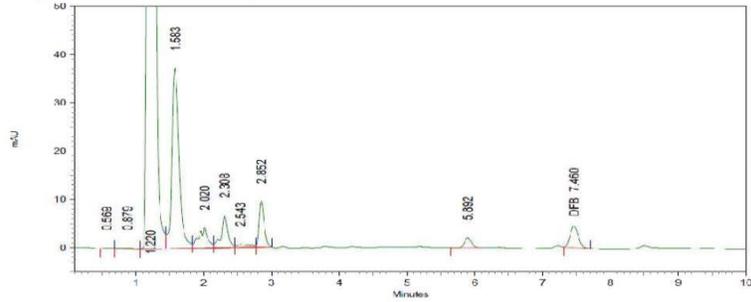
3: 258 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.492	46413	16288.63



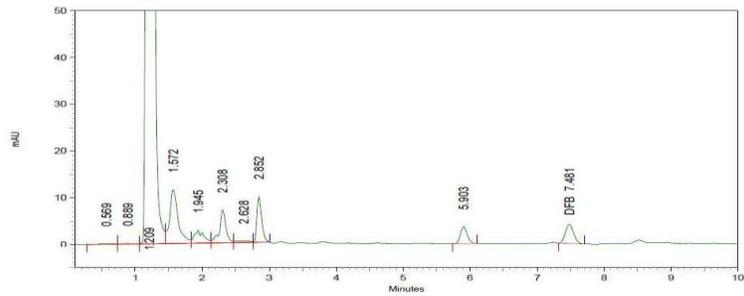
Cromatogramas de Tiempo 6 de estudio de bioacumulaci3n-depleci3n de Diflubenzur3n 2015.

Tiempo 6 Diflubenzur3n Estanque 1 Pool 1



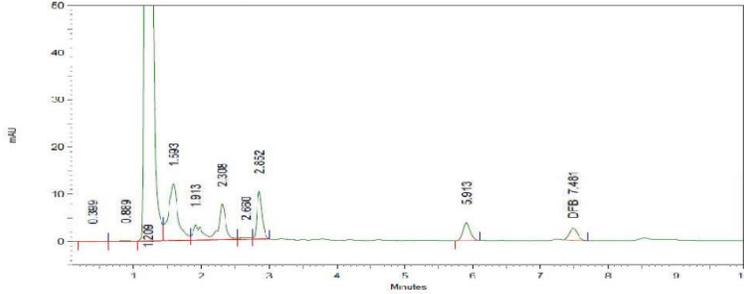
3: 258 nm, 8 mm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.460	37117	16972.65

Tiempo 6 Diflubenzur3n Estanque 1 Pool 2



3: 258 nm, 8 mm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.481	34920	16059.00

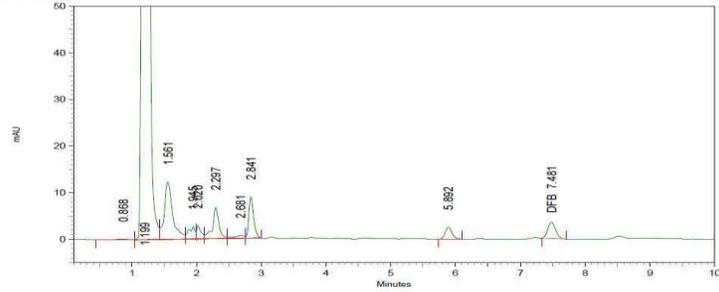
Tiempo 6 Diflubenzur3n Estanque 1 Pool 3



3: 258 nm, 8 mm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.481	21972	16802.19

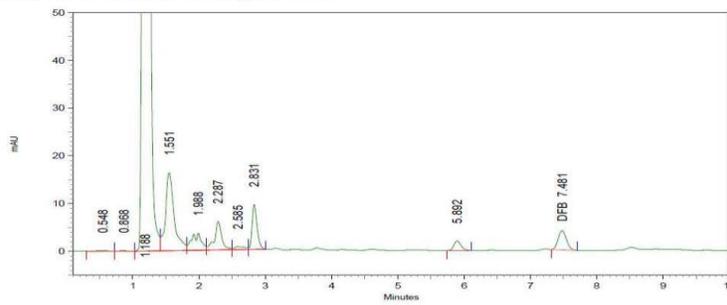


Tiempo 6 Diflubenzur3n Estanque 1 Pool 4



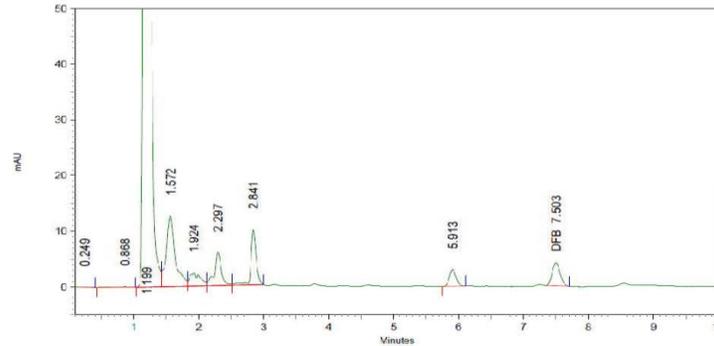
3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.481	30121	15923.93

Tiempo 6 Diflubenzur3n Estanque 1 Pool 5



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.481	34986	15679.64

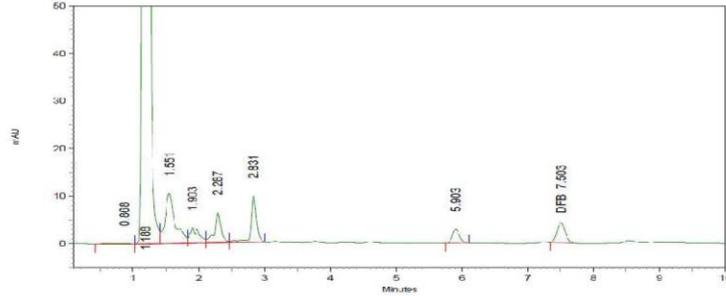
Tiempo 6 Diflubenzur3n Estanque 1 Pool 6



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.503	34771	16385.70

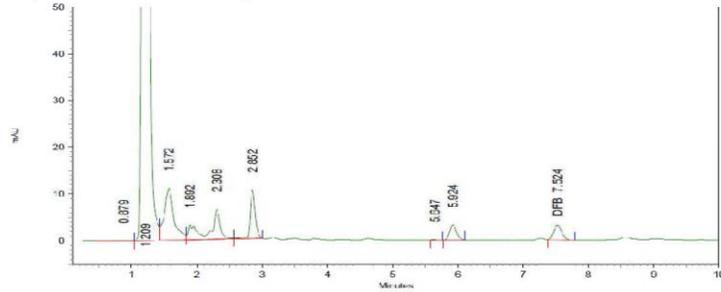


Tiempo 6 Diflubenzur3n Estanque 1 Pool 7



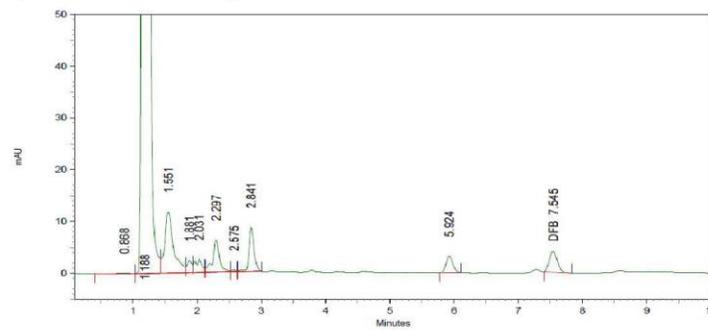
3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.503	36686	16141.12

Tiempo 6 Diflubenzur3n Estanque 1 Pool 8



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.524	26612	15631.55

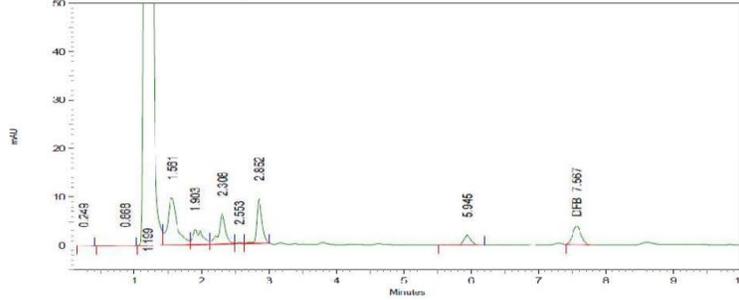
Tiempo 6 Diflubenzur3n Estanque 1 Pool 9



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.545	34383	16377.87

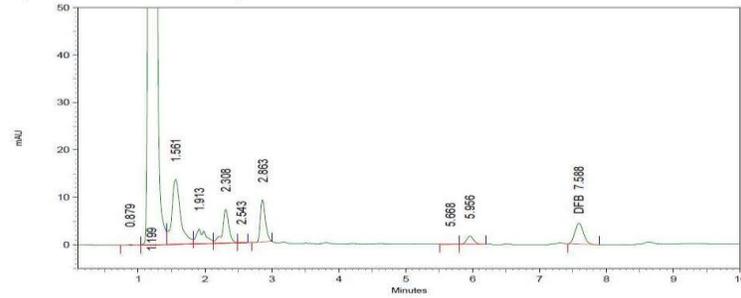


Tiempo 6 Diflubenzur3n Estanque 1 Pool 10



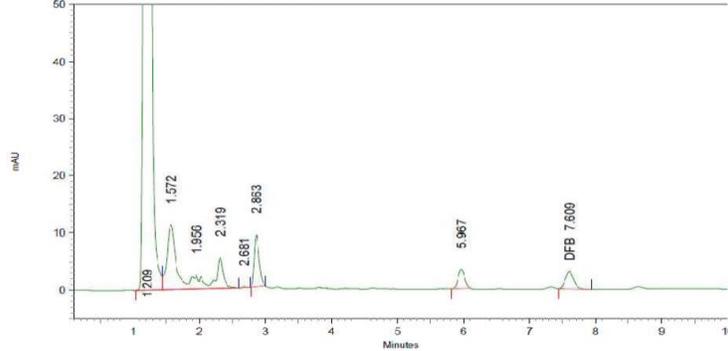
3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.567	33323	15756.75

Tiempo 6 Diflubenzur3n Estanque 2 Pool 1



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.588	39541	15579.26

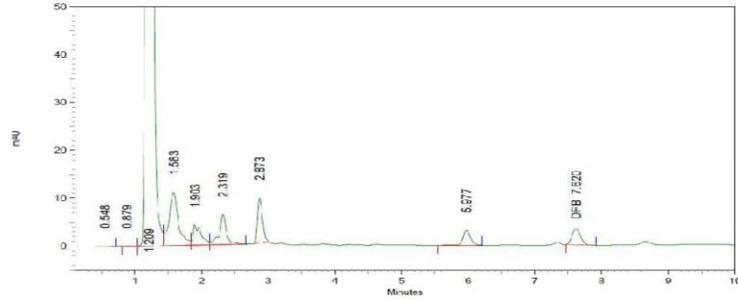
Tiempo 6 Diflubenzur3n Estanque 2 Pool 2



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.609	26841	15828.26

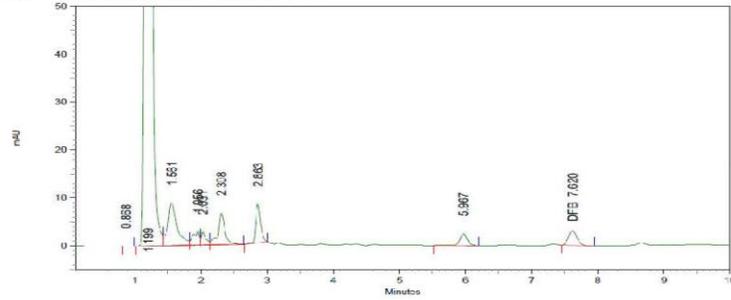


Tiempo 6 Diflubenzur3n Estanque 2 Pool 3



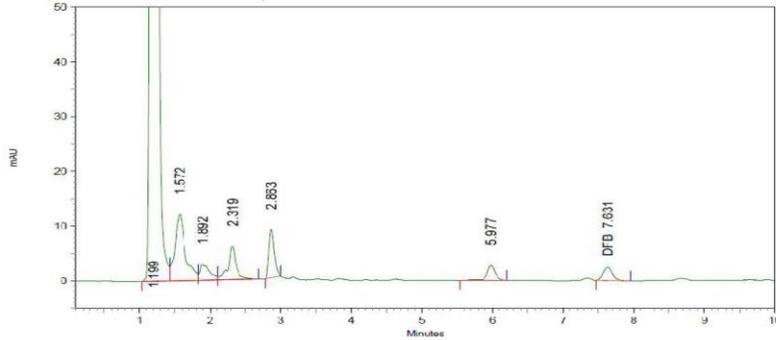
3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.620	29937	16207.92

Tiempo 6 Diflubenzur3n Estanque 2 Pool 4



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.620	27223	15743.32

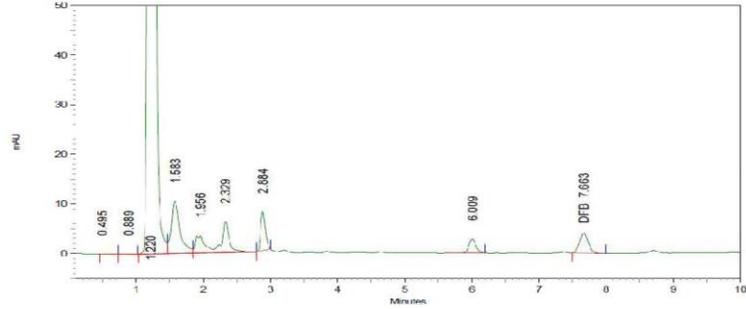
Tiempo 6 Diflubenzur3n Estanque 2 Pool 5



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plate
DFB	7.631	21487	15495.3
Totals			

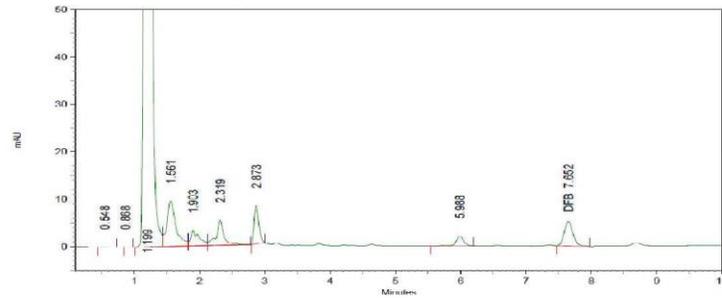


Tiempo 6 Diflubenzur3n Estanque 2 Pool 6



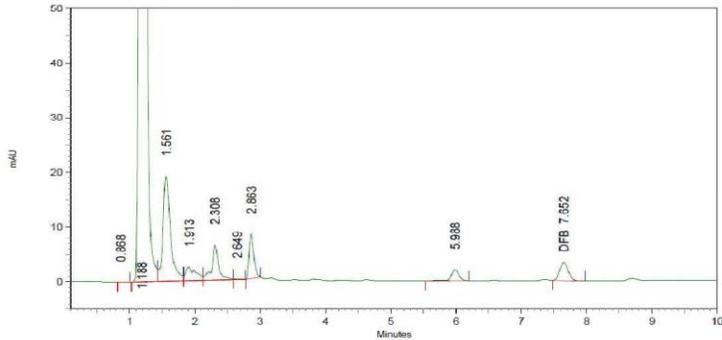
3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.663	36678	15252.35

Tiempo 6 Diflubenzur3n Estanque 2 Pool 7



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.652	47030	15405.93

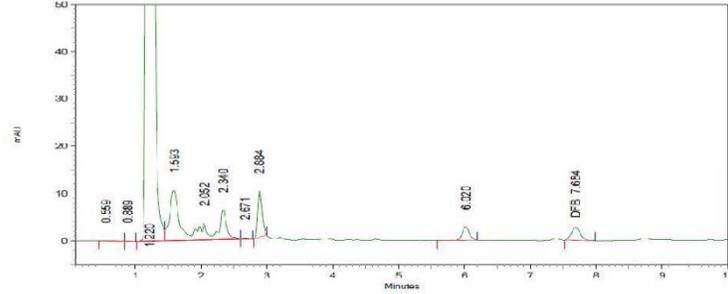
Tiempo 6 Diflubenzur3n Estanque 2 Pool 8



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.652	30132	15516.27

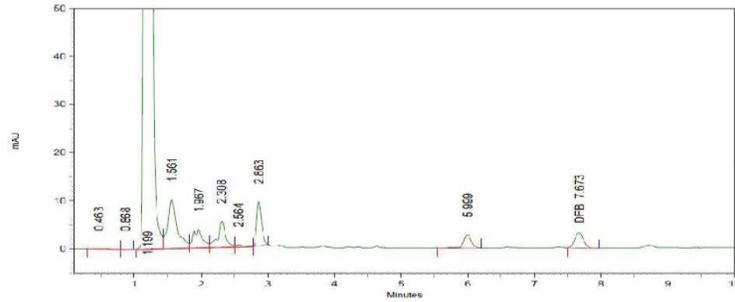


Tiempo 6 Diflubenzur3n Estanque 2 Pool 9



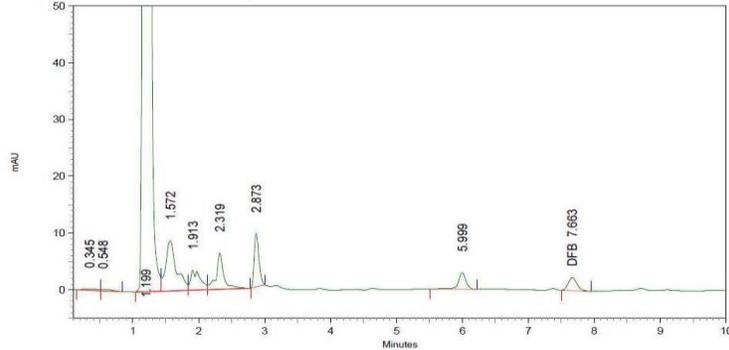
3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.684	24716	15196.74

Tiempo 6 Diflubenzur3n Estanque 2 Pool 10



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.673	28851	15351.17

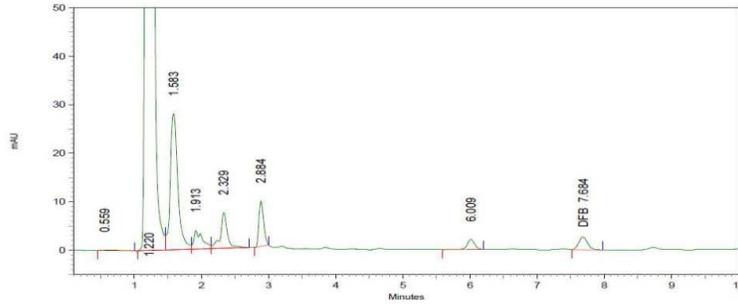
Tiempo 6 Diflubenzur3n Estanque 3 Pool 1



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.663	20922	15090.86

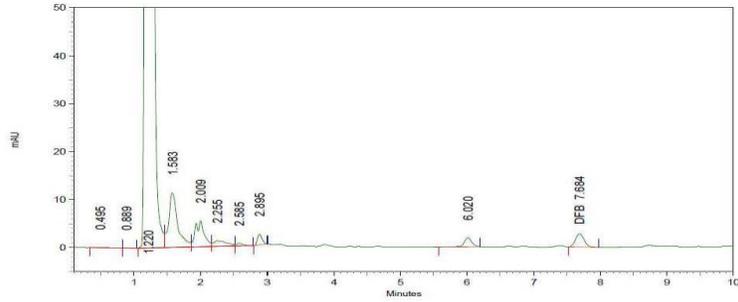


Tiempo 6 Diflubenzur3n Estanque 3 Pool 2



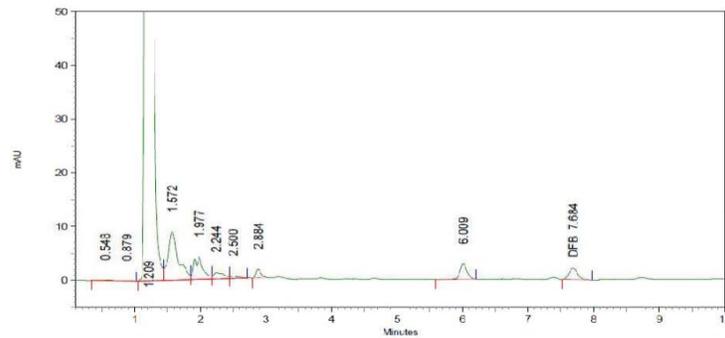
3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.684	24505	15267.04

Tiempo 6 Diflubenzur3n Estanque 3 Pool 3



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.684	24888	15342.55

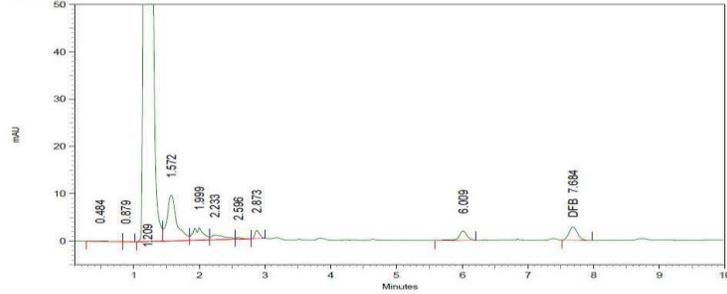
Tiempo 6 Diflubenzur3n Estanque 3 Pool 4



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.684	19213	15972.81

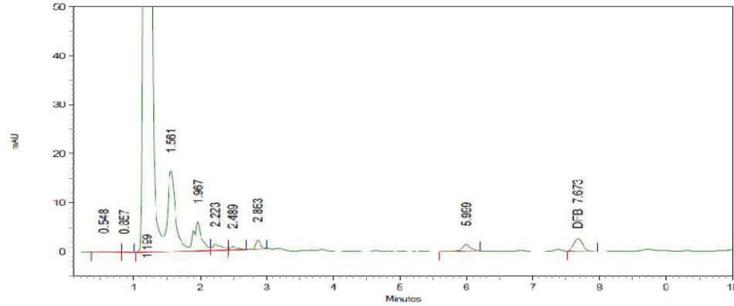


Tiempo 6 Diflubenzur3n Estanque 3 Pool 5



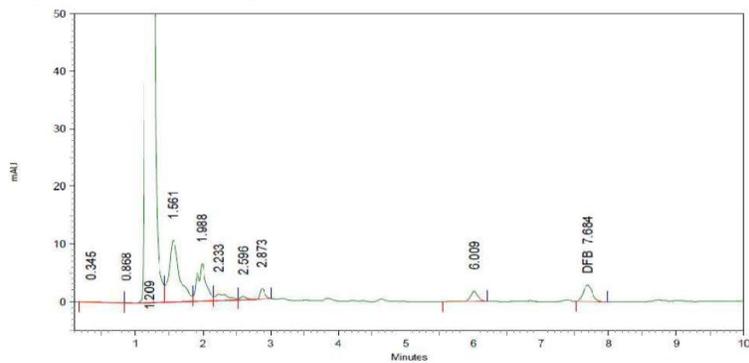
3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.684	25089	15896.26

Tiempo 6 Diflubenzur3n Estanque 3 Pool 6



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.673	23820	15061.83

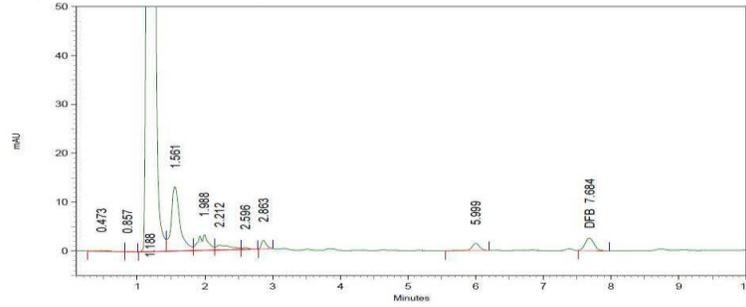
Tiempo 6 Diflubenzur3n Estanque 3 Pool 7



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.684	25528	15092.13

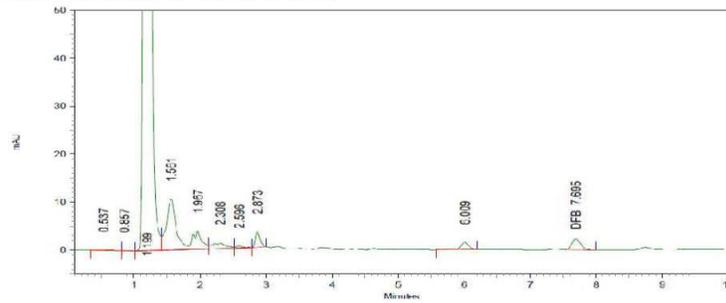


Tiempo 6 Diflubenzur3n Estanque 3 Pool 8



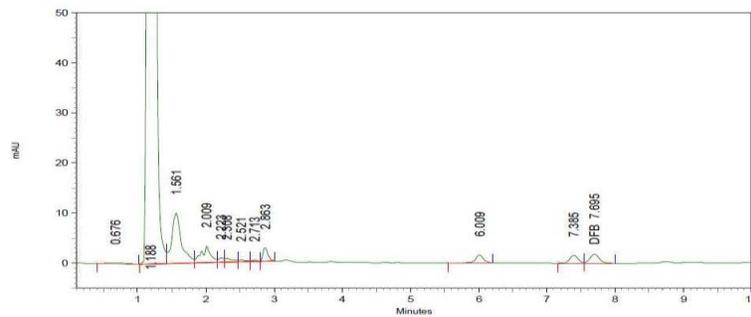
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.684	24008	15150.22

Tiempo 6 Diflubenzur3n Estanque 3 Pool 9



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.695	20855	15107.02

Tiempo 6 Diflubenzur3n Estanque 3 Pool 10

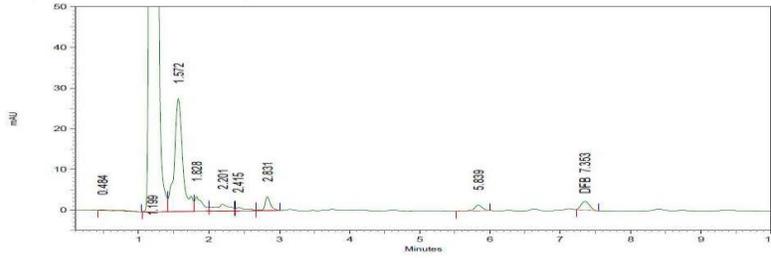


Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.695	17637	14569.54



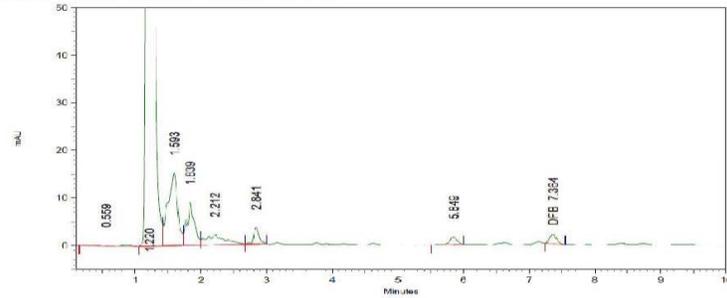
Cromatogramas de Tiempo 7 de estudio de bioacumulaci3n-depleci3n de Diflubenzur3n 2015.

Tiempo 7 Diflubenzur3n Estanque 1 Pool 1



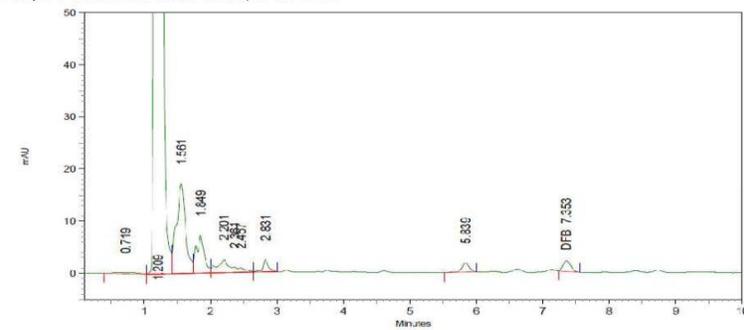
3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.353	16376	18440.79

Tiempo 7 Diflubenzur3n Estanque 1 Pool 2



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.361	14117	18379.18

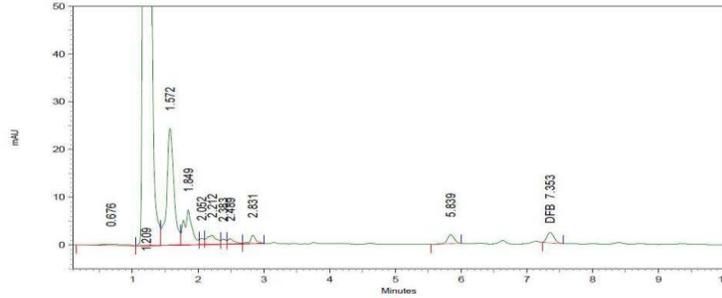
Tiempo 7 Diflubenzur3n Estanque 1 Pool 3



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.353	16478	18181.57



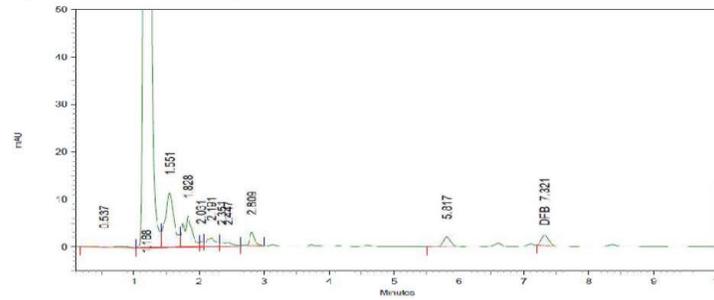
Tiempo 7 Diflubenzur3n Estanque 1 Pool 4



3: 258 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.353	16578	18832.77

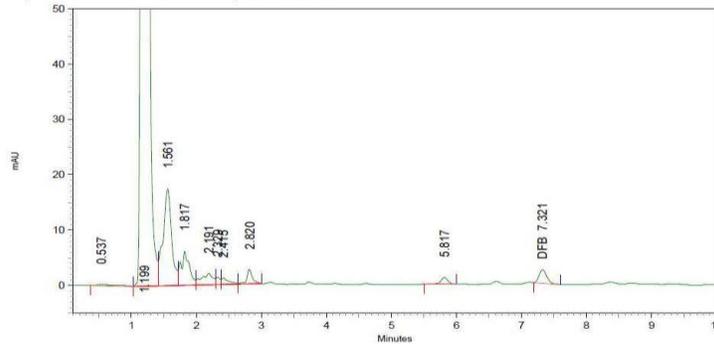
Tiempo 7 Diflubenzur3n Estanque 1 Pool 5



3: 258 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.321	17133	18358.76

Tiempo 7 Diflubenzur3n Estanque 1 Pool 6

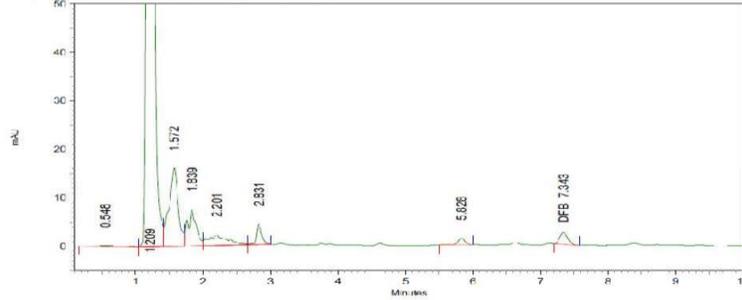


3: 258 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.321	20026	17168.61

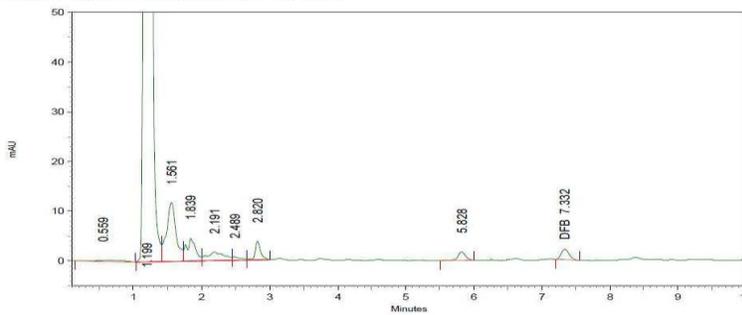


Tiempo 7 Diflubenzurón Estanque 1 Pool 7



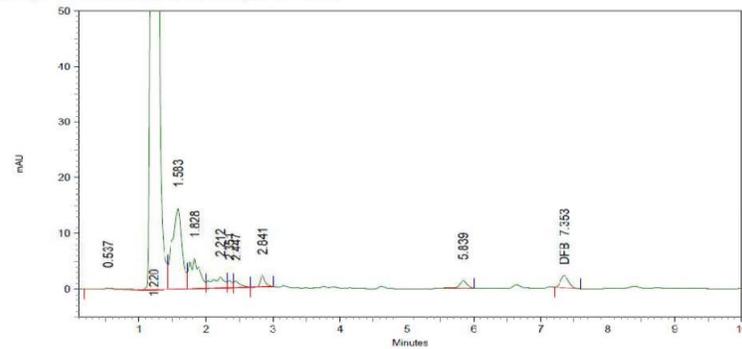
3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.343	20044	16825.57

Tiempo 7 Diflubenzurón Estanque 1 Pool 8



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.332	16890	17601.43

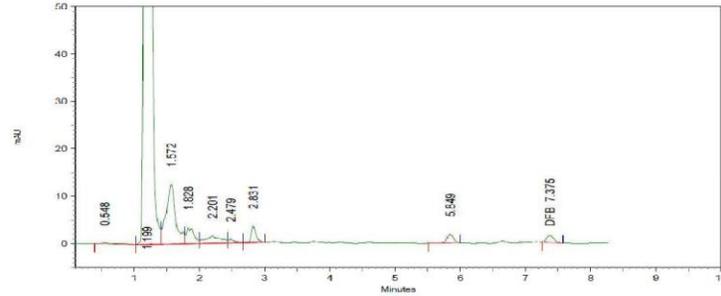
Tiempo 7 Diflubenzurón Estanque 1 Pool 9



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.353	17691	16905.49

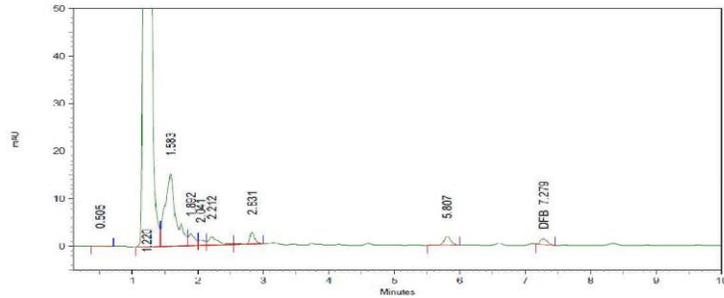


Tiempo 7 Diflubenzur3n Estanque 1 Pool 10



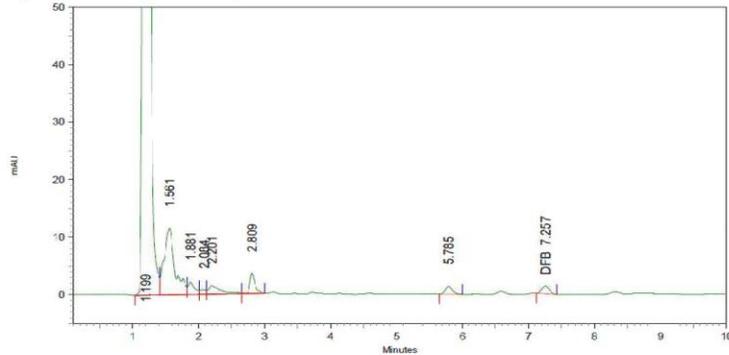
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.375	11504	17957.78

Tiempo 7 Diflubenzur3n Estanque 2 Pool 1



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.279	9247	19160.54

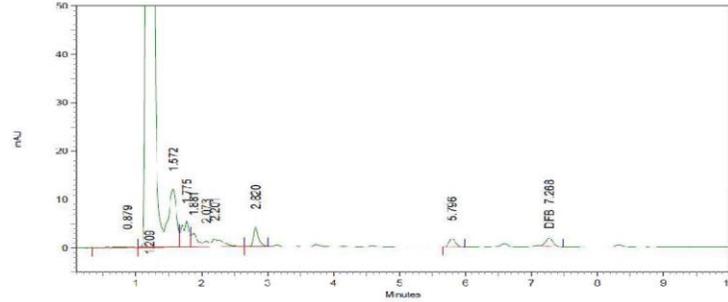
Tiempo 7 Diflubenzur3n Estanque 2 Pool 2



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.257	10597	17792.15

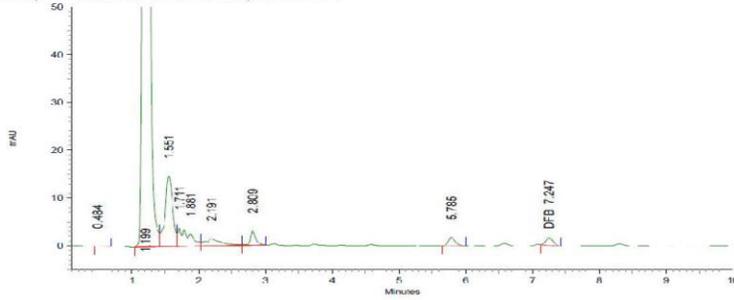


Tiempo 7 Diflubenzurón Estanque 2 Pool 3



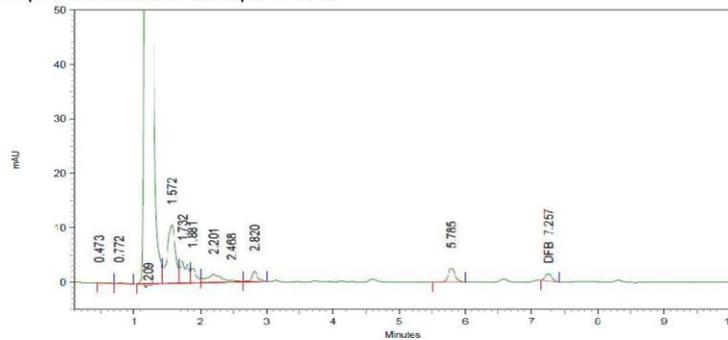
3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.268	12710	17691.59

Tiempo 7 Diflubenzurón Estanque 2 Pool 4



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.247	11501	18492.46

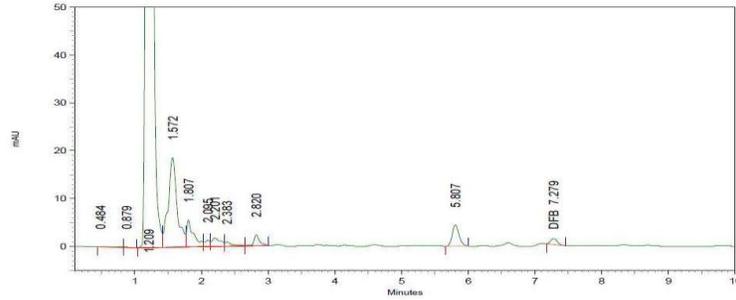
Tiempo 7 Diflubenzurón Estanque 2 Pool 5



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.257	9256	19171.70

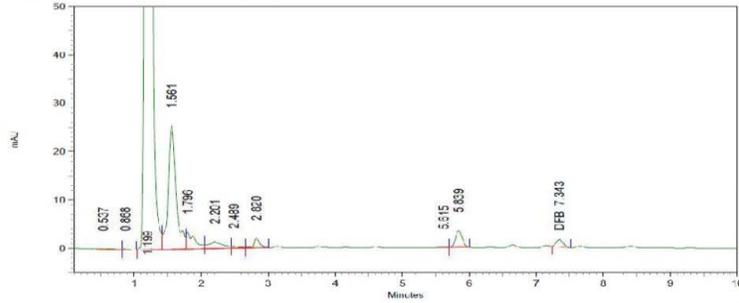


Tiempo 7 Diflubenzur3n Estanque 2 Pool 6



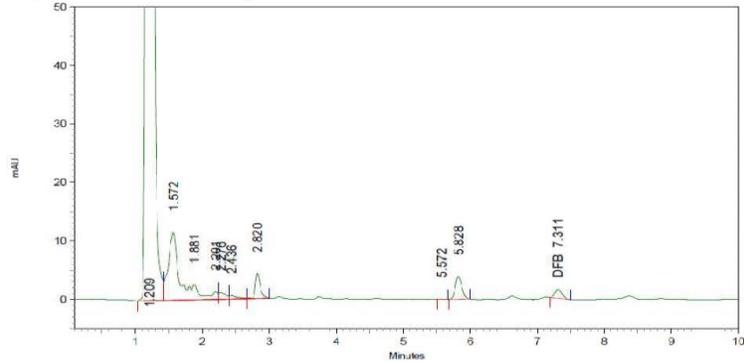
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.279	9046	20764.12

Tiempo 7 Diflubenzur3n Estanque 2 Pool 7



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.343	10739	18455.74

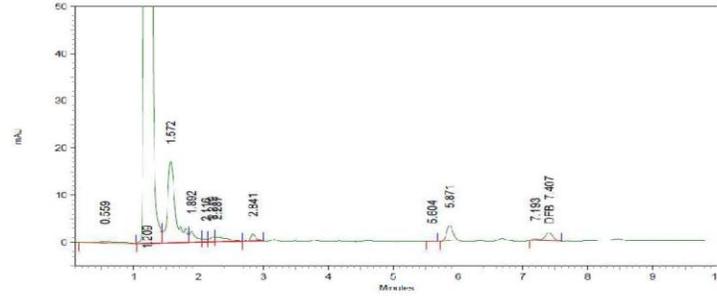
Tiempo 7 Diflubenzur3n Estanque 2 Pool 8



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.311	11961	19015.05

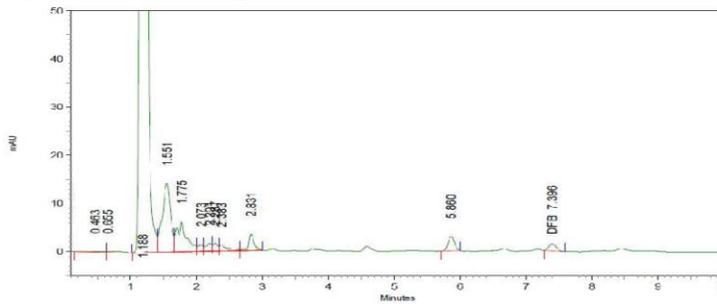


Tiempo 7 Diflubenzur3n Estanque 2 Pool 9



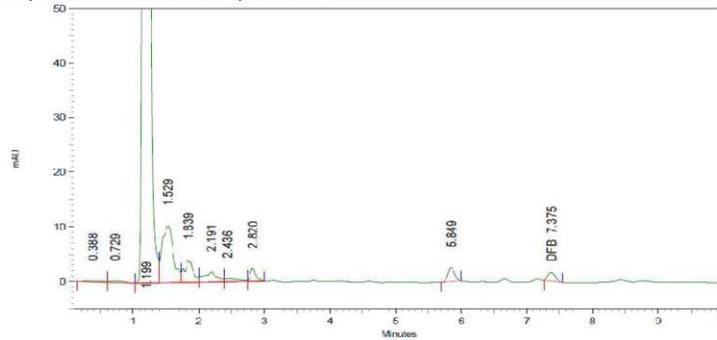
3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.407	13633	16156.03

Tiempo 7 Diflubenzur3n Estanque 2 Pool 10



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.396	11451	18543.59

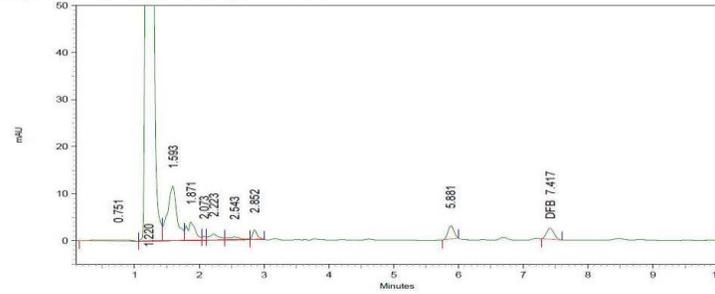
Tiempo 7 Diflubenzur3n Estanque 3 Pool 1



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.375	12348	18750.91

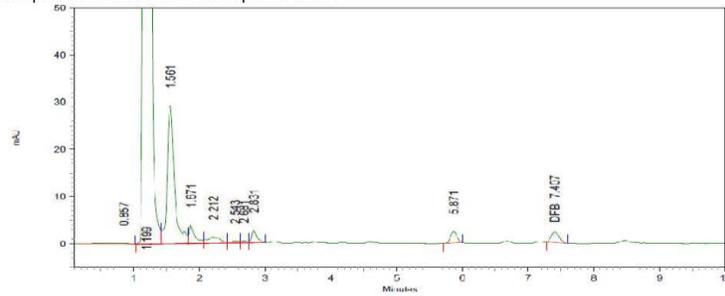


Tiempo 7 Diflubenzur3n Estanque 3 Pool 2



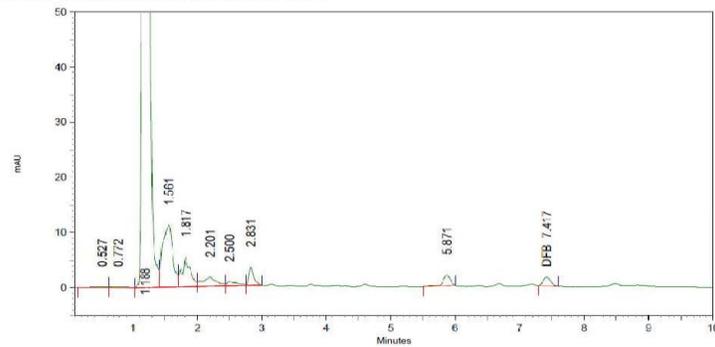
3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.417	18976	17410.70

Tiempo 7 Diflubenzur3n Estanque 3 Pool 3



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.407	18437	17323.26

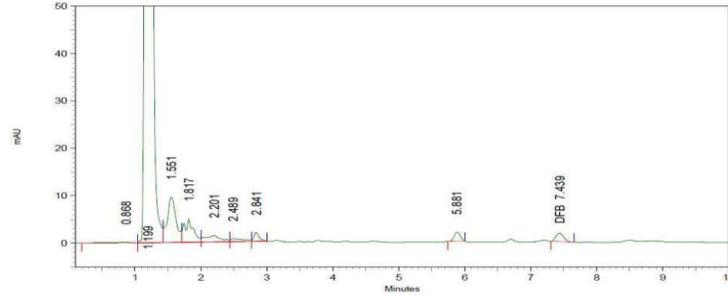
Tiempo 7 Diflubenzur3n Estanque 3 Pool 4



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.417	12237	18286.23

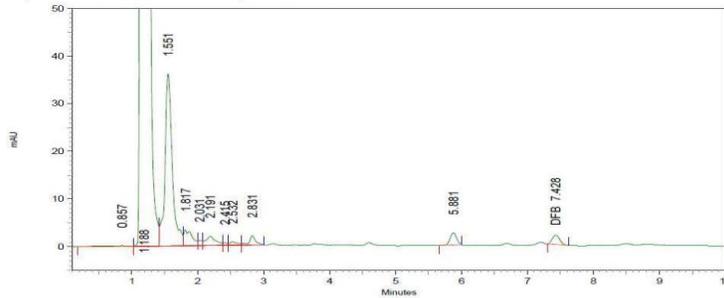


Tiempo 7 Diflubenzur3n Estanque 3 Pool 5



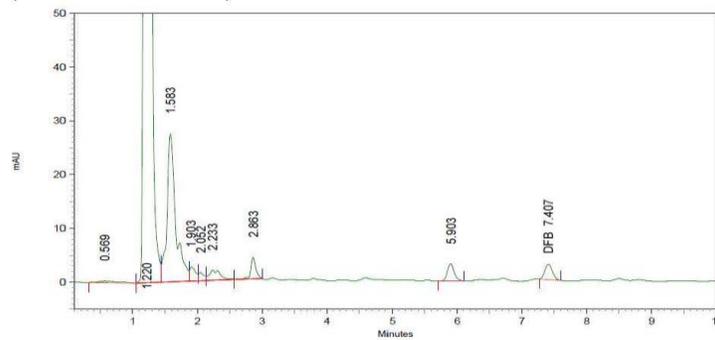
3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.439	14442	17205.38

Tiempo 7 Diflubenzur3n Estanque 3 Pool 6



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.428	15558	18389.98

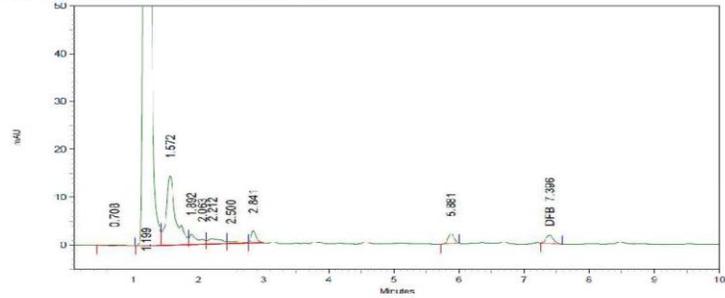
Tiempo 7 Diflubenzur3n Estanque 3 Pool 7



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.407	23240	17464.80

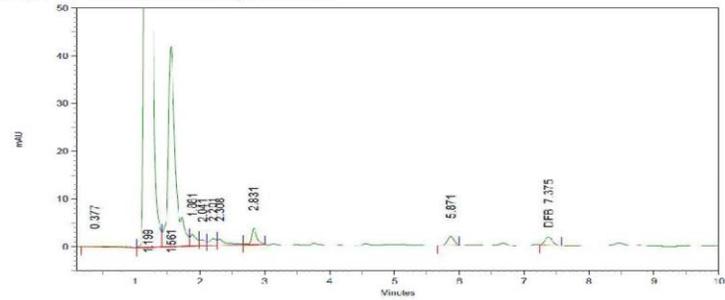


Tiempo 7 Diflubenzur3n Estanque 3 Pool 8



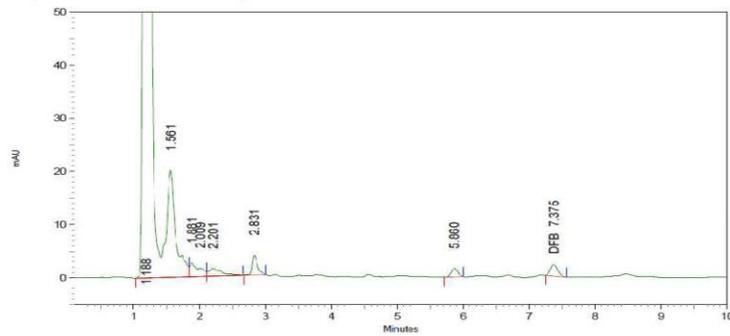
Name	Retention time	Area	Theoretical plates
DFB	7.396	13648	17584.15

Tiempo 7 Diflubenzur3n Estanque 3 Pool 9



Name	Retention time	Area	Theoretical plates
DFB	7.375	15114	18042.98

Tiempo 7 Diflubenzur3n Estanque 3 Pool 10

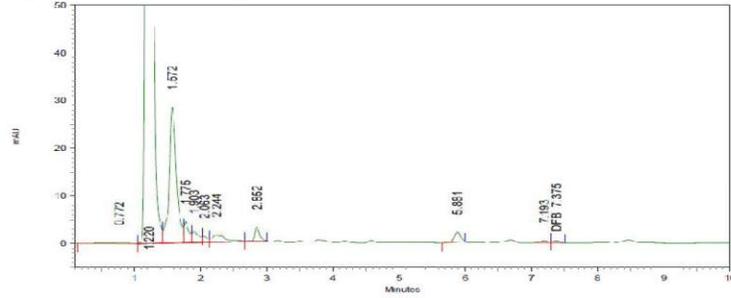


Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.375	17227	17989.11



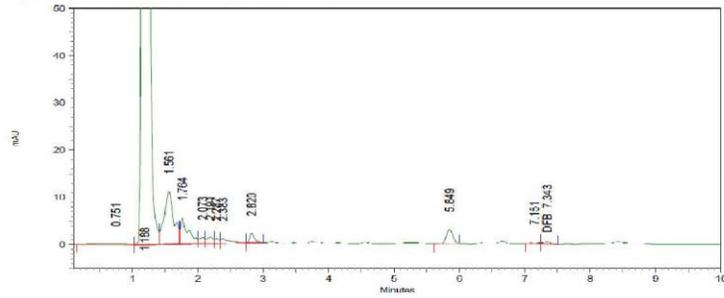
Cromatogramas de Tiempo 8 de estudio de bioacumulaci3n-depleci3n de Diflubenzur3n 2015.

Tiempo 8 Diflubenzur3n Estanque 1 Pool 1



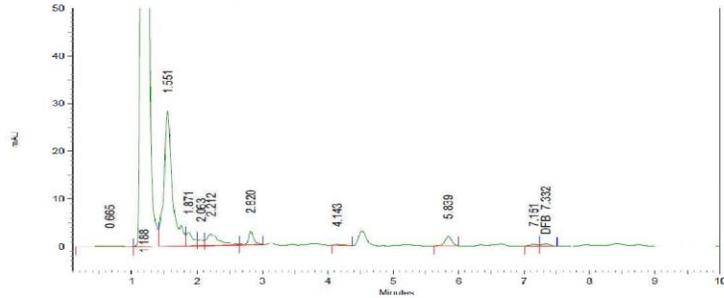
3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.375	2951	15952.40

Tiempo 8 Diflubenzur3n Estanque 1 Pool 2



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.343	3976	13789.66

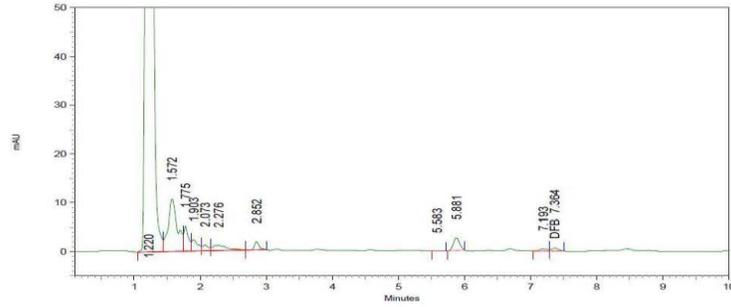
Tiempo 8 Diflubenzur3n Estanque 1 Pool 3



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.332	3685	14690.52

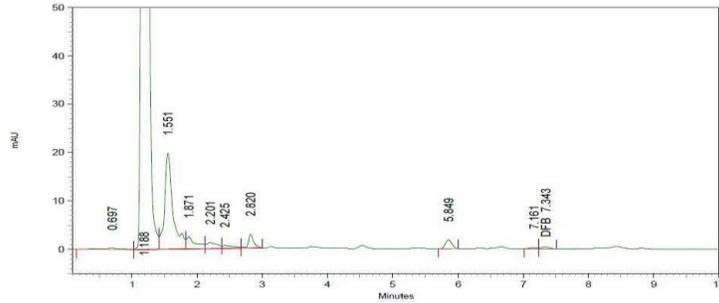


Tiempo 8 Diflubenzur3n Estanque 1 Pool 4



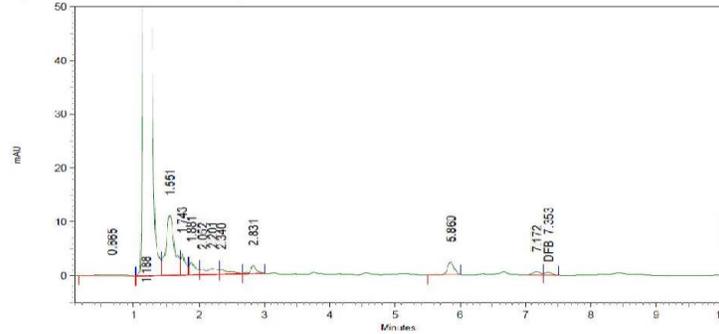
3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.364	4615	12682.69

Tiempo 8 Diflubenzur3n Estanque 1 Pool 5



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.343	3468	12725.80

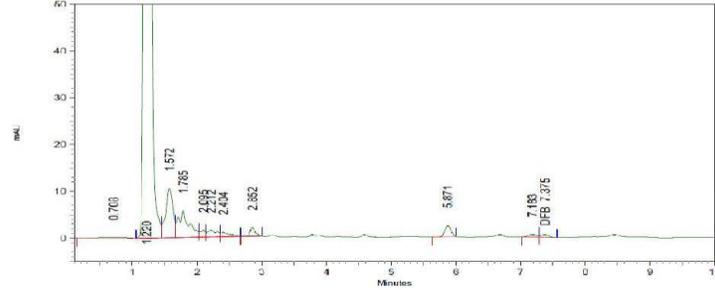
Tiempo 8 Diflubenzur3n Estanque 1 Pool 6



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.353	3889	10949.84

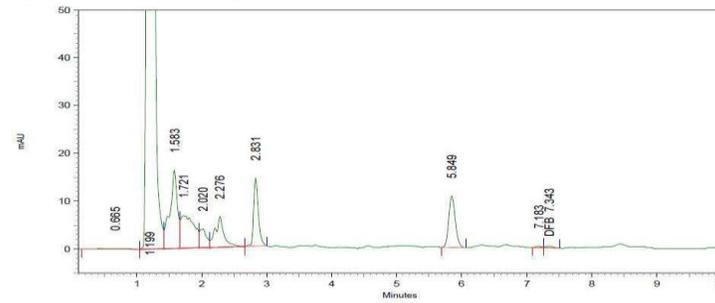


Tiempo 8 Diflubenzur3n Estanque 1 Pool 7



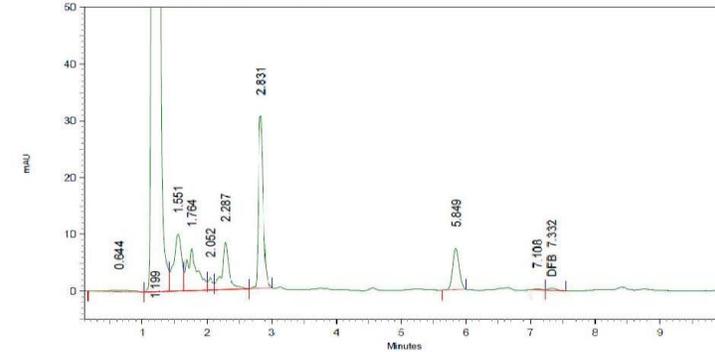
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.375	4778	12765.24

Tiempo 8 Diflubenzur3n Estanque 1 Pool 8



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.343	2959	12965.61

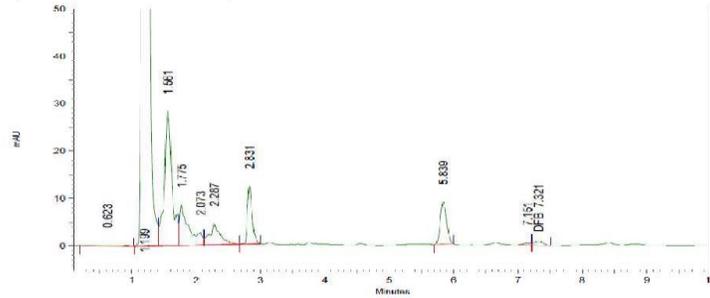
Tiempo 8 Diflubenzur3n Estanque 1 Pool 9



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.332	3444	12989.22



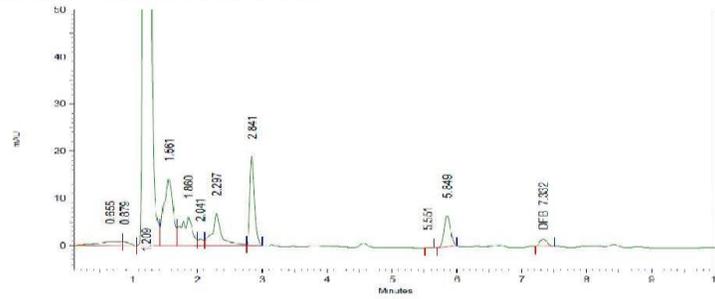
Tiempo 8 Diflubenzur3n Estanque 1 Pool 10



3: 258 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.321	7996	9940.21

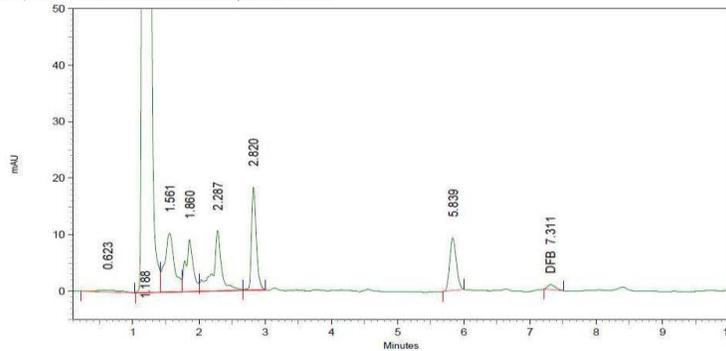
Tiempo 8 Diflubenzur3n Estanque 2 Pool 1



3: 258 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.332	11564	18433.80

Tiempo 8 Diflubenzur3n Estanque 2 Pool 2

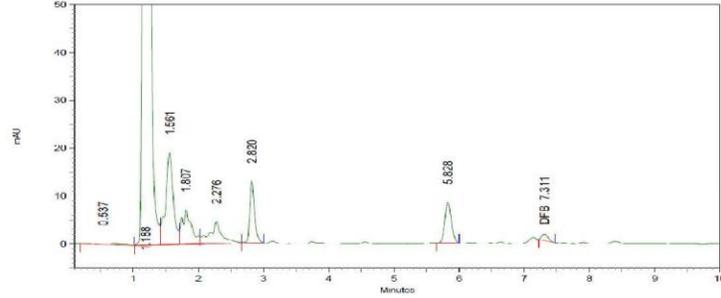


3: 258 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.311	7192	17319.20

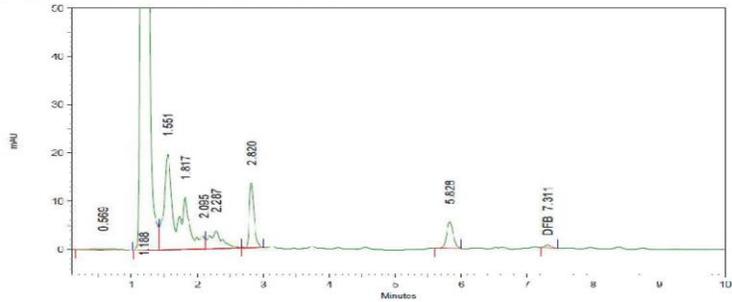


Tiempo 8 Diflubenzur3n Estanque 2 Pool 3



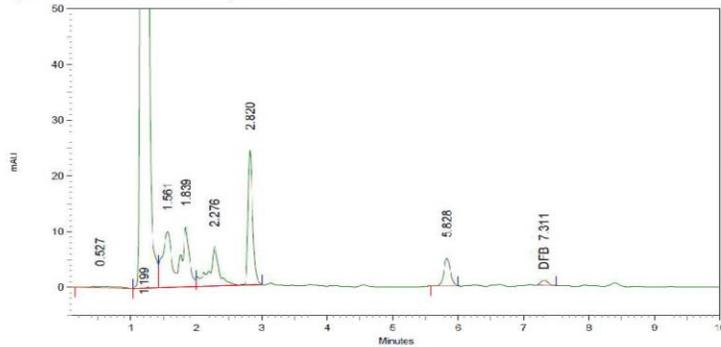
3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.311	8972	23554.07

Tiempo 8 Diflubenzur3n Estanque 2 Pool 4



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.311	4438	23948.92

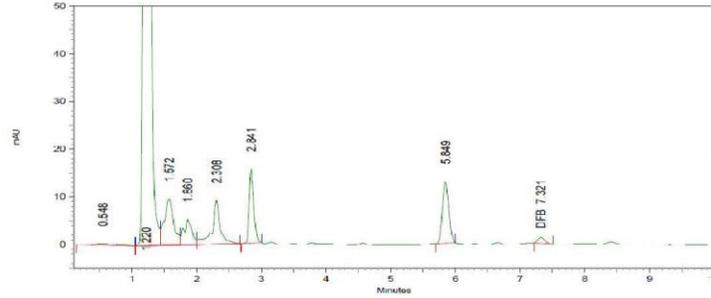
Tiempo 8 Diflubenzur3n Estanque 2 Pool 5



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.311	6655	20456.32

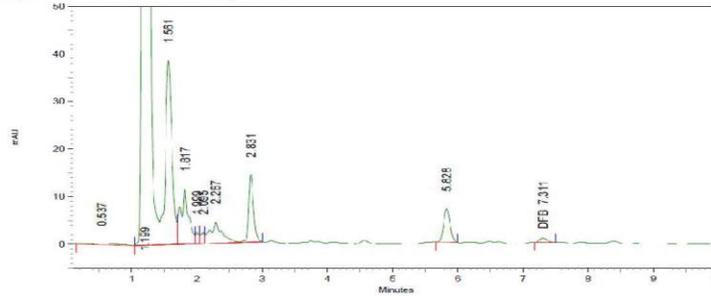


Tiempo 8 Diflubenzur3n Estanque 2 Pool 6



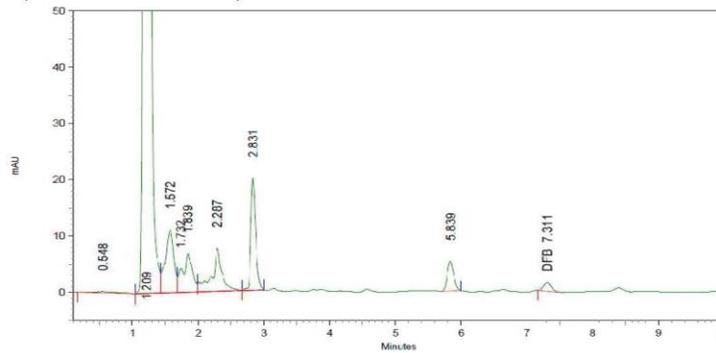
3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.321	9197	18754.30

Tiempo 8 Diflubenzur3n Estanque 2 Pool 7



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.311	7358	16523.08

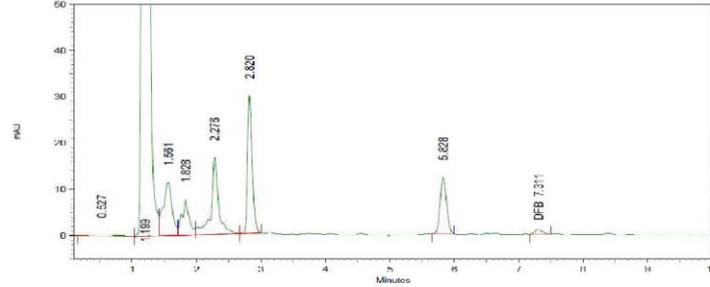
Tiempo 8 Diflubenzur3n Estanque 2 Pool 8



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.311	15091	16359.44

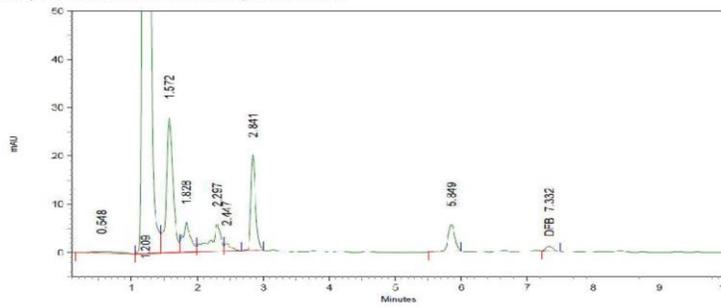


Tiempo 8 Diflubenzur3n Estanque 2 Pool 9



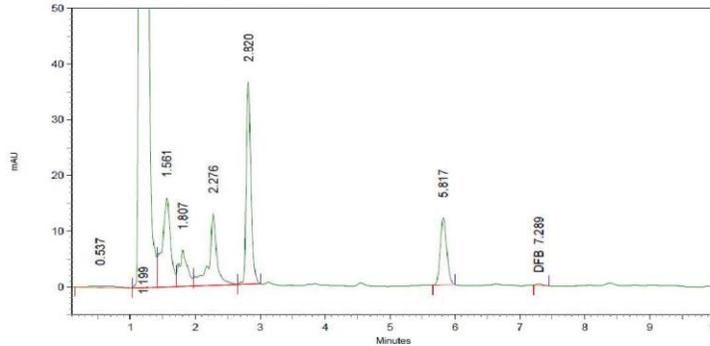
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.311	8125	16954.09

Tiempo 8 Diflubenzur3n Estanque 2 Pool 10



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.332	7254	19976.40

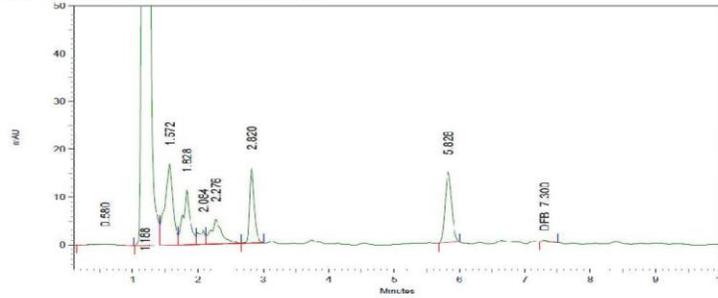
Tiempo 8 Diflubenzur3n Estanque 3 Pool 1



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.289	1765	22869.87

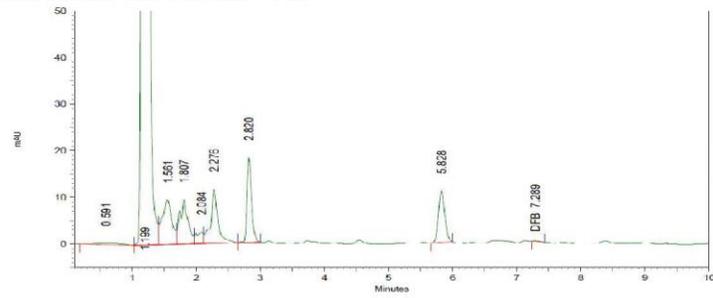


Tiempo 8 Diflubenzur3n Estanque 3 Pool 2



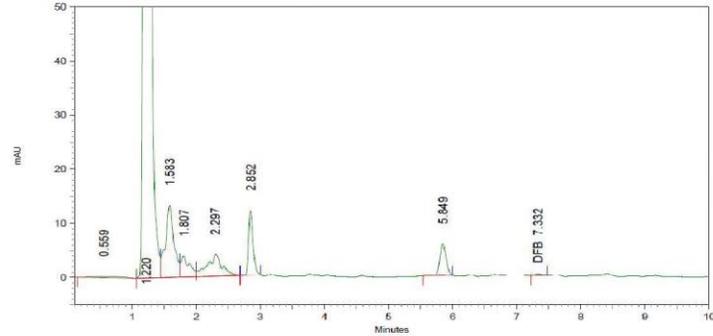
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.300	1792	22210.21

Tiempo 8 Diflubenzur3n Estanque 3 Pool 3



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.289	904	0.00

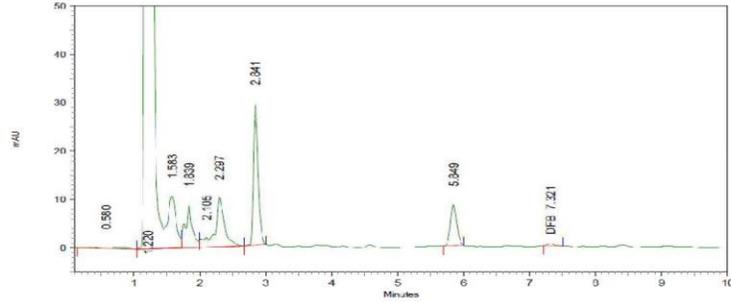
Tiempo 8 Diflubenzur3n Estanque 3 Pool 4



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.332	2350	20585.40

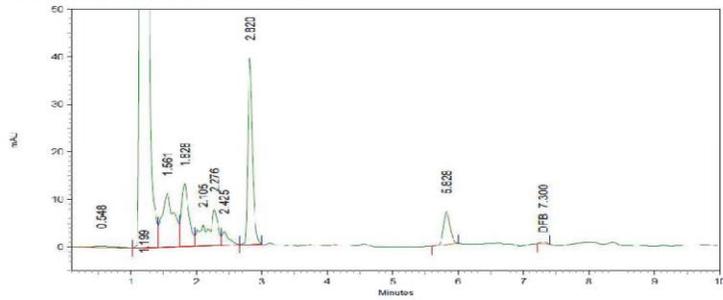


Tiempo 8 Diflubenzur3n Estanque 3 Pool 5



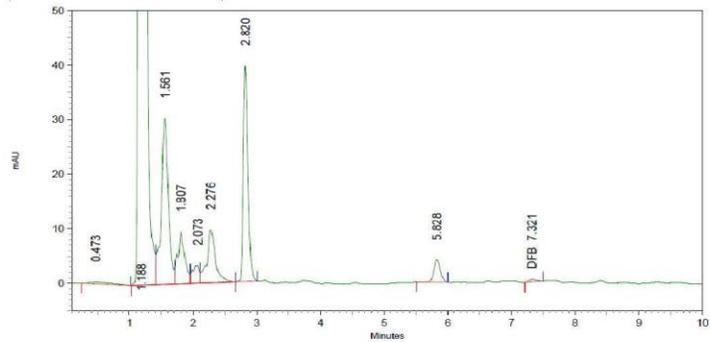
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.321	3021	20552.95

Tiempo 8 Diflubenzur3n Estanque 3 Pool 6



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.300	2358	0.00

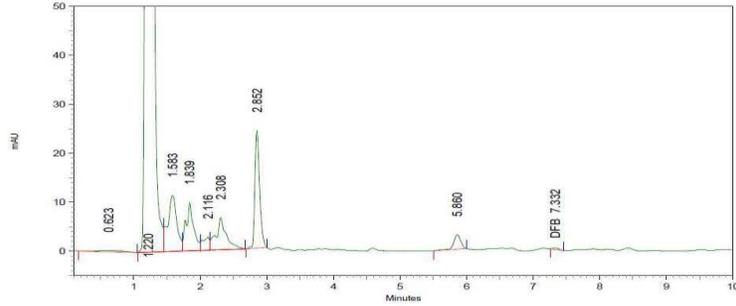
Tiempo 8 Diflubenzur3n Estanque 3 Pool 7



Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.321	3237	18144.55

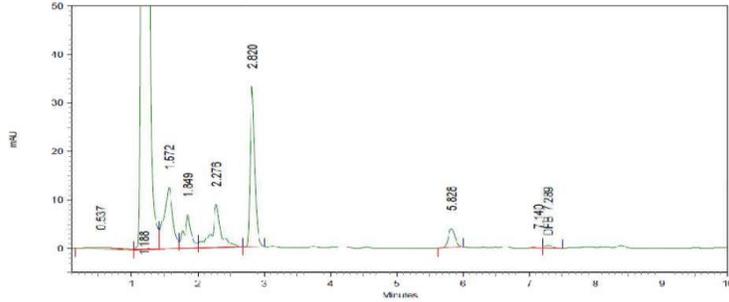


Tiempo 8 Diflubenzur3n Estanque 3 Pool 8



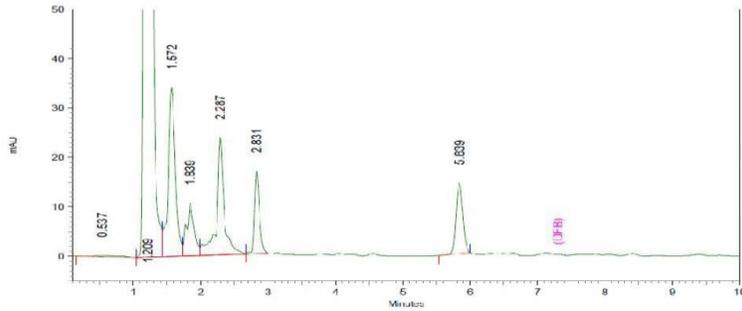
3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.332	1946	27427.87

Tiempo 8 Diflubenzur3n Estanque 3 Pool 9



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.289	4827	11181.97

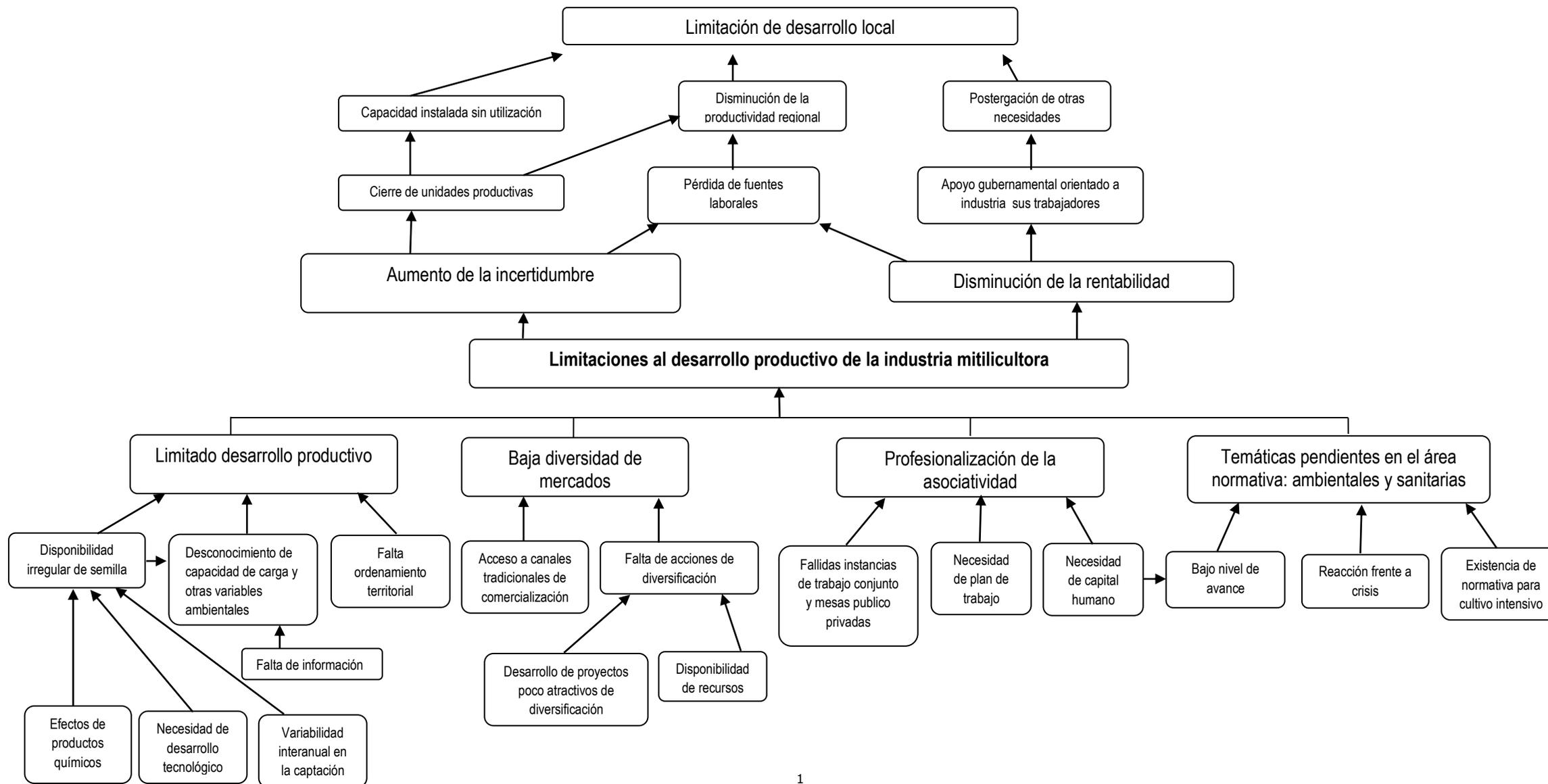
Tiempo 8 Diflubenzur3n Estanque 3 Pool 10



3: 258 nm, 8 nm			
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
DFB	7.332	1946	27427.87

A N E X O 10

Árbol de problemas de la evaluación económica de la actividad miticultora.





INSTITUTO DE FOMENTO PESQUERO / DIVISI3N INVESTIGACI3N EN ACUICULTURA

A N E X O 11

Memoria de cálculo de la evaluación económica de la actividad miticultora.



Parámetros de entrada

Crecimiento 2013	61.413
Tasa de crecimiento (%)	6,00%
Precio promedio (US\$/t)	2358
Costo producción (US\$/t)	2200
Dólar (\$/US\$)	507,04
Tasa social	6%

Distribución de parámetros

Distribución	parametro 1	parametro 2	parametro 3
Triangular	-18%	6%	44%
Normal	2276	257,1	
Triangular	1900	2200	2300
Normal	507,04	35,5	

Flujo de caja

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Producción (t)	65.098	69.004	73.144	77.532	82.184	87.115	92.342	97.883	103.756	109.981
Ingresos MM\$	77.831	82.501	87.451	92.698	98.260	104.155	110.404	117.029	124.050	131.493
Costos MM\$	72.616	76.973	81.591	86.486	91.676	97.176	103.007	109.187	115.738	122.683
Flujo	5.215	5.528	5.860	6.211	6.584	6.979	7.398	7.842	8.312	8.811

Parámetros de salida

VAN MM\$	\$49.201,00
VAN MMUS\$	97,03



INSTITUTO DE FOMENTO PESQUERO / DIVISIÓN INVESTIGACIÓN EN ACUICULTURA

A N E X O 12

Borrador de trabajo científico.



Evaluación de la capacidad de mitílicos de bioacumular productos químicos y farmacéuticos de uso en la acuicultura

Autores: Luis Norambuena Subiabre¹; Sergio Contreras Lynch¹

¹ Instituto de Fomento Pesquero, División de Investigación en Acuicultura, Departamento de Salud Hidrobiológica, Balmaceda 252, Puerto Montt, Chile

Resumen

Se desarrollaron y validaron las metodologías para la extracción y detección de los antiparasitarios Cipermetrina, Deltametrina, Diflubenzurón y Azametifós en partes blandas de la especie de mejillón *M. chilensis*. El límite de detección (LD) fue de 21,3 ng/g para Cipermetrina, 20 ng/g para Deltametrina, 50 ng/g para Azametifós y de 480 ng/g para Diflubenzurón. El límite de cuantificación (LC) fue de 73,4 ng/g para Cipermetrina, 60 ng/g para Deltametrina, 100 ng/g para Azametifós y 480 ng/g para Diflubenzurón. El coeficiente de variación de la repetibilidad y precisión intermedia fue menor al 11,2% en todos los casos estudiados. La curva de calibración fue lineal entre 52 y 520 ng/ml (Cipermetrina), entre 30 y 300 ng/ml (Deltametrina), entre 20 y 400 ng/ml (Azametifós) y entre 192 y 3840 ng/ml (Diflubenzurón). La recuperación de los analitos Diflubenzurón y azametifós fue sobre el 80%. La recuperación de Cipermetrina y Deltametrina fue 56,3% y 45,1%, respectivamente, que pese a ser baja se logra un LD aceptable y con repetibilidad y precisión intermedia muy buena. Con las condiciones experimentales utilizadas, no se pudo demostrar bioacumulación de Cipermetrina, Deltametrina y Azametifós en las partes blandas de mejillones. Se demuestra bioacumulación de Diflubenzurón en partes blandas de *M. chilensis*. Se confecciona una curva de depleción de Diflubenzurón en mejillones, su $T_{1/2}$ es de 3,4 días.

1. Introducción

La producción de mejillones (choritos) representa el segundo sector productivo de importancia dentro de la acuicultura en Chile (Sernapesca, 2013). Según datos recopilados del Anuario Estadístico de Pesca Años 2002 a 2012 del Sernapesca, la producción de mejillones se produce casi exclusivamente en la Región de Los Lagos, donde comparte zonas geográficas y cuerpos de agua similares con la industria salmonicultura.

En el proceso productivo de especies salmónidas, una de sus principales amenazas es la presencia del parásito *Caligus rogercresseyi* (Bravo et al, 2008, 2010, 2012, 2013, 2014a, 2014b; Arriagada et al, 2014). Para el control del Cálígus, se ha utilizado principalmente el tratamiento farmacológico, encontrándose en la actualidad, cinco antiparasitarios disponibles para ser utilizados contra éste: Cipermetrina, Deltametrina, Azametifós, Benzoato de Emamectina y Diflubenzurón (SAG, 2014). Los tres primeros compuestos son productos administrados por baño, mientras que los dos últimos son administrados por vía oral. De los antiparasitarios orales, el que más se ha utilizado en los últimos años es Diflubenzurón. Cipermetrina y Deltametrina son insecticidas piretroides sintéticos, que se utilizan para el control de ectoparásitos en salmones (EMEA, 2001, 2003). Diflubenzurón es un compuesto derivado de la acil urea, que actúa interfiriendo con la síntesis de la quitina (EMEA, 1999B). Azametifós, recientemente aprobado en el año 2013, es un insecticida organofosforado que actúa inhibiendo la actividad de la colinesterasa (EMEA, 1999A).

En Chile, como a nivel mundial, existe escaso conocimiento respecto de la capacidad de mitílicos de bioacumular Cipermetrina, Deltametrina, Diflubenzurón y Azametifós, mediante el proceso biológico de filtración, y a las dosis utilizadas como terapias en la salmonicultura. Asimismo, se desconoce si mediante el proceso de bioacumulación es posible encontrar residuos de productos químicos y farmacéuticos en los ejemplares de mitílicos que pudieran afectar su inocuidad como alimento.

El propósito de este estudio fue implementar y validar una metodología para la detección de Cipermetrina (Cyp), Deltametrina (Delta), Diflubenzurón (DFB) y Azametifós (AZA) en las partes blandas de mejillones, para posteriormente estudiar la posible bioacumulación de los antiparasitarios en los mitílicos.



2. Material y Método

2.1. Reactivos

El Metanol y Acetonitrilo (grado HPLC) fue obtenido de Merck. Agua de alta pureza fue preparada utilizando el sistema de purificación Easypure II (Barnstead). Diflubenzurón 80% (Calishot) y Deltametrina 1% fueron obtenidos de FAV Veterinary, Cipermetrina 5% (Betamax) fue obtenida de Novartis. Azametifos 50% fue obtenido de Bayer S.A. El estándar certificado de Diflubenzurón utilizado fue PestanalFluka, los estándares certificados de Azametifós, Cipermetrina y Deltametrina fueron obtenidos de Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Alemania).

2.2 Procedimiento de Extracción

2.2.1 Cipermetrina y Deltametrina

Se realizó el mismo proceso de extracción para ambos analitos. Se pesaron mejillones previamente homogeneizados en tubos cónicos de 50 ml, se agregó acetonitrilo, Sulfato de Magnesio ($MgSO_4$) y Cloruro de sodio (NaCl), se agitó vigorosamente en vórtex. Luego se centrifugó y se transfirió una alícuota del sobrenadante a un tubo cónico de 15 ml y se diluyó con agua. La muestra se limpió utilizando extracción en fase sólida con columnas HLB., eluyendo finalmente la muestra con 1 ml de agua/metanol (10/90). El eluido se diluyó con agua, se filtra sobre viales de HPLC de 1,8 ml utilizando filtros de jeringa de PVDF de 0,22 μm de poro y 3 mm de diámetro.

2.2.2 Azametifos y Diflubenzuron

Se realizó el mismo proceso de extracción para ambos analitos. Se pesaron mejillones previamente homogeneizados en tubos cónicos de 50 ml, se agregó acetonitrilo, Sulfato de Magnesio ($MgSO_4$) y Cloruro de sodio (NaCl), se agitó vigorosamente en vórtex. Luego se centrifugó y se transfirió una alícuota del sobrenadante a un tubo cónico de 15 ml con $MgSO_4$, amina primaria secundaria (PSA) y C-18, se agitó vigorosamente en vórtex. Finalmente se centrifugó y se toman dos alícuotas de 1 ml, para diflubenzurón se diluyó con agua (50/50, v/v), para azametifós se diluyó con agua (25/75, v/v), se filtra sobre viales de HPLC de 1,8 ml utilizando filtros de jeringa de PVDF de 0,22 μm de poro y 3 mm de diámetro.

2.3 Análisis HPLC

La columna analítica utilizada fue de centro sólido Accucore C-18 150 x 4.6 mm, 5 μm . La fase móvil fue agua, metanol, acetonitrilo en diferentes proporciones, con o sin gradiente. La detección fue llevada a cabo con un detector de arreglo de diodos (Cipermetrina, Deltametrina y Diflubenzuron), utilizando una longitud de onda de monitoreo de 210 nm (Cipermetrina-Deltametrina) y 258 nm (Diflubenzuron). La detección de Azametifos fue realizada utilizando un detector de fluorescencia, longitud de onda de excitación de 230 nm, y una longitud de onda de emisión de 345 nm.

2.4 Validación de los métodos:

Las metodologías fueron validadas evaluando la selectividad, linealidad, recuperación, repetibilidad, precisión intermedia, límite de detección y límite de cuantificación de los analitos. La validación se basó en la guía ICH (ICH Harmonized Tripartite Guideline, 2005) y la "Decisión de la Comisión 2002/657 de la Comunidad Europea" (Commission Decision of 12 August 2002).

2.5. Exposición de mejillones a Cipermetrina, Deltametrina y Azametifos

Se obtuvieron mejillones (*Mytilus chilensis*) de longitud de concha similar desde un centro de cultivo de mejillones alejado de centros de producción de peces salmónidos. Para el estudio de cada antiparasitario se distribuyeron 3 grupos de 300 chorritos, los que se aclimataron por 14 días en estanques de 300 litros con agua de mar a 10 \pm 2°C. Los mitílidos fueron alimentados diariamente con cultivo de microalgas, producidas en el propio centro. Antes de ser sometidos a los tratamientos se tomó una



muestra de 20 mejillones de cada estanque como tiempo 0 (4 pooles de 5 choritos cada uno). Después de la aclimatización, todos los mitílicos fueron sacados de sus estanques originales y puestos en 3 estanques de 100 litros con agua de mar con las siguientes concentraciones y tiempo de duración del tratamiento con antiparasitarios: Cipermetrina: 15 ug/L por 30 minutos; Deltametrina: 3 ug/L por 40 minutos; Azametifos: 100 ug/L por 60 minutos. Luego de la exposición de los choritos a los distintos antiparasitarios, todos fueron regresados a sus estanques originales, con recirculación de agua. Desde cada estanque se obtuvieron 10 pooles de 5 mitílicos cada uno, en 4 ocasiones diferentes. La primera fue 1 hora después de la recirculación de agua normal. Las otras 3 ocasiones fueron a los 5, 10 y 15 días. Los mejillones fueron congelados a -20°C , para determinar posteriormente el contenido de antiparasitarios en las partes blandas de éstos, con las metodologías previamente montadas y validadas.

2.6. Exposición de mejillones a Diflubenzurón

Los mejillones fueron obtenidos del mismo lugar y con las mismas características que en el estudio anterior. Se distribuyeron 3 grupos de 300 mejillones y 20 peces Salmo salar de 120 ± 50 g., los que se aclimataron por 7 días en estanques de 300 litros con agua de mar a una temperatura de $10 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Los peces fueron alimentados con una fórmula comercial no medicada. Adicionalmente los mitílicos fueron alimentados diariamente con cultivo de microalgas al igual que en el estudio anterior. Antes de ser sometidos a los tratamientos se tomó una muestra de 20 mejillones de cada estanque como tiempo 0 (4 pooles de 5 mitílicos cada uno). Después de la aclimatización, se incluyó en el alimento Diflubenzurón, de modo que los peces consuman 6 miligramos de principio activo por Kg PV/día. El tratamiento se extendió por 14 días. Luego de terminado el tratamiento se obtuvieron de cada estanque 10 pooles de 5 mitílicos cada uno, en 4 ocasiones diferentes los días 1, 2, 5 y 7 post-tratamiento. Los mejillones fueron congelados a -20°C , para determinar posteriormente el contenido de Diflubenzurón en las partes blandas de éstos con la metodología previamente montada y validada.

2.7 Curvas de Depleción de los antiparasitarios de los mejillones

Para el cálculo de la curva de depleción, se utilizó el criterio de la comunidad Europea (EMEA, 1995), realizando la regresión lineal de Ln de concentración del antiparasitario, vs el tiempo post tratamiento (en días). Con el resultado de la curva de depleción se calculó el tiempo de vida media ($T_{1/2}$).

3. Resultados y Discusión

3.1 Desarrollo del método

3.1.2 Extracción de los analitos

En el presente estudio, se decidió utilizar la metodología Quechers para la extracción de todos los analitos. En cuanto a la limpieza de la muestra, se decidió probar el proceso de extracción en fase sólida dispersiva (como en la metodología original) utilizando sulfato de magnesio anhidro, PSA y C-18. En el caso de Diflubenzurón y Azametifos la limpieza de la muestra lograda fue suficiente. En cambio, las muestras de Cipermetrina y Deltametrina no lograron salir lo suficientemente limpias (dato no mostrado). Por esa razón se optó por una limpieza en fase sólida con columnas HLB, que pese a que no se obtuvo una buena recuperación, si se logró obtener muestras muy limpias.

3.2 Validación de los métodos

3.2.1. Linealidad y curvas de calibración

Los valores de la pendiente, intercepto, r^2 , valor p y rango lineal se muestran en la tabla 1.

Se obtuvo una muy buena linealidad de los analitos en el rango estudiado, con un coeficiente de determinación (r^2) superior a 0,99.

**Tabla 1.** Componentes de la curva de calibración de los diferentes analitos

Analito	Pendiente \pm DE	Intercepto \pm DE	p-value	r ²	Rango lineal (ng/ml)
Cipermetrina	202.7 \pm 3.9	655.4 \pm 1173.8	<0.001	0.995	52-520
Deltametrina	201.7 \pm 4.9	-1879.3 \pm 859.4	<0.001	0.992	30-300
Azametifós	5527 \pm 82.5	1314.8 \pm 16987	<0.001	0.997	20-400
Diflubenzuron	83.4 \pm 0.7	623.2 \pm 1429.3	<0.001	0.999	192-3840

DE: Desviación estándar, r²: coeficiente de correlación

3.2.2 Selectividad

Los resultados de los análisis de 10 pooles de 5 muestras cada uno de mejillones blanco, demostraron la ausencia de interferentes de importancia en los tiempos de retención de los analitos específicos

3.2.3 Recuperación

Los resultados de la recuperación para Azametifós y Diflubenzurón fueron óptimos (sobre el 80%). Para Cipermetrina y Deltametrina, la recuperación no fue óptima (45.1% y 56.3%, respectivamente), pero se logró obtener cromatogramas suficientemente limpios y una desviación estándar relativa (DER) adecuada.

3.2.4 Repetibilidad

Los resultados de repetibilidad son adecuados, la mayor desviación estándar relativa obtenida fue de 11,1%, lo que está dentro de los niveles propuestos por la Decisión de la Comisión 2002/657 de la Comunidad Europea para esta fracción de masa (Commission Decision of 12 August 2002).

3.2.5 Precisión intermedia

Los resultados son apropiados, el valor más alto de desviación estándar relativa obtenido fue de 10,2 %, lo cual no sobrepasa el valor propuesto por la Decisión de la Comisión 2002/657 de la Comunidad Europea para esta fracción de masa (Commission Decision of 12 August 2002).

3.2.6 Límites de Detección (LD) y Límites de cuantificación (LC)

Los resultados de los LD y LC, se presentan en la tabla 2

Tabla 2. LD y LC de los diferentes analitos estudiados

Analyte	LD (ng/g)	LC (ng/g)
Cipermetrina	21.3	73.4
Deltametrina	20	60
Azametifós	50	100
Diflubenzuron	480	480

LD: Límite de Detección, LC: Límite de Cuantificación

3.3 Acumulación de Cipermetrina, Deltametrina y Azametifós



El resultado del contenido de Cipermetrina, Deltametrina y Azametifós en las partes blandas de los mejillones, dio como resultado "no detectado". Es posible que el tiempo de exposición y concentración de antiparasitarios administrados por baño sean muy bajos, como para poder detectarlos utilizando las metodologías montadas y validadas.

3.4- Acumulación de Diflubenzurón

Fue posible detectar Diflubenzurón en las partes blandas de los mitílidos, es decir hubo bioacumulación de Diflubenzurón. No obstante lo anterior, las concentraciones obtenidas en el primer tiempo de muestreo (1 día post finalización del tratamiento) fue inferior a 1000 ppb, debido a lo cual se confeccionó una curva de calibración utilizando concentraciones en el rango de 22,8 a 456 ng/ml y muestras fortificadas de 114 mg/g. Los resultados de recuperación fueron similares a los obtenidos en la validación, por lo que se calcularon las muestras con esta curva de calibración, como límite de detección y cuantificación se determinó el valor de 114 ng/g.

Se confeccionó una curva de depleción de Diflubenzurón del logaritmo natural de la concentración de Diflubenzurón en las partes blandas de los mitílidos vs días post-tratamiento de los tres estanques. Con la curva de depleción se calculó un tiempo de vida media ($T_{1/2}$) de 3,4 días.

Con los resultados de bioacumulación de Diflubenzurón se puede concluir que los tratamientos de Diflubenzurón realizados por la industria salmonicultora difícilmente puede afectar la inocuidad alimentaria de los mejillones.

4. Conclusión

Se presentan metodologías de ensayo simples para la detección y cuantificación de Cipermetrina, Deltametrina, Azametifós y Diflubenzurón basado en la metodología Quechers en matriz del molusco *M. chilensis*. Los resultados de la validación demuestran que las metodologías presentadas son reproducibles, específicas, lineales y precisas. No se pudo demostrar bioacumulación de los antiparasitarios administrados por baño en condiciones controladas con las condiciones experimentales utilizadas. Se demuestra bioacumulación de Diflubenzurón en las partes blandas de los mejillones, pero la concentración máxima encontrada no llega a los 1000 ppb, que es el LMR establecido en salmones. El $T_{1/2}$ de Diflubenzurón en mejillones es de 3,4 días. Con los resultados obtenidos se concluye que es altamente improbable que la utilización de los antiparasitarios en la industria salmonicultora afecte la inocuidad alimentaria de los mejillones.

Referencias

- Arriagada, G.A., Stryhn, H., Campistó, J.L., Rees, E.E., Sanchez, J., Ibarra, R., Medina, M., St-Hilaire, S. 2014. Evaluation of the performance of pyrethroids on different life stages of *Caligus rogercresseyi* in southern Chile. *Aquaculture*. 426-427, 231-237.
- Bravo, S., Sevatdal, S., Horsberg, T., 2008. Sensitivity assessment of *Caligus rogercresseyi* to emamectin benzoate in Chile. *Aquaculture*. 282, 7-12.
- Bravo, S., Treasurer, J., Sepulveda, M., Lagos, C., 2010. Effectiveness of hydrogen peroxide in the control of *Caligus rogercresseyi* in Chile and implications for sea louse management. *Aquaculture*. 303, 22-27.
- Bravo, S., Silva, M., Monti, G. 2012. Efficacy of emamectin benzoate in the control of *Caligus rogercresseyi* on farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in Chile from 2006 to 2007. *Aquaculture*. 364-365, 61-66.



Bravo, S., Pozo, V., Silva, M, Abarca, D. 2013. Comparison of the fecundity rate of *Caligus rogercresseyi* infesting Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) on farms in two regions of Chile. *Aquaculture*. 404-405, 55-58.

Bravo, S., Sepúlveda, M., Silva, M, Costello, M., 2014a. Efficacy of deltamethrin in the control of *Caligus rogercresseyi* (Boxshall and Bravo) using bath treatment. *Aquaculture*. 432, 175-180.

Bravo, S., Silva, M, Treasurer, J. 2014b. Factors affecting the abundance of *Caligus rogercresseyi* (Boxshall and Bravo) on farmed salmonids in Chile in the period 2006–2007. *Aquaculture*. 434, 456-461.

Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (2002/657/CE).

EMA. 1999A. Committee for Veterinary Medicinal Products. Azamethiphos. Summary Report (2). EMEA/MRL/527/98-FINAL.

EMA, 1999B. Committee for Veterinary Medicinal Products. Diflubenzuron. Summary Report (2). EMEA/MRL/621/99-FINAL.

EMA, 2001 Committee for Veterinary Medicinal Products. Deltamethrin. Summary Report (4). EMEA/MRL/792/01-FINAL.

EMA, 2003 Committee for Veterinary Medicinal Products. Cypermethrin. Summary Report (3). EMEA/MRL/861/03-FINAL.

ICH Harmonized Tripartite Guideline. 2005. Validation of analytical procedures: text and methodology. ICH 2QR1.

SAG, 2014. Registro de productos farmacéuticos aprobados para uso veterinario. Gobierno de Chile, Ministerio de Agricultura. (Disponible en <http://www.sag.cl/ Acceso> en Noviembre de 2014).

Sernapesca. 2013. Anuario 2013. Cocechas-CC-Región.

A N E X O 13

Lista de participantes del taller de presentación de resultados.



TALLER "Evaluaci3n de la capacidad de mit3lidos de bioacumular productos qu3micos y farmac3uticos de uso en la acuicultura"

LISTADO DE ASISTENTES

	NOMBRE	EMPRESA	Mail	FIRMA
36	Sergio Contreras	IFOP		
37	Juan Carlos Quintanilla	IFOP		
38	Leonardo Guzman	IFOP		
39	Carolina Asencio	IFOP		
40	Paola Olmos	IFOP		
41	Luis Norambuena	IFOP		
42	Mario Rivas	IFOP		
43	Maria Eugenia Loy	IFOP		
44	Renato Oyarzun	IFOP		
45	Pablo Garcia	IFOP		
46	Arturo Candia	IFOP		
47	Gaston Vidal	IFOP		
48	Noelia Vega	IFOP		
49	Veronica Matus	IFOP		
50	Katherine Subiabre	IFOP		
51	Osval Espinoza P.	IFOP		
52	Patricia Carbonell	IFOP		
53	Rodrigo Mart3nez	IFOP		
54	Sandra Sarralde	IFOP		



TALLER "Evaluación de la capacidad de mitílicos de bioacumular productos químicos y farmacéuticos de uso en la acuicultura"

LISTADO DE ASISTENTES

	NOMBRE	EMPRESA	Mail	FIRMA
55	Emilio Fernández	OWSON		
56	Yohana González	Amichile	perestre@amichile.com	
57	Herván Troyoso	Intocait	htroyoso@intocait.com	
58	Erica Mena	FAO	emena@fao.org	
59	Karen González	Aquagestión	Karen.Gonzalez@aquagestion.cl	
60	CHRISTIAN FERNANDEZ	ECOINTEMA	ca.fernandez@ecoinتما.cl	
61	Yolanda Pérez	IFOP	yolanda.perez@ifop.cl	
62	Manuel Cortés	EXSA	manuel.cortes@exsa.com	
63	FRANCISCO J. SERRA	E. AguaChile S.A.	francisco.serres@aguachile.com	
64	Ximena Rojas			
65	Rodrigo Rosales	Amichile	rosales@sudmanir.com	
66	Erick Delacruz	Bayer	erick.delacruz@bayer.com	
67	Marco Rizo	UAPIC	marco.rizo@uapic.com	
68	Sandra Pardo	UACH	spardo@uach.cl	
69				
70				



A N E X O 14

Presentación realizada en el taller de entrega de resultados.



Evaluación de la capacidad de mitílicos de bioacumular productos químicos y farmacéuticos de uso en la acuicultura

**División de Investigación en Acuicultura
Departamento de Salud Hidrobiológica
Instituto de Fomento Pesquero**

**Presentado por: BQ. Luis Norambuena Subiabre
luis.norambuena@ifop.cl**



Puerto Montt, 5 Junio, 2015



OBJETIVO GENERAL

- ▶ Determinar la capacidad potencial de mitílidos de bioacumular en tejidos, productos farmacológicos de uso en acuicultura, la generación de residuos en producto y su potencial impacto sobre la industria mitilicultora.





OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ▶ Identificar los productos terapéuticos de uso en acuicultura con potencial de ser bioacumulados por mitílidos.
- ▶ Desarrollo y validación de técnicas analíticas para la detección y cuantificación de productos terapéuticos seleccionados en matrices biológicas de mitílidos, de al menos 4 principios activos.
- ▶ Evaluar la capacidad de bioacumulación, excreción y/o metabolización de mitílidos frente a la exposición a productos terapéuticos de uso en la salmonicultura bajo condiciones controladas, de al menos 4 principios activos.
- ▶ Determinar la posible bioacumulación de productos terapéuticos en mitílidos, en áreas donde se producen peces y moluscos, y donde existan bancos naturales conocidos.





Metodología

- ▶ **Objetivo :** *Identificar los productos terapéuticos de uso en acuicultura con potencial de ser bioacumulados por mitílidos.*

- **Identificación de productos terapéuticos a evaluar**
 - Revisión de documentos del SAG
 - Se solicitó Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura (SERNAPESCA) antecedentes respecto del uso de antiparasitarios en la industria

- **Revisión de literatura nacional e internacional, respecto de la posible bioacumulación de productos terapéuticos de uso en acuicultura, por parte de mitílidos y de la normativa de países productores respecto de lo mismo.**
 - Se realizó una búsqueda bibliográfica utilizando motores de búsqueda en línea tales como la ISI WEB of Science, ISI Web of Knowledge, Scopus, etc.
 - Se realizó una extensiva búsqueda de información pública y de libre acceso en sitios oficiales de organizaciones normativas internacionales que se relacionan o han relacionado con el uso de fármacos en salmonicultura y estudios de bioacumulación y depleción en mitílidos, o en su defecto, de moluscos bivalvos





Metodología

- ▶ **Objetivo :** *Desarrollo y validación de técnicas analíticas para la detección y cuantificación de productos terapéuticos seleccionados en matrices biológicas de mitílidos, de al menos 4 principios activos.*

- **Identificación y descripción de técnicas analíticas de detección de productos terapéuticos seleccionados.**
 - Se realizó una búsqueda bibliográfica utilizando motores de búsqueda en línea
 - Las metodologías fueron analizadas, comparadas y optimizadas, para ser adaptadas
 - Se elaboraron los protocolos

- **Desarrollo y validación de técnicas analíticas para la detección y cuantificación de productos terapéuticos seleccionados en matrices biológicas de mitílidos.**
 - Obtención de muestras para el desarrollo de las técnicas
 - Preparación de la muestra
 - Determinación y cuantificación del analito
 - Modificaciones/confirmación de protocolos
 - Validación de las metodologías propuestas





Metodolog3a

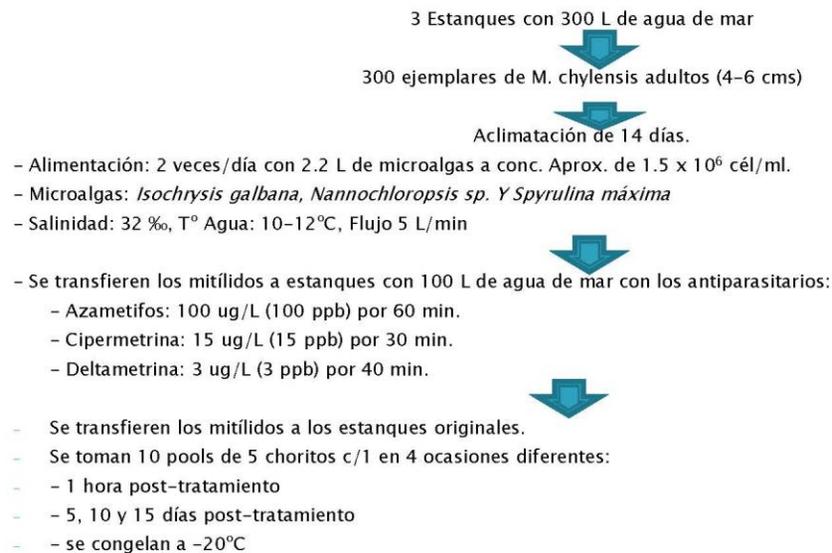
- ▶ **Objetivo :** *Evaluar la capacidad de bioacumulaci3n, excreci3n y/o metabolizaci3n de mit3lidos frente a la exposici3n a productos terapéuticos de uso en la salmonicultura bajo condiciones controladas, de al menos 4 principios activos.*

- Desarrollo de estudios de bioacumulaci3n y depleci3n de los productos terapéuticos seleccionados bajo condiciones controladas en mit3lidos
- Evaluaci3n de estudios de bioacumulaci3n y depleci3n de los productos terapéuticos seleccionados en condiciones controladas



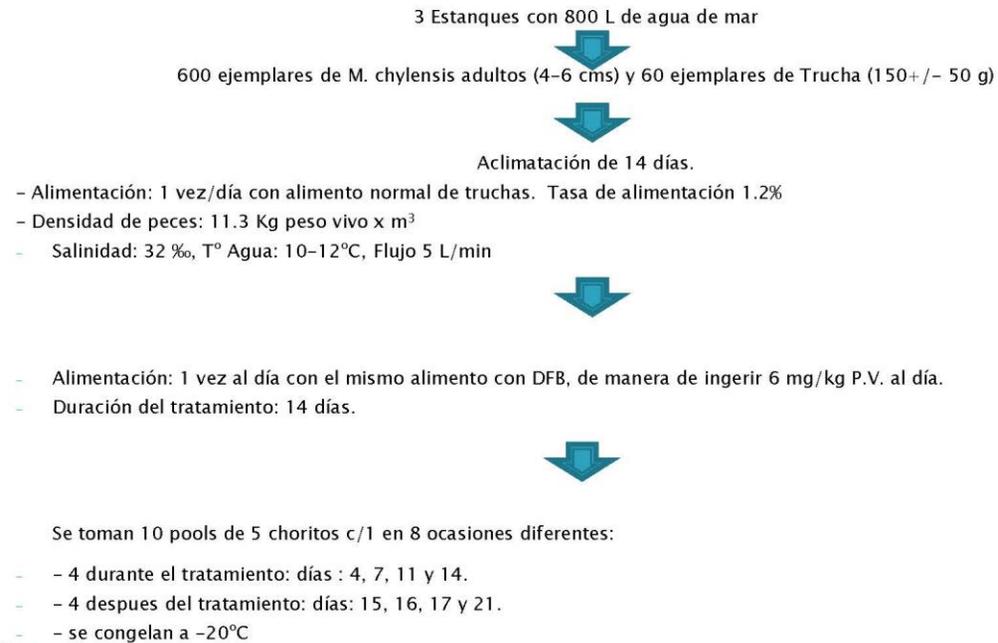


Estudios de bioacumulación de antiparasitarios aplicados por baño en condiciones controladas: azametifos, cipermetrina y deltametrina





Estudios de bioacumulación de Diflubenzuron en condiciones controladas.





Metodología

- ▶ *Objetivo: Determinar la posible bioacumulación de productos terapéuticos en mitílicos, en áreas donde se producen peces y moluscos, y donde existan bancos naturales conocidos.*
- ▶ **Desarrollo y ejecución de un plan de muestreo que considere obtención de muestras desde centros de producción.**





Estudios de bioacumulación de azametifos y deltametrina en condiciones de campo

- 10 pools de 5 mitílicos cada uno del tren más cercano al centro de cultivo de salmones.
- Los tiempos de muestreo fueron antes, durante y después de la ventana de tratamiento con los antiparasitarios en cuestión.
- Las muestras se congelaron a -20°C hasta su posterior análisis



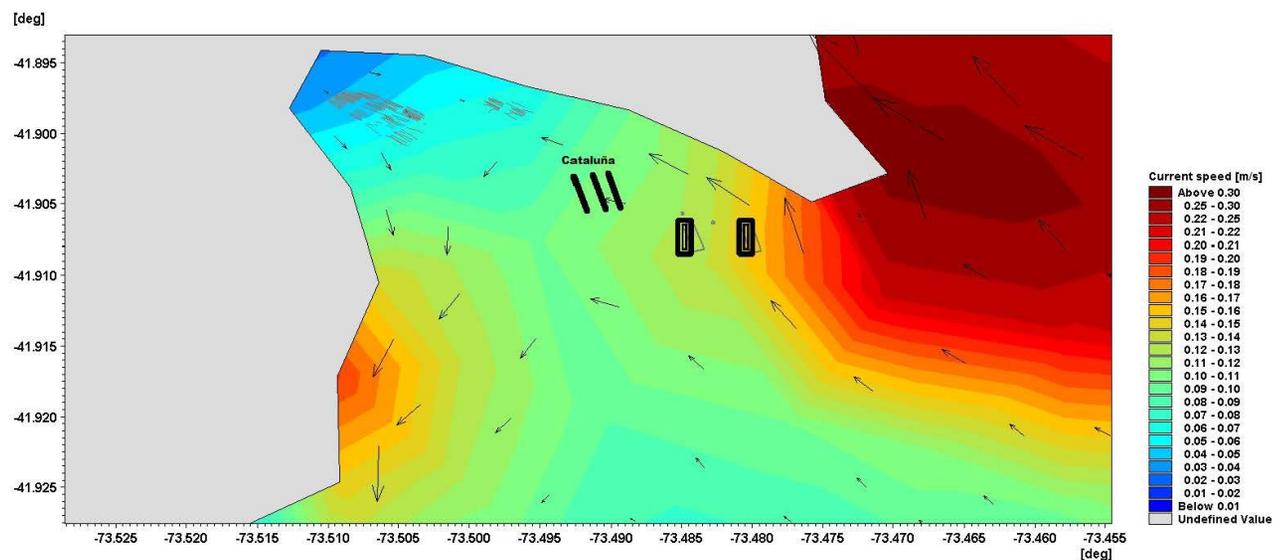


Centro de Cultivo Cataluña





Bahía Hueihue













Resultados





Objetivo : Identificar los productos terapéuticos de uso en acuicultura con potencial de ser bioacumulados por mitílicos

- ▶ **Identificación de productos terapéuticos a evaluar**





PRODUCTOS ANTIPARASITARIOS PARA CONTROL DE CALIGIDOSIS EN SALMONIDEOS CON REGISTRO DEL SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO (SAG)

Actualizado al 02-Mar-15

N° Registro SAG	Nombre comercial	Principio activo	Familia	Concentración	Forma Farmaceutica y Vía Empleo	Dosis de principio activo y tiempo aplicación	Titular	Período de resguardo
655	Slice® 0,2%	Benzoato de Emamectina	Avermectinas	0,2% 2,0 mg/g - 2,0 g/kg	Poivo uso oral, en el alimento	50 µg/ kg peso x 7 días	Intervet Chile Ltda.	60 días antes de cosecha
725	Calbiofarm®	Benzoato de Emamectina	Avermectinas	0,2% 2,0 mg/g - 2,0 g/kg	Poivo uso oral, en el alimento	50 µg/ kg peso x 7 días	Farmacología en Acuicultura Veterinaria FAV S.A.	60 días antes de cosecha
1289	No registra	Benzoato de Emamectina	Avermectinas	0,2% 2,0 mg/g - 2,0 g/kg	Poivo uso oral, en el alimento	51 µg/ kg peso x 7 días	Diagnotec Comercial S.A.	60 días antes de cosecha
1333	No registra	Benzoato de Emamectina	Avermectinas	0,2% 2,0 mg/g - 2,0 g/kg	Poivo uso oral, en el alimento	50 µg/ kg peso x 7 días	Intervet Chile Ltda.	60 días antes de cosecha
1381	Quinafish®	Benzoato de Emamectina	Avermectinas	0,2% 2,0 mg/g - 2,0 g/kg	Poivo uso oral, en el alimento	50 µg/ kg peso x 7 días	Centrovet Ltda.	60 días antes de cosecha
2068	Calishot®	Diflubenzurón	Benzolúreas	80% 800 mg/g - 800 g/kg	Poivo uso oral, en el alimento	6 mg/kg peso x 14 días	Farmacología en Acuicultura Veterinaria FAV S.A.	300 grados día
2079	AMX®	Deltametrina	Piretroides	1% 10 mg/ml	Solución externa para inmersión	2 mg/mt ³ - 0,2 ml/mt ³ x 30 - 40 min	Pharmaq A.S Chile Ltda.	1,0 grados día
2085	Betamax®	Cipermetrina	Piretroides	5% 50 mg/ml	Solución externa para inmersión	15 mg/mt ³ - 15 ml/mt ³ x 30 min	Novartis Chile S.A.	30 grados día
2093	Deltafav®	Deltametrina	Piretroides	1% 10 mg/ml	Solución externa para inmersión	3 mg/mt ³ - 0,3 ml/mt ³ x 40 min	Farmacología en Acuicultura Veterinaria FAV S.A.	20 grados día
2189	Byelice®	Azametifos 50%	Organo fosforado	50% 500 mg/g - 500 g/kg	Poivo para suspensión externa	100 µg/lt - 100 mg/mt ³ x 30 - 60 min	Bayer S.A.	1,0 grados día
2240	CalFree	Azametifos 50%	Organo fosforado	50% 500 mg/g - 500 g/kg	Poivo para solución externa	100 µg/lt - 100 mg/mt ³ x 30 min	Farmacología en Acuicultura Veterinaria FAV S.A.	20 grados día

Nota:

Todos los productos antiparasitarios se encuentran registrados para su comercialización bajo la modalidad de **Venta con Receta Retenida y Control de Saldo**

MM/mjs





Uso de Antiparasitarios en la Xª Región por la industria salmonicultora

	2011	2012	2013
Emamectina (Kg)	17	57	
Cipermetrina (Kg)	159	172	238
Deltametrina (Kg)	21	58	62
Azametifos (Kg)	-	-	1455
Diflubenzuron (Kg)	1320	638	2848

Sernapesca, 2015





- ▶ **Revisión de literatura nacional e internacional, respecto de la posible bioacumulación de productos terapéuticos de uso en acuicultura, por parte de mitílidos y de la normativa de países productores respecto de lo mismo.**

- Solamente se encontró un trabajo que aborda la bioacumulación de Cipermetrina en mitílidos asociados a la salmonicultura (Gowland *et al*, 2002), por lo que se revisaron trabajos de bioacumulación de otros contaminantes en mitílidos.

- No se encontraron documentos acerca de la existencia de normativa internacional asociada a la bioacumulación de productos terapéuticos de uso en acuicultura por parte de mitílidos o a moluscos bivalvos.





LMR de antiparasitarios en salmónidos

	Chile	Comunidad Europea	Japón
Diflubenzuron (ug/Kg)	1000	1000	1000
Deltametrina (ug/Kg)	30	10	30
Cipermetrina (ug/Kg)	50	50	30
Azametifos (ug/Kg)	100	-	-

Sernapesca, FAR MP1





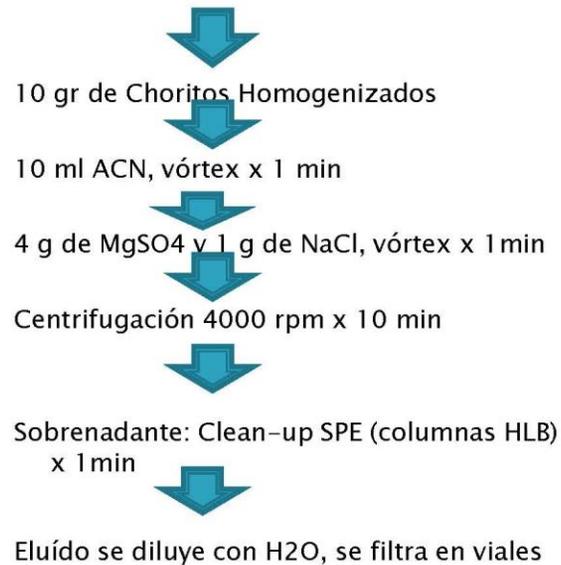
- ▶ *Objetivo : Desarrollo y validación de técnicas analíticas para la detección y cuantificación de productos terapéuticos seleccionados en matrices biológicas de mitílidos, de al menos 4 principios activos.*



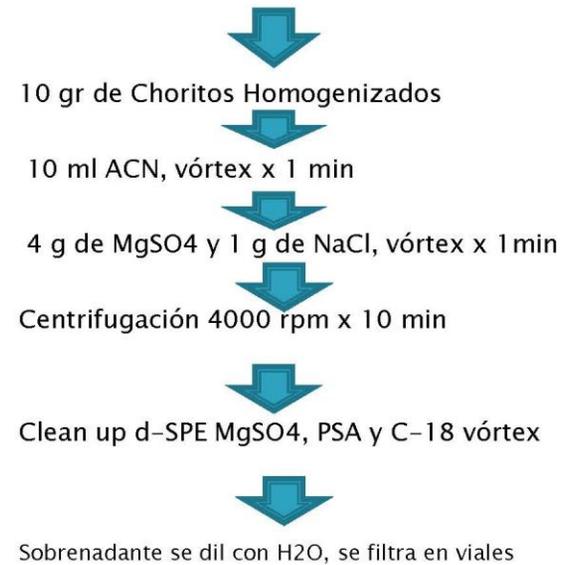


Extracción

Cipermetrina–Deltametrina



Azametifos–Diflubenzuron





Componentes de Quechers (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe).

Extracción:

- ACN: es el solvente mayormente utilizado, por sus propiedades extractivas para un amplio rango de analitos.
- MgSO₄: facilita la partición de solventes y mejora la recuperación de analitos polares.
- NaCl: reduce la cantidad de interferentes apolares.

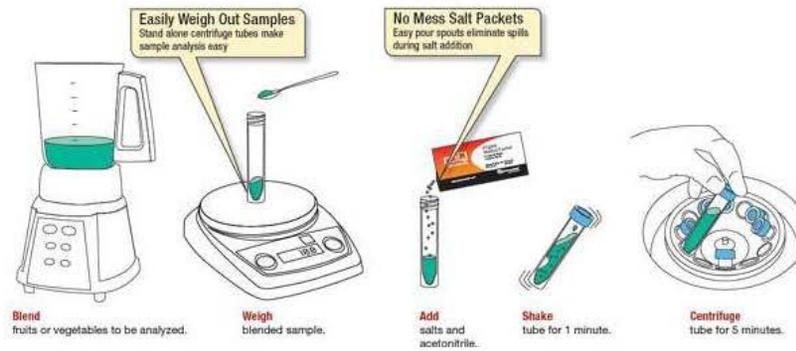
D-SPE Clean up:

- PSA: remueve azúcares, ácidos grasos, ácidos orgánicos, lípidos y pigmentos.
- C-18: remueve compuestos grasos de cadenas largas, esteroides y otros componentes apolares.
- MgSO₄: remueve agua de la fase orgánica.



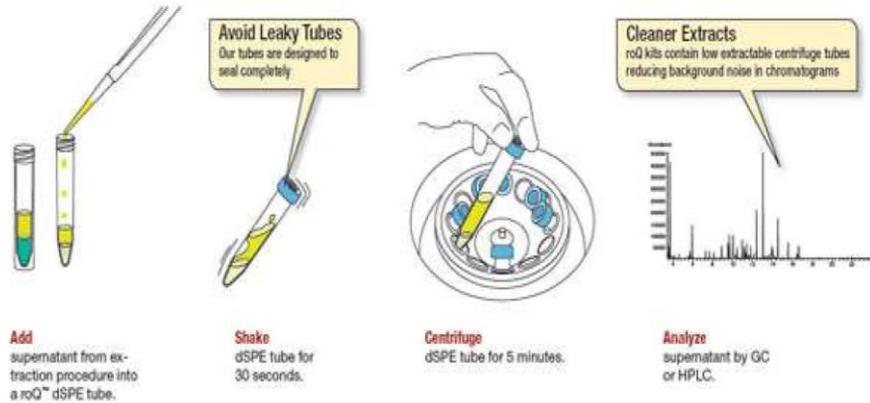


Extracci3n



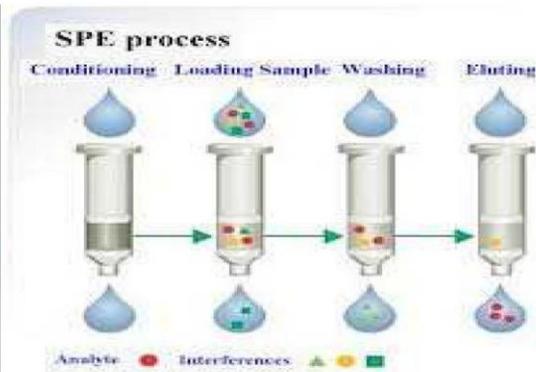


Clean-up: D-SPE





Clean-up: SPE





Condiciones Cromatogr3ficas

Cipermetrina-Deltametrina

Azametifos-Diflubenzuron

Accucore C-18 150 x 4.6 mm, 4 μm

Accucore C-18 150 x 4.6 mm, 4 μm

FM: Gradiente:

min	%H2O	%MeOH	%ACN
0.1	34	12	54
23	34	12	54
23.1	8	12	80
28	8	12	80
28.1	34	12	54

Flujo : 1.0 ml/min

T° Horno: 40°C

Vol. inyecci3n: 50 ul

Detecci3n: DAD (210 nm)

FM: isocr3tica:

Analito	%H2O	%MeOH	%ACN
Azametifos	71		29
Diflubenzuron	45	5	50

Flujo : 1.0 ml/min

T° Horno: 40°C

Vol. inyecci3n: 50 ul

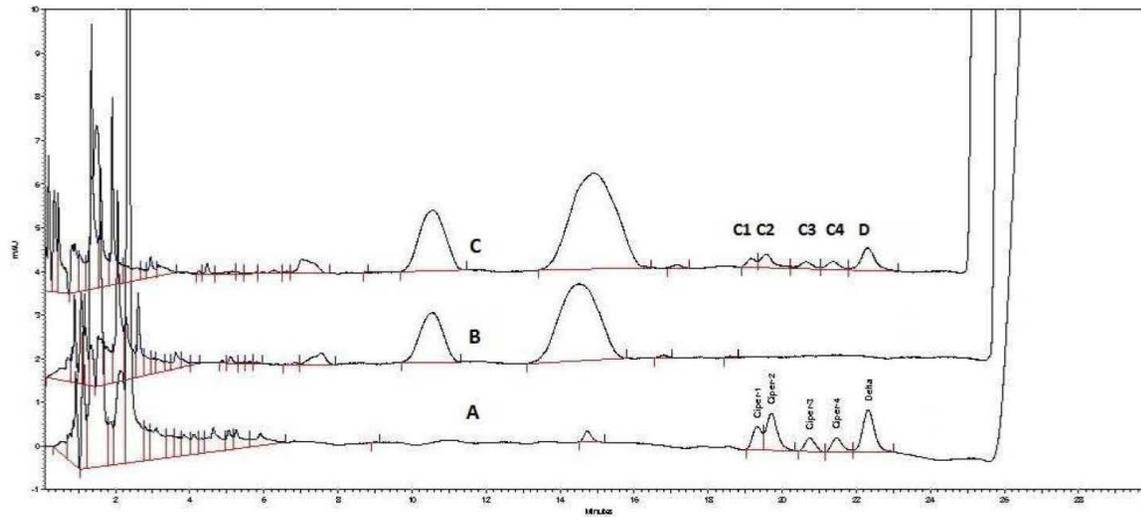
Detecci3n: Diflubenzuron: DAD (258 nm)

Azametifos: FL: Ex: 230 nm

Em: 345 nm

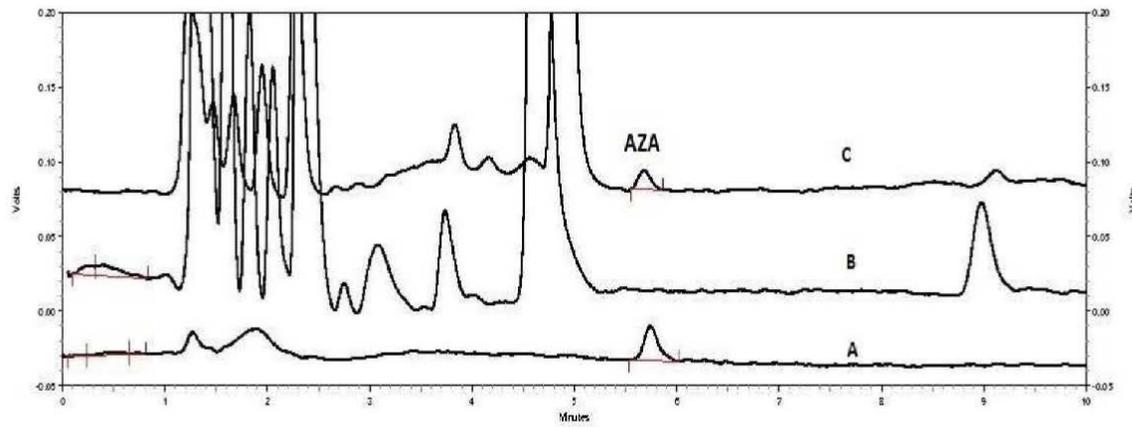


Cromatogramas de Cipermetrina-Deltametrina



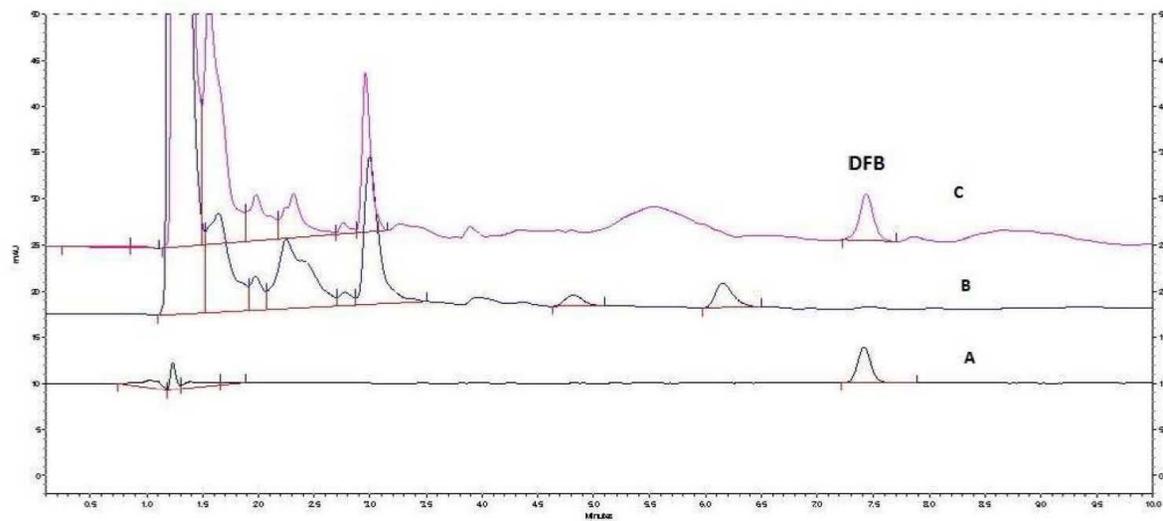


Cromatogramas de Azametifos





Cromatogramas de Diflubenzuron





Validación de las metodologías





Componentes de la curva de calibración de los diferentes analitos

Analito	Pendiente +/- DE	Intercepto +/- DE	P-value	r ²	Rango lineal ng/ml
Cipermetrina	202.7±3.9	655.4±1173.8	<0.001	0.995	52-520
Deltametrina	201.7±4.9	-1879.3±859.4	<0.001	0.992	30-300
Azametifos	5527±82.5	1314.8±16987	<0.001	0.997	20-400
Diflubenzuron	83.4±0.7	623.2±1429.3	<0.001	0.999	192-3840





Recuperación

Analito	Recuperación (%)	D.S.	CV%
Azametifos	81.4	6.7	8.2
Diflubenzuron	100	4.2	4.0
Cipermetrina	45.1	4.0	8.9
Deltametrina	56.3	5.7	10.2





Repetibilidad

Analito	Día	CV% Día	CV% Nivel 1	CV% Nivel 2	CV% Nivel 3
Cipermetrina	1	9.8%	7.1%(100ppb)	10.5%(200ppb)	7.8%(400ppb)
	2	9.3%	8.9%	7.6%	4.4%
	3	8.6%	4.2%	7.1%	7.6%
Deltametrina	1	10.1%	4.4%(60ppb)	1.8%(120ppb)	4.3%(240ppb)
	2	11.1%	3.6%	2.2%	7.3%
	3	9.3%	4.8%	4.0%	4.2%
Azametifos	1	8.8%	7.6%(100 ppb)	7.1%(200ppb)	7.8%(400ppb)
	2	6.4%	8.3%	1.6%	2.3%
	3	7.7%	9.5%	2.9%	3.9%
Diflubenzuron	1	4.9%	4.2%(1000 ppb)	2.3%(2000 ppb)	2.4%(4000 ppb)
	2	3.9%	2.2%	1.5%	0.9%
	3	2.8%	2.2%	1.3%	1.6%



Precisión Intermedia

Analito	CV% Total	CV% N1	CV% N2	CV% N3
Cipermetrina	8.9 %	7.2%(100ppb)	9.1%(200ppb)	7.2%(400ppb)
Deltametrina	10.2 %	4.5%(60ppb)	4.5%(120ppb)	5.2%(240ppb)
Azametifos	8.2 %	8.5%(100ppb)	5.8%(200ppb)	6.3%(400ppb)
Diflubenzuron	4.0 %	3.0%(100ppb)	1.9%(200ppb)	3.2%(400ppb)





LD y LC

Analito	LD ng/g	LC ng/g
Cipermetrina	21.3	73.4
Deltametrina	20	60
Azametifos	50	100
Diflubenzuron	480	480





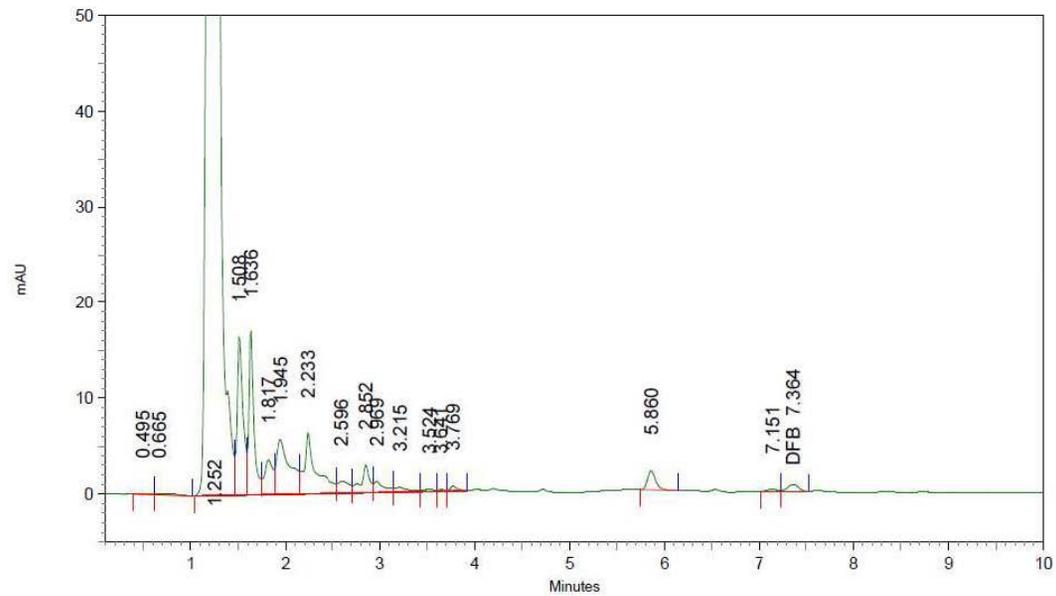
Revalidaci3n de Diflubenzuron

Rango Lineal	25 y 500 ng/ml	
Recuperaci3n	101.1 %	CV%: 5.3
LD y LC	100 ng/g	





Fortificado DFB 100 ng/g (ppb)





- ▶ Desarrollo de estudios de bioacumulación y depleción de los productos terapéuticos seleccionados bajo condiciones controladas en mitílidos





Estudios de bioacumulación de antiparasitarios aplicados por baño en condiciones controladas: azametifos, cipermetrina y deltametrina

Analito	1 hora	5 días	10 días	15 días
Azametifos	ND	ND	ND	ND
Cipermetrina	ND	ND	ND	ND
Deltametrina	ND	ND	ND	ND





Estudios de bioacumulación de azametifos y deltametrina en condiciones de campo

Analito	Antes	Durante	Después
Azametifos	ND	ND	ND
Deltametrina	ND	ND	ND



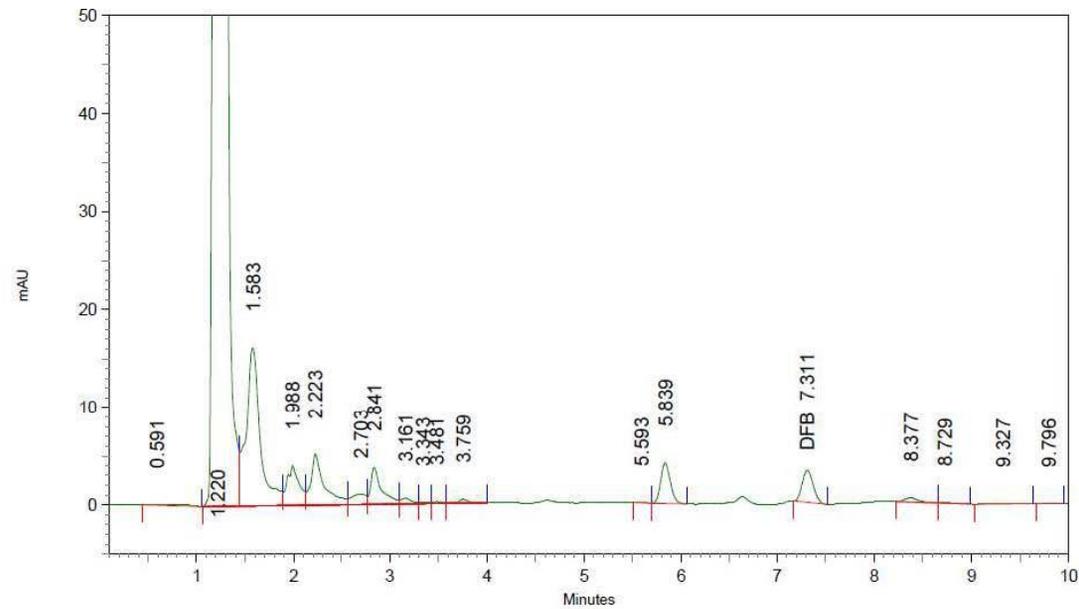


- ▶ Estudios de bioacumulación de Diflubenzuron en condiciones controladas.



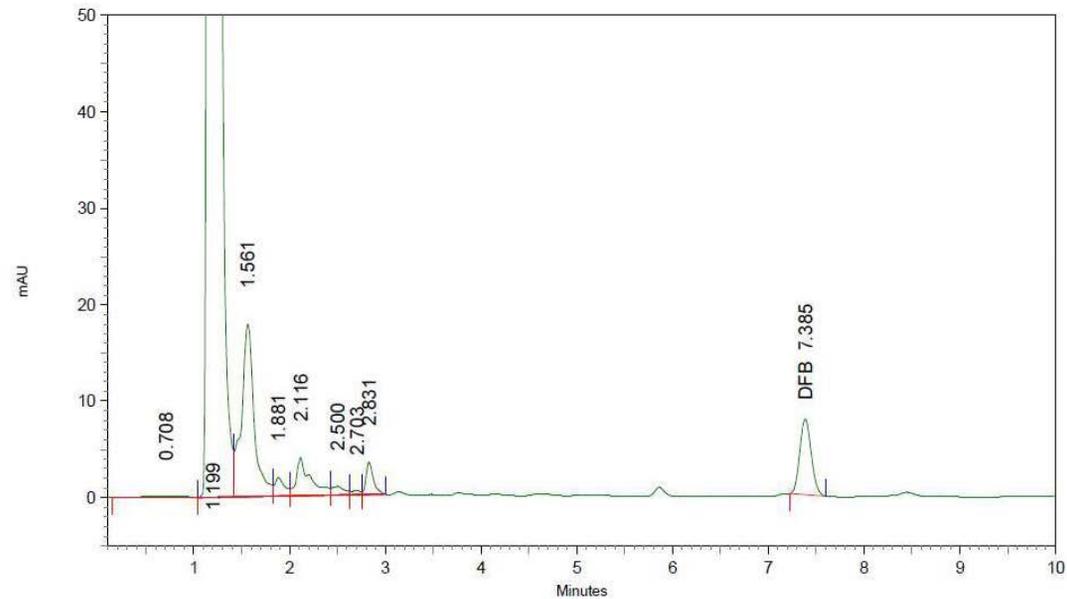


Cromatograma: T1 (día 5 de trat.) E2 Pool2 (400 ppb aprox)



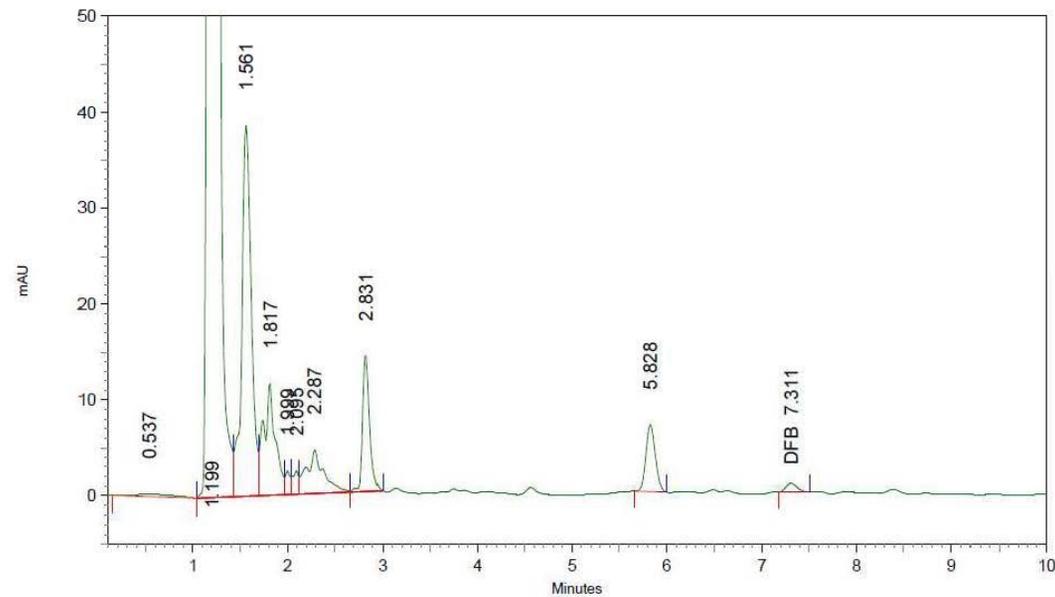


Cromatograma: T5(d1 post-trat) E1 Pool3 (1000 ppb aprox)



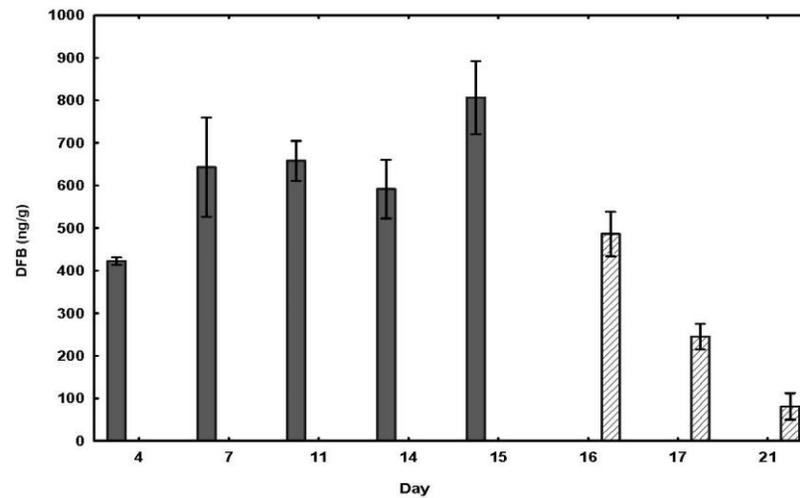


Cromatograma: T8 (d7 post-trat) E2 pool 7 (100 ppb aprox)





Bioacumulación-Depleción de DFB

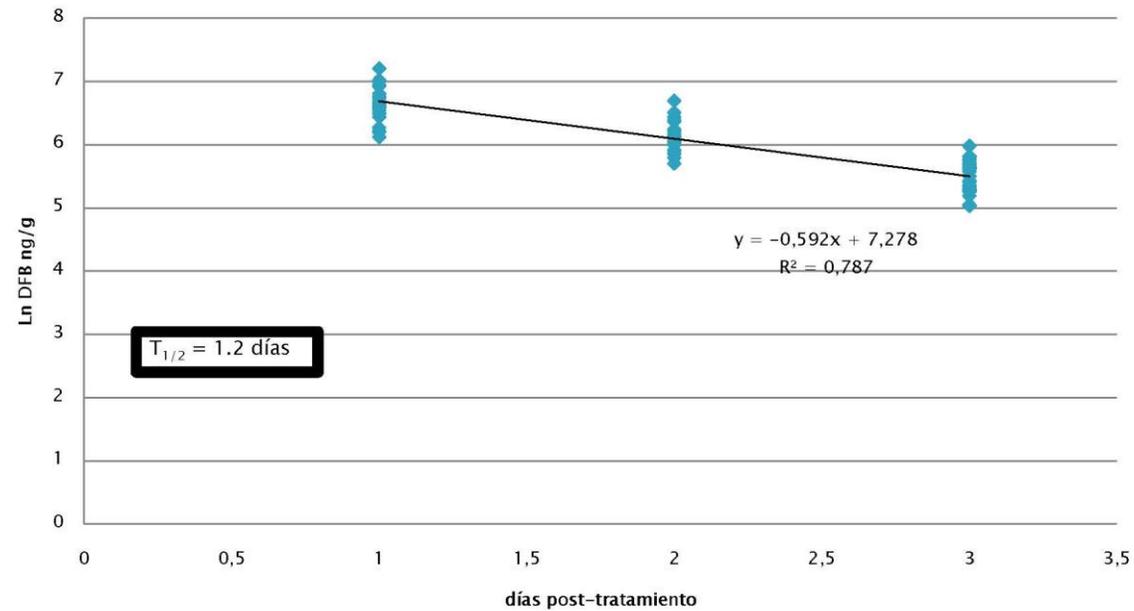


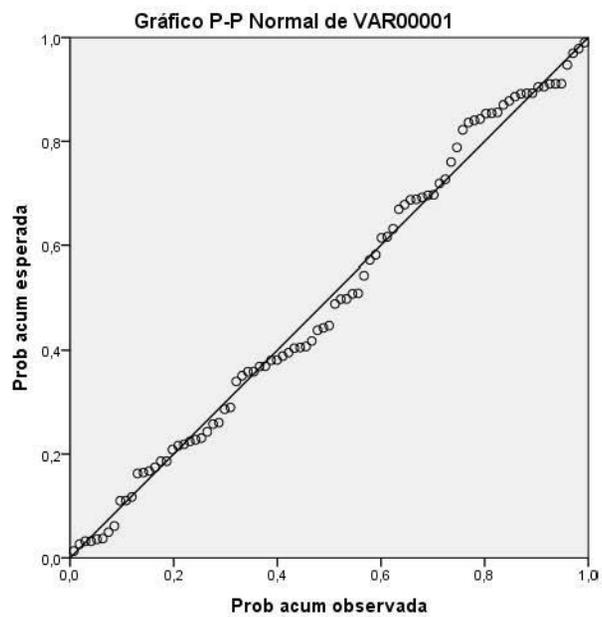
Concentración de Diflubenzuron promedio (ng/g) en *Mytilus chilensis*





Curva de Depleci3n de DFB







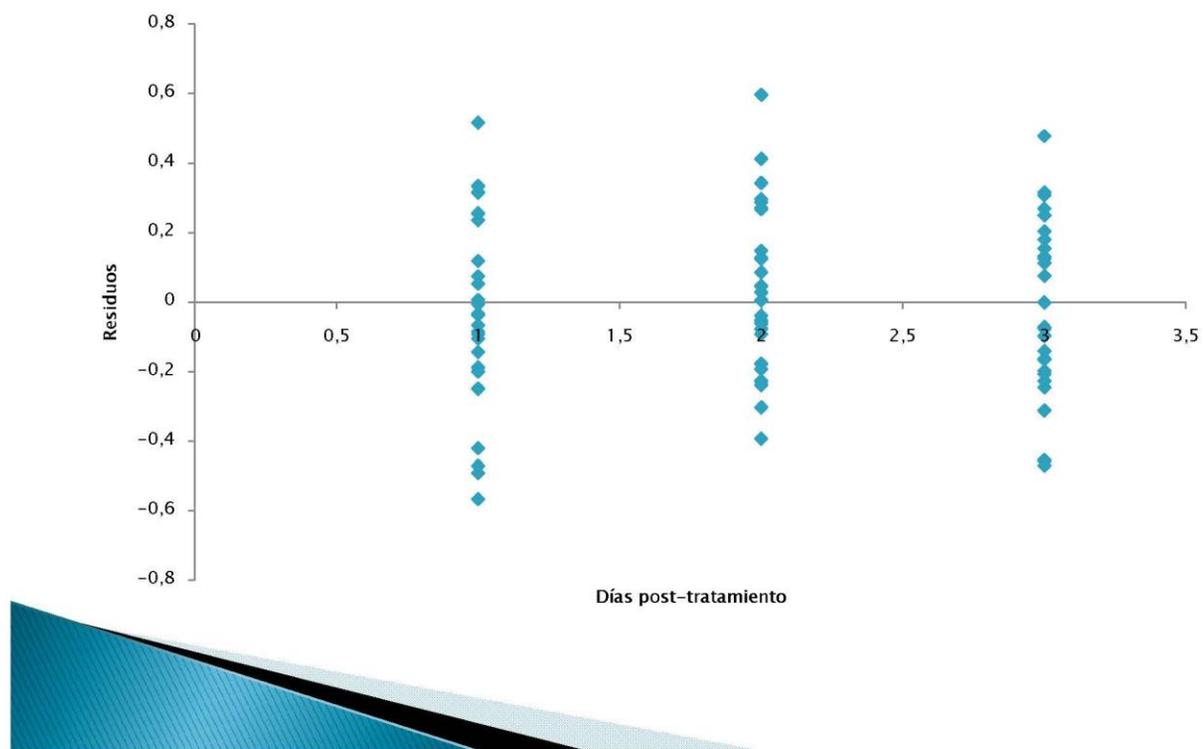
Prueba de Normalidad

	Shapiro Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
VAR00001	,985	89	,408





Gráfico de los residuales





Conclusiones

- ▶ Se logró desarrollar y validar las técnicas analíticas para la detección de Cipermetrina, Deltametrina, Azametifós y Diflubenzurón, mediante la técnica HPLC en matriz chorito.
- ▶ La linealidad es adecuada para todos los analitos estudiados.
- ▶ La recuperación, especificidad y precisión es adecuada para Diflubenzurón y Azametifós.
- ▶ La recuperación de los piretroides es baja, pero su especificidad y precisión son óptimas.
- ▶ Se realizó los ensayos in vivo en ambiente controlado de Cipermetrina, Deltametrina y Azametifós en el centro de Maricultura Hueihue. Además se realizó los muestreos en terreno de Deltametrina y Azametifós. No fue posible determinar bioacumulación en éstos antiparasitarios administrados por baño.





Conclusiones, cont.

- ▶ Se realizó los ensayos in vivo en ambiente controlado de Diflubenzurón en el centro de Maricultura Hueihue.
- ▶ Se pudo determinar bioacumulación de Diflubenzurón en el chorito, pero la concentración máxima alcanzada bordea los 1000 ppb.
- ▶ De acuerdo a la curva de depleción obtenida, se determina que el tiempo de vida media del antiparasitario en el chorito sería de 1.2 días aproximadamente.
- ▶ Se demuestra que es altamente improbable la detección de los antiparasitarios utilizados en la salmonicultura en choritos en terreno al menos a las concentraciones que pudieran afectar su inocuidad alimentaria.





INSTITUTO DE FOMENTO PESQUERO

Sección Ediciones y Producción
Almte. Manuel Blanco Encalada 839,
Fono 56-32-2151500
Valparaíso, Chile
www.ifop.cl



www.ifop.cl