

¿Son fiables los productos que encontramos en los supermercados?

Maitane Olivares, Olatz Zuloaga

Cuaderno del estudiante

IKD baliabideak 4 (2012)

INDICE

Contexto de la Asignatura	3
Definición general del proyecto	6
1) Pregunta motriz	6
2) Carga de trabajo y duración del proyecto	7
Metodología y sistemas de evaluación.....	8
1) Actividades.....	8
2) Lista de entregables	23
3) Lista de recursos	23
4) Sistema de Evaluación	26
Anexo. Rúbricas.....	27

CONTEXTO DE LA ASIGNATURA

“Cromatografía y Técnicas Afines” es una asignatura optativa que se imparte en el segundo ciclo de la Licenciatura de Química. A continuación se detalla la información que se recoge en la guía docente sobre esta asignatura:

La asignatura consta de un total de 7.5 créditos ECTS distribuidos en 10 horas presenciales y 15 horas no presenciales por crédito ECTS durante 15 semanas. Esto resulta en que las horas no presenciales son de 7.5 por semana.

Datos de la Asignatura					
Titulación	Licenciado en Químicas			Plan	2003
Asignatura	Cromatografía y Técnicas Afines			Código	
Tipo	Optativa			Curso	4
Créditos ECTS	7.5	Clases teóricas (Aula)	30	Clases prácticas (Aula)	0
Eskola praktikoak (konputagailu gelan)		Seminarios	15	Clases prácticas (Laboratorio)	30
Descripción	Fundamento teórico y clasificación de las técnicas cromatográficas. Cromatografía de gases. Cromatografía de Líquidos. Electroforesis. Cromatografía de Fluidos Supercríticos. Hibridación.				
Departamento	Química Analítica				

Profesores	
Responsable(s)	Maitane Olivares Zabalandikoetxea; Olatz Zuloaga Zubieta
Ubicación	Dpto. Química Analítica. FCT-ZFT. CD1/CD2. Planta baja.

En cuanto a los objetivos específicos de la asignatura se detallan a continuación:

Ser capaces de seleccionar adecuadamente la técnica de separación y detección adecuada para de determinado problema analítico

Capacidad para desarrollar y aplicar los distintos métodos cromatográficos

Capacidad para trabajar en grupo

Capacidad para encontrar, entender, explicar y discutir la información relacionada con las técnicas estudiadas en castellano como en inglés.

A fin de desarrollar dichas competencias el temario de la asignatura se detalla a continuación:

Tema 1 – Introducción a las técnicas cromatográficas.

Importancia y necesidad de los procesos de separación en Química Analítica. Cromatografía: definición, desarrollo histórico y generalidades. Clasificaciones. Introducción al proceso cromatográfico. Parámetros Cromatográficos.

Tema 2 – Cromatografía de Gases (I). Fundamentos e Instrumentación.

Sarrera. Introducción. Instrumentación. Gas portador. Sistemas de introducción de muestra. Columnas, soportes y fases estacionarias, Columnas capilares. Control de la temperatura. Sistemas de detección: tipos y características.

Tema 3 – Cromatografía de Gases (II). Aplicaciones.

Aspectos Cualitativos. Aspectos Cuantitativos. Métodos de cuantificación. Técnicas especiales en cromatografía de gases: espacio en cabeza, purga y trampa, micro-extracción en fase sólida. Nuevas tendencias: GC-GC y GCxGC. Derivatización en cromatografía de gases. Aplicaciones generales.

Tema 4 – Cromatografía de Líquidos (I). Fundamentos e Instrumentación.

Introducción. Soporte y fase estacionaria. Cromatografía líquida de baja presión vs. Cromatografía líquida de alta resolución. Cromatógrafo de líquidos. Partes del equipo. Sistemas de bombeo de la fase móvil. Sistemas de introducción de muestra. Columnas y pre-columnas. Sistemas de detección. Sistemas de recogida y tratamiento de datos. Nuevas tendencias: Fast LC. Aplicaciones analíticas.

Tema 5 – Cromatografía de Líquidos (II). Técnicas de adsorción y separación.

Introducción. Sílice como material cromatográfico. Adsorbentes. Características de las fases móviles. Aplicaciones. Cromatografía de separación: fase normal y fase reversa. Selección de la fase estacionaria y la fase móvil. Aplicaciones analíticas.

Tema 6 – Cromatografía de Líquidos (III). Intercambio Iónico.

Introducción. Tipos de Cromatografía iónica: cromatografía de intercambio iónico, pares de iones y exclusión de iones. Cromatografía de intercambio iónico: con y sin supresión. Detectores. Aplicaciones analíticas.

Tema 7 – Cromatografía de Líquidos (IV). Exclusión.

Introducción. Parámetros de la cromatografía de exclusión. Características de los geles. Variables que afectan a la exclusión. Aplicaciones analíticas.

Tema 8 – Cromatografía de Fluidos Supercríticos.

Introducción. Fluidos supercríticos: definición y propiedades. Variables instrumentales y condiciones de trabajo. Fases estacionarias. Fases móviles. Detectores. Aplicaciones.

Tema 9 – Electroforesis.

Introducción. Fundamentos de la electroforesis capilar. Variables que afectan a la movilidad electroforética. Instrumentación. Tipos de inyección de muestra: hidrodinámica y electrocinética. Sistemas de detección: fotométrica, fluorescente y electroquímica. Técnicas electroforéticas: electroforesis capilar de zona, isoelectroenfoque capilar, electroforesis capilar mediante geles, cromatografía electrocinética micelar, isotacoforesis. Aplicaciones.

Tema 10 – Técnicas de Hibridación en Cromatografía.

Hibridación. Tipos. Conexión con la espectrometría de masas: fuentes de ionización, interfases, analizadores de masa y detectores. Aplicaciones analíticas.

DEFINICIÓN GENERAL DEL PROYECTO

La metodología de aprendizaje basada en proyectos (PBL, Project Based Learning) se aplicará únicamente en los créditos teóricos de la asignatura. Aún así, los créditos prácticos que se desarrollarán en el laboratorio estarán relacionados con las temáticas tratadas en la metodología PBL. Las razones por las que se ha decidido aplicarlo sólo a la parte teórica se centran en dos:

1. Por una parte, para aplicar PBL también en las prácticas, sería conveniente que éstas se realizaran al final del curso. Sin embargo, la elección de las fechas no está en nuestra mano dado que al ser una optativa somos los últimos en escoger las fechas. En estos momentos, la opción de negociar las fechas es mínima.
2. Por otro parte, la instrumentación que tenemos en el laboratorio es limitada. Si la finalidad del proyecto estaría enfocada a la aplicación de la metodología analítica con la técnica escogida en el laboratorio, las técnicas a emplear así como su estudio quedarían muy limitadas así como de los contenidos y capacidades de los alumnos.

En un principio se pensó en aplicar la totalidad de los créditos teóricos (4.5 créditos ECTS) pero debido a la complejidad que podrían adquirir los proyectos se ha pensado centrar el proyecto en 2.9 créditos ECTS, y mantener la impartición del resto de los contenidos mediante la metodología clásica. Por lo tanto, se plantearán 5 sub-proyectos que garantizarán la resolución de la pregunta motriz.

1) Pregunta motriz

"¿Son fiables los productos que se encuentran en los supermercados?"

Cada vez es mayor la información y las noticias que nos llegan sobre la contaminación de los productos alimenticios. Podemos encontrar un amplio número de ejemplos en la última década como la contaminación de pollos con dioxinas en Bélgica y Alemania, la contaminación de leche para niños con melanina en China, etc. Estos casos suscitan una gran preocupación en la sociedad sobre la calidad de los productos alimenticios así como el interés de plantear reglamentación sobre los alimentos que garanticen el control de la calidad de los mismos. AZTI-Tecnalia es una empresa que lleva números años dedicado a la investigación alimentaria así como al análisis de productos alimenticios para garantizar su calidad y el bienestar del consumidor. Este proyecto, por lo tanto, irá encaminado al desarrollo de determinados métodos analíticos que pueden ser aplicados en el departamento de la unidad de análisis de AZTI-Tecnalia, como son:

- a) Objetivos marcados por el responsable del laboratorio de cromatografía de gases: análisis de bifenilos policlorados en peces, la elección de un inyector adecuado para el análisis de furano en café, y el análisis de melanina en leche en polvo.
- b) Con lo que respecta al laboratorio de Cromatografía de Líquidos los objetivos marcados son: determinación de clenbuterol, salbutamol y cimeteol en carne y la

detección de determinados problemas analíticos detectados en distintos métodos analíticos y su resolución.

El proyecto que surge de responder la pregunta motriz permite desarrollar 2.9 créditos ECTS de los 4 créditos totales en los que se desarrollan los contenidos de los temas 1 al 5 respectivamente. Los temas restantes, temas 6, 7, 9 y 10 se impartirán mediante la metodología clásica pero garantizando un modo cooperativo de aprendizaje. En los últimos años, el tema 8 no se suele impartir, y se prevé mantenerlo así en el curso académico 2011-2012 también.

2) Carga de trabajo y duración del proyecto

Tal y como se ha descrito en la descripción de la asignatura, la distribución de créditos de la asignatura sería la que se muestra a continuación:

- a) Total: 7.5 créditos
- b) Magistrales: 2.5créditos
- c) Seminarios: 1.5 créditos
- d) Prácticas de laboratorio: 3.0 créditos

Como se ha argumentado anteriormente, 2.9 créditos se impartirán en base a la metodología PBL, concretamente el 38.7% de la asignatura pero el 72.5% del contenido teórico de la asignatura.

La carga de trabajo dentro del proyecto se distribuye durante las 12 semanas lectivas tal y como se detalla en la Tabla 1 que se muestra más adelante (ver apartado 3). La docencia comenzará con la metodología cooperativa y en base a proyectos y las últimas tres semanas (13-15 respectivamente) se centrarán en los contenidos que se impartirán utilizando la metodología clásica de la enseñanza.

METODOLOGÍA Y SISTEMAS DE EVALUACIÓN

1) Actividades

Cada vez es mayor la información y las noticias que nos llegan sobre la contaminación de los productos alimenticios. Podemos encontrar un amplio número de ejemplos en la última década como la contaminación de pollos con dioxinas en Bélgica y Alemania, la contaminación de leche para niños con melanina en China, etc. Estos casos suscitan una gran preocupación en la sociedad sobre la calidad de los productos alimenticios así como el interés de plantear reglamentación sobre los alimentos que garanticen el control de la calidad de los mismos. AZTI-Tecnalia es una empresa que lleva números años dedicado a la investigación alimentaria así como al análisis de productos alimenticios para garantizar su calidad y el bienestar del consumidor. Este proyecto, por lo tanto, irá encaminado al desarrollo de determinados métodos analíticos que pueden ser aplicados en el departamento de la unidad de análisis de AZTI-Tecnalia.

Para desarrollar los objetivos planteados se realizarán las siguientes actividades específicas (ver Tabla 1 para la secuencia detallada de la distribución de las tareas):

1.1) Sesión 1 (1 hora)

En esta primera sesión se explicará en qué va a consistir la metodología PBL y para ello se les proporcionará la guía para el estudiante, guía en la que se recoge la información necesaria para el alumno. A continuación, para iniciar con esta metodología, y el proyecto, se les proporcionará el artículo titulado "¿Sabemos lo que comemos?" publicado en el Semanal de Mayo de 2011. El objetivo de este artículo es intentar preocupar al alumno sobre la calidad de los alimentos que ingerimos y por lo tanto involucrarlos en garantizar su calidad desde un punto de vista químico, es decir, su análisis. En concreto, su labor consistiría en este campo, el desarrollo de métodos precisos y exactos para garantizar la calidad de los productos alimenticios.

Se establecerán los distintos grupos que serán sobre 3 o 4 alumnos por grupo.

Comer
puede
ser malo
para la
salud
(incluso
comiendo
sano)

Son un enemigo invisible,
pero muy perseverante.
Las sustancias químicas que hay en nuestros
alimentos, hasta en los aparentemente saludables,
pueden llegar a causar enfermedades crónicas. El
aumento del asma, los problemas de fertilidad, la
diabetes y otras enfermedades autoinmunes apuntan
hacia lo que comemos. Por eso hemos preguntado
a los expertos qué pruebas hay y qué se está
haciendo para garantizar nuestra
salud. La respuesta es, cuando menos,
inquietante. POR CARLOS NIÑERU SÁNCHEZ
IMAGEN DE MEKARUSHI

1.2) Sesión 2 (2 horas)

Se realizará el test de conocimientos previos mediante los Sistemas de Respuesta Personal (o Clickers) (ver Anexo II). Este test se realizará de modo anónimo para tener una primera aproximación de los conocimientos de cromatografía que tienen los alumnos en conjunto. Al ser un primer test, su resultado no se tendrá en cuenta para la evaluación del alumno.

En esta sesión se repasarán y profundizarán los conocimientos sobre los parámetros cromatográficos mediante la enseñanza cooperativa. La información necesaria para esta tarea la podrán localizar en la página web: <http://www.chromacademy.com>. Este link será muy útil durante toda la asignatura puesto que se describe de forma detallada e ilustrado mediante videos los distintos aspectos referentes a la cromatografía. Además, esta aplicación les permite también poder realizar autoevaluaciones.

La sesión comenzará realizando la actividad del puzle. Los expertos se reunirán durante media hora, y durante la siguiente media hora cada miembro del grupo pondrá a disposición del resto los conocimientos adquiridos. De este modo se fomentará la interdependencia positiva. Al finalizar la sesión se les impartirá un conjunto de ejercicios para realizar en grupo y que deberán entregar para la siguiente sesión.

1.3) Sesión 3 (1 hora)

Entrega del primer ejercicio que será corregido por el docente y la nota será para todo el grupo sin distinción de los miembros del grupo.

En esta sesión se comenzará la propuesta para el análisis de PCBs en peces. Durante los primeros 15 minutos se planteará el objetivo de la tarea que se resume en: encontrar, justificar y discutir las condiciones cromatográficas empleadas en una publicación científica (ver Anexo I) para el análisis de estos analitos. Para ello:

- En primer lugar se les explicará cómo deben realizar las búsquedas bibliográficas dentro de una base de datos documentada como SciFinder.
- Comenzarán a buscar artículos relacionados con el análisis de PCBs en peces.
- Deberán leer, entender y resumir el artículo encontrado para la siguiente sesión.

1.4) Sesión 4 (2 horas)

A fin de garantizar y comprobar que han leído y entendido el artículo que habían encontrado en la sesión anterior, la primera parte de la sesión (30 minutos) se dedicará a la realización de un póster que resuma las partes más relevantes de la misma atendiendo a la parte cromatográfica: identificación y razonamiento de las distintas etapas del análisis cromatográfico.

A continuación, se comenzará con el apartado relacionado con los inyectores utilizados en la cromatografía de gases (unos 90 minutos). Esta tarea se realizará también mediante la metodología del puzle. Para la siguiente sesión, será necesaria la

preparación de la documentación necesaria tanto para la reunión con los expertos como para proporcionar a sus compañeros.

1.5) Sesión 5 (1 hora)

Esta sesión estará íntegramente dedicada a la reunión de expertos así como de la distribución de material entre los miembros del grupo. La reunión se llevará a cabo utilizando un ejercicio que los alumnos entregarán vía moodle para su posterior corrección. Se les proporcionará también un ejercicio para trabajar de modo similar los detectores en cromatografía de gases. En la sesión 8, realizarán una prueba de control de conocimientos mínimos sobre los tipos de inyección y detección empleados en cromatografía de gases.

1.6) Sesión 6 (2 horas)

Se terminará el ejercicio sobre detectores en cromatografía de gases y se discutirán dudas sobre inyectores y detectores en cromatografía de gases para poder preparar el examen de conocimientos mínimos.

Para el estudio de columnas en cromatografía de gases cada grupo realizará un ejercicio deductivo para aprender el uso de cada tipo de columna en distintas aplicaciones reales.

Durante esta sesión realizarán un ejercicio propuesto en la aplicación web <http://www.chromacademy.com>. Para realizar esta actividad dispondrán de toda la información recibida hasta el momento así como los catálogos con toda la información sobre las distintas columnas cromatográficas. Esta actividad la realizarán entre dos grupos.

1.7) Sesión 7 (1 hora)

Los alumnos entregarán el ejercicio sobre columnas cromatográficas y comenzarán un ejercicio similar para deducir cómo el método cromatográfico a nivel de rampas de temperatura en cromatografía de gases.

1.8) Sesión 8 (2 horas)

En la primera parte de la sesión, se realizará el test de conocimientos mínimos atendiendo a los aspectos de la cromatografía de gases. El test se realizará mediante clickers, y esta vez en modo no anónimo. La nota obtenida en este caso será individual.

Los alumnos terminarán el ejercicio sobre rampas de temperatura en cromatografía de gases y se les recordará la entrega del primer informe final.

En la segunda parte de esta sesión de dos horas se les explicarán los objetivos del segundo sub-proyecto: "*¿Qué tipo de inyector se necesitará adquirir en el laboratorio de AZTI para analizar furano en café?*". En definitiva, el objetivo principal de este sub-proyecto consiste en estudiar los distintos tipos de inyectores para cromatografía de gases que existen en el mercado, analizar sus distintas características y escoger el más adecuado de forma argumentada. Para esto, realizarán búsquedas bibliográficas mediante SciFinder que les permita obtener información sobre distintos modos de

inyección. Con la información recopilada, cada grupo escogerá un tipo de inyector y el siguiente entregable consistirá en justificar la selección y la idoneidad del mismo para el análisis en cuestión. Para llevar a cabo este proyecto utilizarán los siguientes recursos: búsquedas bibliográficas en SciFinder, la aplicación web <http://www.chromacademy.com> así como una reunión de expertos pre-doctorales y post-doctorales que se encuentran en el Departamento de Química Analítica.

1.9) Sesión 9 (1 hora)

A fin de garantizar un aprendizaje adecuado, con la información recopilada, plantearán y entregarán las preguntas que se les realizará a los expertos. Este entregable no se puntuará pero será obligatorio. A lo largo de la semana y previo a la siguiente sesión planificarán una reunión con los expertos.

1.10) Sesión 10 (2 horas)

En esta sesión entregarán el procedimiento para determinar PCBs y será puntuada de acuerdo a las rúbricas que se detallan en el Anexo I. Tendrán la posibilidad de rehacer este entregable (en el caso de que no fuera del todo correcto). Podrán utilizar las correcciones y recomendaciones planteadas en este proyecto para realizar y mejorar el siguiente en un aprendizaje continuo.

En cuanto a la sesión, esta sesión la utilizarán para trabajar la información que tienen sobre el análisis de furano así como para iniciar la presentación de este entregable.

1.11) Sesión 11 (1 hora)

Se les presentará el tercer sub-proyecto: "*Análisis de melanina en leche para niños*". El entregable consistirá en un presupuesto para dichos análisis, y teniendo en cuenta que este analito necesita un proceso de derivatización para su análisis mediante cromatografía de gases, podrán estudiar los distintos tipos de derivatización. A cada grupo se le dará un artículo, lo analizarán, lo comentarán y lo discutirán durante la sesión y prepararán una lista de reactivos y material necesario para el análisis.

Localizarán los reactivos necesarios en los catálogos de reactivos y se pondrán en contacto con los comerciales para obtener un presupuesto estimativo de los mismos.

1.12) Sesión 12 (2 horas)

Durante las dos horas de esta sesión cada grupo dispondrá del tiempo necesario para preparar tanto la presentación (referente al proyecto del análisis de furano) como la preparación del presupuesto (referente al proyecto del análisis de melamina). Durante esta sesión por tanto tendrán la opción de plantear preguntas y resolver dudas debido a que en el plazo de una semana entregarán ambos entregables.

Comenzarán con el siguiente sub-proyecto dedicado a: "*Determinación de clenbuterol, salbutamol y cimaterol en carne*". Este proyecto es similar al proyecto anterior sobre el análisis de PCBs en peces con la particularidad de que cambia la técnica de análisis, cromatografía de líquidos en lugar de cromatografía de gases. La metodología de trabajo será similar a la trabajada anteriormente: los conceptos teóricos se trabajarán mediante puzzles y el entregable consistirá en la elaboración crítica y argumentada de

las distintas etapas que conforman el procedimiento analítico. Se les proporcionará a cada grupo el artículo sobre el que trabajarán. Durante esta sesión leerán el artículo y mediante una sesión de pósters expondrán las etapas necesarias que han identificado para el análisis de los compuestos mediante cromatografía de líquidos.

Trends in Analytical Chemistry, Vol. 29, No. 11, 2010

Trends

Analytical methods and recent developments in the detection of melamine

Fengxia Sun, Wei Ma, Liguang Xu, Yinyue Zhu, Liqiang Liu, Chifang Peng, Libing Wang, Hua Kuang, Chuanlai Xu

Melamine (MEL) is an emerging contaminant in milk, infant formula and pet food, and is the subject of much recent research. This review focuses on analytical methods for detecting MEL residue.

We present and discuss the advantages, the disadvantages and the applicability of methods, including common techniques [e.g., capillary electrophoresis, high-performance liquid chromatography (HPLC), LC with mass spectrometry (LC-MS), LC with tandem (LC-MS²), gas chromatography with MS (GC-MS), matrix-assisted laser desorption/ionization MS (MALDI-MS), nuclear magnetic resonance spectroscopy, vibrational spectroscopy, chemiluminescence analysis and immunoassay] and several novel detection methods.

We propose that the new generation of analytical methods for detecting MEL requires development of powerful analytical devices, combination of multiple techniques, and application of new materials.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Capillary electrophoresis; Chemiluminescence; Contaminant; Food adulteration; Gas chromatography; Immunoassay; Liquid chromatography; Mass spectrometry; Melamine residue; Nuclear magnetic resonance

JOURNAL OF
**AGRICULTURAL AND
FOOD CHEMISTRY**
ARTICLE

J. Agric. Food Chem. **2009**, *57*, 11075–11080 **11075**
DOI:10.1021/jf902771q

Determination of Residues of Cyromazine and Its Metabolite, Melamine, in Animal-Derived Food by Gas Chromatography–Mass Spectrometry with Derivatization

XINLE ZHU,^{*,†} SHUHUAI WANG,[†] QI LIU,[†] QIAN XU,[†] SHIXIN XU,[†] AND HUILAN CHEN[§]

[†]China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, People's Republic of China, and [§]Jiangsu Entry–Exit Inspection and Quarantine Bureau of the People's Republic of China, Nanjing 210001, People's Republic of China

A gas chromatography–mass spectrometric (GC-MS) method was established for the determination of cyromazine and its metabolite, melamine, in animal-derived food. Chicken and tilapia muscle samples were spiked with ¹⁵N₃-melamine, extracted with an acidic acetonitrile/water solution, and defatted with dichloromethane. Egg and milk samples were directly extracted with 3% trichloroacetic acid. The extracts were purified using mixed cation-exchange cartridges, derivatized with *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide, and detected by GC-MS. Cyromazine and melamine were quantified by external standard methods except for the determination of melamine in animal muscle, which used an internal standard method. Recoveries ranged from 75.0 to 110.0%, and relative standard deviations were <15.0%. In animal muscle the limits of quantification (LOQs) were 20 µg/kg and the limits of detection (LODs) were 10 µg/kg for cyromazine and melamine. In milk and eggs the LOQs were 10 µg/kg and the LODs were 5 µg/kg for both analytes.

KEYWORDS: Gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS); animal-derived food; cyromazine; metabolite; melamine; residues

Figura 1. Detalle de los artículos científicos para realizar los sub-proyectos.

Simultaneous Determination of Melamine, Ammelide, Ammeline, and Cyanuric Acid in Milk and Milk Products by Gas Chromatography-tandem Mass Spectrometry

HONG MIAO^a, SAI FAN^{a,*}, YONG-NING WU^{a,*}, LEI ZHANG^a, PING-PING ZHOU^a, JING-GUANG LI,
HUI-JING CHEN^a, AND YUN-FENG ZHAO^{a,*}

^a*Institute of Nutrition and Food Safety, Chinese Centre for Disease Control and Prevention, Beijing 100050, China;*
^b*College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094, China*

Objective To develop an analytical method for simultaneously qualitative and quantitative determination of melamine and triazine-related by-products including ammelide, ammeline, and cyanuric acid in milk and milk products by gas chromatography-tandem mass spectrometry (GC-MS/MS). **Methods** Melamine and triazine-related by-products namely ammelide, ammeline and cyanuric acid in the samples were extracted in a solvent mixture of diethylamine, water, and acetonitrile (10:40:50, *V/V/V*). After centrifugation, an aliquot of the supernatant was evaporated to dryness under a gentle stream of nitrogen gas, and then melamine and triazine-related by-products were derivatized using BSTFA with 1% TMCS. The derivatives of melamine and its analogues were determined by gas chromatography/ tandem mass spectrometry using multiple reactional monitoring (MRM) with 2, 6-Diamino-4-chloropyrimidine (DACP) being used as an internal standard. **Results** The linear detectable ranges were from 0.004 mg/kg to 1.6 mg/kg for melamine, ammelide, ammeline, and cyanuric acid with a correlation coefficient no less than 0.999. The recovery rates of the four compounds in spiked blank milk powder at concentrations 0.5, 1, 2 mg/kg were between 61.4%-117.2%, and the relative standard deviation was no more than 11.5% (*n*=6). The detection limits of melamine, ammelide, ammeline and cyanuric acid in milk powder were 0.002 mg/kg with a ratio of signal to noise of 3. **Conclusion** This GC-MS/MS method for simultaneous determination of melamine, ammelide, ammeline, and cyanuric acid in milk and milk products is sensitive and specific.

Key words: Melamine; Ammelide; Ammeline; Cyanuric acid; GC-MS/MS; Milk products

Figura 2. Detalle del artículo científico para realizar el sub-proyecto: análisis de melamina en leche.

1.13) Sesión 13 (1 hora)

Los alumnos trabajarán sobre un ejercicio similar al trabajado en detectores para cromatografía de gases los detectores en cromatografía líquida (la información la pueden obtener de la aplicación web: <http://www.chromacademy.com>). A modo de trabajo individual cada miembro del grupo preparará la información necesaria para pasarla al resto del grupo.



A modo de trabajo personal realizarán los test de conocimientos mínimos que se encuentran en la aplicación web: <http://www.chromacademy.com>.

Journal of Chromatography B, 879 (2011) 90–94

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography B

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chromb

Determination of clenbuterol in porcine tissues using solid-phase extraction combined with ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction and HPLC–UV detection

Baomi Liu^a, Hongyuan Yan^{a,*}, Fengxia Qiao^b, Yuru Geng^a

^a College of Pharmacy, Hebei University, Wuzhidong Road 180#, Baoding 071002, China
^b Department of Chemistry, Baoding University, Baoding 071000, China

Figura 3. Detalle del artículo científico para realizar el sub-proyecto: análisis de clenbuterol en carne.

1.14) Sesión 14 (2 horas)

Al comienzo de esta sesión entregarán el presupuesto para el análisis de melanina y presentarán el tipo de inyector escogido para el análisis de melanina. Durante la presentación un grupo presentará su proyecto y el resto de la clase actuará como tribunal realizando preguntas y valorando de forma crítica el trabajo expuesto (ver rúbricas descritas en el Anexo I). La presentación y preguntas por grupo tendrán una duración máxima de 15 minutos. Como son 4 grupos de 3 miembros, esta parte durará 120 minutos.

1.15) Sesión 15 (1 hora)

Esta sesión se utilizará para el estudio autónomo del alumno sobre fase reversa en cromatografía de líquidos.

1.16) Sesión 16 (2 horas)

Test individual de conocimientos mínimos mediante clickers (15 minutos) sobre detectores en cromatografía líquida.

El resto de la sesión estudiarán la separación en fase reversa y los gradientes en grupo mediante los ejercicios planteados en la aplicación web: <http://www.chromacademy.com>.

Comenzarán a preparar el informe del entregable sobre el proyecto debido a que tendrán que entregarlo en el plazo de una semana. Para la evaluación del informe se utilizará la rúbrica que se detalla en el Anexo I.

1.17) Sesión 17 (1 hora)

Durante esta sesión estudiarán la fase móvil, los inyectores y las bombas en cromatografía líquida en grupo mediante los ejercicios planteados en la aplicación web: <http://www.chromacademy.com>.

1.18) Sesión 18 (2 horas)

El último proyecto que se realizará mediante la metodología PBL consistirá en resolver determinados problemas relacionados con métodos cromatográficos ya puestas en marcha. Para ello, se les proporcionarán los cromatogramas en los que se observan problemas, diferentes para cada grupo. El objetivo de este proyecto consiste en detectar los problemas asociados a esos cromatogramas e intentar solventarlos. Cada grupo expondrá el problema concreto que ha detectado al resto de la clase e intentará argumentar críticamente cuál es una solución posible para solventarlo. Una vez más, el material necesario para realizar esta tarea la pueden encontrar en la aplicación web: <http://www.chromacademy.com> además de:

- S. Kromidas, Practical problem solving in HPLC, Wiley-VCH, Weinheim, 2000
- S. Kromidas, More practical problem solving in HPLC, Wiley-VCH, Weinheim, 2002.
- V.R. Meyer, Pitfalls and errors of HPLC in pictures. 2. argitalpena., -Wiley-VCH, Weinheim, 2006.

1.19) Sesión 19 (1 hora)

Entrega del informe sobre el análisis de clenbuterol en carne. Los criterios de evaluación están detallados en el Anexo I. Durante esta sesión seguirán detectando los problemas cromatográficos e intentando resolverlos.

Además, prepararán la exposición de los problemas cromatográficos detectados y las posibles soluciones planteadas. Del mismo modo que en la presentación anterior, un grupo actuará como presentador del problema y el resto de grupos como tribunal crítico del trabajo expuesto (consultar rúbricas detalladas en el Anexo I).

1.20) Sesión 20 (2 horas)

Durante esta sesión expondrán a sus compañeros los problemas cromatográficos detectados y las posibles soluciones planteadas. Del mismo modo que en la presentación anterior, un grupo actuará como presentador del problema y el resto de grupos como tribunal crítico del trabajo expuesto (consultar rúbricas detalladas en el Anexo I). Esta sesión la deberían utilizar para plantear las preguntas y resolver las dudas.

1.21) Sesión 21 (1 hora)

Test de conocimientos mínimos sobre los problemas que se pueden detectar en distintos métodos cromatográficos.

1.22) Sesiones 22 a 30

Las últimas sesiones se impartirán mediante la metodología clásica basada en 2 horas dedicadas a clases magistrales y 1 hora dedicada a seminario por semana.

La Tabla 1 resume las distintas sesiones y sus actividades distribuidas en el calendario de la asignatura impartida en el segundo cuatrimestre del curso académico 2011-2012. La Tabla recoge tanto las horas presenciales como las no-presenciales.

Tabla 1. – Planificación diaria (las sesiones de los lunes son de 1 hora y las de los jueves de 2 horas). P=presencial, NP=no presencial.

Semana/día					
1	Enero 23	Enero 24	Enero 25	Enero 26	Enero 27
P	Presentación asignatura Formación de grupos Leer el artículo de El Correo (45 min)			Test conocimientos previos – “clicker” en modo anónimo (15 min) Parámetros cromatográficos Puzle (120 min)	
NP	Planificar las horas de trabajo en grupo (30 min)			Ejercicios en grupo para entregar próxima semana (4.0 horas)	
2	Enero 30	Enero 31	Febrero 1	Febrero 2	Febrero 3
P	Cromatografía de gases – Método para determinar PCBs en peces Definir los objetivos de aprendizaje (15 min) Scifinder (45 min)		Parámetros cromatográficos – E2 Entregar el entregable	Cromatografía de gases – Método para determinar PCBs en peces Poster (30 min) Inyectores en GC (90 min)	
NP	Leer el artículo – trabajo individual (2 horas)			Preparar información para reunión de expertos y para los miembros del grupo – trabajo individual (2.5 horas)	
3	Febrero 6	Febrero 7	Febrero 8	Febrero 9	Febrero 10
P	Cromatografía de gases – Método			Cromatografía de gases – Método para determinar PCBs	

	para determinar PCBs en peces Ejercicios dirigidos inyectores y detectores en GC (60 min)			en peces Discusión sobre inyectores y detectores (60 min) Ejercicio deductivo columnas en GC (60 min)	
NP	Trabajar sobre el material que tienen para realizar el examen de conocimientos mínimos (2.5 horas)			Preparar información para la reunión de expertos y para los demás miembros del grupo – trabajo individual (1.5 horas)	
4	Febrero 13	Febrero 14	Febrero 15	Febrero 16	Febrero 17
P	Cromatografía de gases – Método para determinar PCBs en peces Rampas de temperatura en GC (60 min)			Examen de conocimientos mínimos (30 min) Cromatografía de gases – Método para determinar PCBs en peces (30 min) Cromatografía de gases – ¿Qué inyector se a de comprar para analizar furano en café? Definir los conceptos de aprendizaje Scifinder (60 min)	
NP	Ejercicios dirigidos sobre GC – trabajo en grupo (60 min)			Leer la información sobre el inyector escogido – (120 min)	
5	Febrero 20	Febrero 21	Febrero 22	Febrero 23	Febrero 24
P	Cromatografía de gases – Qué inyector se a de comprar para			Cromatografía de gases – <i>Método para determinar PCBs</i>	

	analizar furano en café? Preparar las preguntas para los expertos (60 min)			<i>en peces</i> Entregar el entregable Cromatografía de gases – <i>¿Qué inyector se ha de comprar para analizar furano en café?</i> Preparar la presentación sobre la información recogida sobre el inyector escogido. La presentación la realizarán AL cabo de 15 días. (120 min)	
NP	Reunión con los expertos de tercer ciclo – Trabajo en grupo (60 min) Preparar el protocolo de laboratorio donde se especifican los pasos concretos del análisis mediante cromatografía de gases – trabajo en grupo (Entregable final) (4 horas)			Preparar la presentación sobre los inyectores empleados para el análisis de furano (120 min)	
6	Febrero 27	Febrero 28	Febrero 29	Marzo 1	Marzo 2
P	<i>Cromatografía de gases – Análisis de melamina en leche de niños</i> Definir los objetivos de aprendizaje(15 min) Leer el artículo y realizar la lista con los reactivos. (45 min)			<i>Cromatografía de gases – Qué inyector se a de comprar para analizar furano en café?</i> Preparar Entregable (60 min) <i>Cromatografía de gases – Análisis de melamina en leche de niños</i>	

				Preparar entregable (60 min)	
NP	Buscar reactivos en los catálogos y contactar con los comerciales (entregable) (2 horas)				
7	Marzo 5	Marzo 6	Marzo 7	Marzo 8	Marzo 9
	<p><i>Cromatografía de líquidos – fase reversa – Determinación de β-agonistas como Clenbuterol, salbutamol y cimaterol en carne</i></p> <p>Definir los objetivos de aprendizaje (15 min)</p> <p>Distribuirles un artículo y comentarlo (45 min). A cada grupo se le proporciona un artículo para que en el entregable final realicen corrección por pares.</p>			Entregable de melamina y presentaciones de análisis de furano	
	Preparar los entregables furano y melamina (5 horas)			Trabajar sobre la información del puzle (3.5 horas)	
8	Marzo 12	Marzo 13	Marzo 14	Marzo 15	Marzo 16
P	<p><i>Cromatografía de líquidos – fase reversa – Determinación de β-agonistas como Clenbuterol, salbutamol y cimaterol en carne</i></p> <p>Estudio autónomo sobre fase reversa mediante Chromacademy (60 min)</p>			<p>Examen conocimientos mínimos de detectores en LC</p> <p><i>Cromatografía de líquidos – fase reversa – Determinación de Clenbuterol, salbutamol y cimaterol en carne</i></p> <p>Trabajo en grupo –fase reversa</p>	

				y gradiente (entregables) (60 min) Empezar a preparar Entregable clenbuterol (60 min)	
NP	Trabajar sobre los tests de Chromacademy para realizar el examen de conocimientos mínimos - - trabajo individual (6 horas)				
9	Marzo 19	Marzo 20	Marzo 21	Marzo 22	Marzo 23
P	Cromatografía de líquidos – fase reversa – Determinación de Clenbuterol, salbutamol y cimaterol en carne Trabajo en grupo – fase móvil, bombas e inyectores (entregables) (60 min)			Búsqueda de errores en métodos analíticos Continuar solucionando los problemas analíticos.	
NP	Preparar entregables (4.5 horas)				
10	Marzo 26	Marzo 27	Marzo 28	Marzo 29	Marzo 30
P	Entregar del entregable sobre análisis de clenbuterol Búsqueda de errores en métodos analíticos Continuar solucionando los			Búsqueda de errores en métodos analíticos Presentación de un grupo a otro lo problemas resueltos. (60 min)	

	problemas analíticos. (60 min)				
NP	Trabajar sobre problemas en cromatografía (6 horas)			Estudiar para conocimientos mínimos en errores (3 horas)	
11	Abril 2	Abril 3	Abril 4		
P	Entregable E14 (1 hora)				
12	Abril 16	Abril 17	Abril 18	Abril 19	Abril 20
P	Magistral Fase Normal			Examen conocimientos mínimos Magistral: fase normal Seminario fase normal (leer un artículo: fase normal e HILIC, contestar preguntas, entregable)	
NP				Trabajo individual – estudio (1.0 hora)	
13	Abril 23	Abril 24	Abril 25	Abril 26	Abril 27
P	Magistral Cromatografía iónica			Magistral Cromatografía iónica Seminario: Cromatografía iónica (leer un artículo: intercambio iónico e pares de iones, contestar preguntas, entregable)	
NP				Trabajo individual – estudio (1.0 hora)	

14	Abril 30	Mayo 1	Mayo 2	Mayo 3	Mayo 4
P	Magistral otras técnicas cromatográficas			Magistral electroforesis capilar	
NP				Trabajo individual – estudio (1.0 hora)	
15	Mayo 7	Mayo 8	Mayo 9	Mayo 10	Mayo 11
P	Magistral Espectrometría de masas			Magistral Espectrometría de masas Seminario MS (artículo sobre determinación de pesticidas, discusión, entregable)	
NP				Trabajo individual –(1.5 horas)	

2) Lista de entregables

La Tabla 2 recopila los entregables que deben completar en cada sub-proyecto así como las capacidades desarrolladas en cada una de ellas.

3) Lista de recursos

A continuación se detallan los recursos que emplearán en los distintos sub-proyectos de la asignatura:

- 1) www.chromacademy.com ; En esta página web encontrarán la información necesaria sobre los aspectos teóricos y prácticos de las técnicas cromatográficas así como ejercicios de autoevaluación.
- 2) Artículos Científicos publicados en Revistas Indexadas. En la descripción de las distintas sesiones se han detallado los artículos que se emplearán para cada actividad.
- 3) Libros
- 4) D.A. Skoog y J.J. Leary, "Principios de Análisis Instrumental" 5ª edición, Mcgraw-Hill, Mexiko, 2001.
- 5) H.H. Willard, L.L. Merrit, J.A. Dean y F.A. Settle, "Métodos Instrumentales de Análisis", Grupo editorial Iberoamericana, 1991.
- 6) R. Cela, R.A. Lorenzo y M. C. Casais, "Técnicas de Separación en Química Analítica" Ed. Síntesis, Madrid, 2002
- 7) C. F. Poole, "The Essence of Chromatography", Elsevier, Amsterdam, 2003
- 8) S. Kromidas, Practical problem solving in HPLC, Wiley-VCH, Weinheim, 2000
- 9) S. Kromidas, More practical problem solving in HPLC, Wiley-VCH, Weinheim, 2002.
- 10) D. Rood, The troubleshooting and maintenance guide for gas chromatographers. 4. argitalpena, Wiley-VCH, Weinheim, 2007
- 11) V.R. Meyer, Pitfalls and errors of HPLC in pictures. 2. argitalpena., - Wiley-VCH, Weinheim, 2006
- 12) R.I. Grob, E.F. Barry (Ed.), modern practice of gas chromatography, 4. edición, Wiley-Intescience, John Wiley & sons Inc., New Jersey, 2004.
- 13) Scifinder
- 14) Catálogos
- 15) Expertos en la materia (Estudiante de tercer ciclo y comerciales)

Tabla 2. – Lista de entregables de las actividades a desarrollar y la valoración y competencias adquiridas en cada una de ellas.

Proyecto	Actividad	Retro-alimentación	Evaluación	Competencia desarrollada
Inicio Metodología	Examen de conocimientos previos		No puntuable	
	Parámetros cromatográficos (E1)	Sí	5%	I, II, IV,V
Determinación de PCBs en peces	Sesión de Pósters	Sí	No puntuable	V
	Ejercicio sobre inyectores en GC	Sí	No puntuable	I, II, IV,V
	Ejercicio sobre detectores GC	Sí	No puntuable	I, II, IV,V
	Ejercicio sobre columnas GC (E2)	Sí	5%	I, II, IV,V
	Ejercicio sobre programa de temperaturas en GC (E4)	Sí	5%	I, II, IV,V
	Examen sobre conocimientos mínimos en GC (E3)	Sí	10%	I, II, IV
	Informe sobre método de análisis de PCBs en peces (E5)	Sí	7.5%	IV, V
Determinación de Furano en café	Cuestionario para expertos	Sí	No puntuable	V
	Presentación del proyecto de compra de un inyector para análisis de furano en café (E6)	Sí	5%	I, IV, V
	Tribunal en la presentación de un inyector para el análisis de furano en café (E7)	Sí	5%	I, V
Melamina en	Presupuesto para análisis de melamina en	Sí	5%	I

leche	leche (E8)			
Determinación de clenbuterol en carne	Sesión de Pósters	Sí	No puntuable	V
	Ejercicio sobre columnas en LC (E9)	Sí	5%	I, II, IV, V
	Ejercicio sobre detectores en LC (E10)	Sí	5%	I, II, IV,V
	Conocimientos mínimos en LC (E11)	Sí	10%	I, II, IV, V
	Ejercicio sobre Fase Reversa (E12)	Sí	5%	I, II, IV,V
	Ejercicio sobre gradiente (E13)	Sí	5%	I, II, IV,V
	Ejercicio sobre inyectores, bombas y fase móvil en LC (E14)	Sí	5%	I, II, IV,V
	Informe sobre análisis de clenbuterol en carne (E15)	Sí	7.5%	IV, V
Resolución de problemas en Cromatografía	Examen de conocimientos mínimos en problemas en LC (E16)	Sí	5%	III
	Presentación de la resolución de algunos problemas en análisis por LC (E17)	Sí	5%	III, IV

I. Saber elegir la técnica de separación y detección adecuada para la resolución de un problema analítico concreto; II. Capacidad de desarrollar y aplicar métodos cromatográficos; III. Capacidad de solucionar problemas cromatográficos cotidianos; IV Capacidad de trabajo en equipo; V. Buscar, entender, explicar y discutir información en idioma nativo y extranjero (inglés)

4) Sistema de Evaluación

El sistema de evaluación consistirá por una parte en la nota de la metodología PBL y por otra en la metodología clásica por lo que la distribución de las notas sería la siguiente: las actividades desarrolladas mediante la metodología PBL (50%); prácticas (30%); los seminarios impartidos mediante la metodología clásica (5%) y el examen final (10%). Todas las actividades y entregables de los distintos sub-proyectos no se evaluarán del mismo modo aún así será necesario obtener una nota mínima de 4 en todas ellas para aplicar la media excepto en los test de conocimientos mínimos que la nota mínima será de 5. La nota de cada una de ellas se detalla en la Tabla 2.

ANEXO. RÚBRICAS.

Tabla Anexa 1. Rúbricas para evaluar los esquemas (Entregables E4 y E11) – Todos los apartados puntúan igual. 4=8-10; 3=7-8; 2=5-6; 1=0-4

Criterio	4	3	2	1
Esquema	Las etapas de los procedimientos se encuentran claros y ordenados. El procedimiento se entiende al detalle.	Las etapas de los procedimientos se encuentran ordenados, pero no se entienden con una primera lectura.	Los procedimientos no siguen un orden lógico de planteamiento y se tienen dificultades para entenderlo.	Las etapas de los procedimientos no están bien descritos.
Conceptos Científicos	La selección de las variables es adecuada y deja entrever el manejo y comprensión avanzada de los conceptos científicos.	La selección de las variables es adecuada y deja entrever el manejo y comprensión adecuada de los conceptos científicos.	El trabajo muestra una baja comprensión sobre los conceptos científicos trabajados.	El trabajo muestra una gran carencia de comprensión sobre los conceptos científicos trabajados.
Aspecto	Se utilizan títulos y subtítulos para detallar los distintos procesos. Esta escrito con un procesador de texto.	Se utilizan títulos y subtítulos para detallar los distintos procesos. No está escrito con un procesador de texto.	El formato no ayuda a la fácil lectura de los procesos detallados.	El trabajo presentado parece un boceto.

Tabla Anexa 2. Rúbricas para evaluar las presentaciones – (Entregables E7 y E12) – Todos los apartados puntúan igual y lo cumplimentarán tanto el profesor como el alumno que actúa como miembro del tribunal – Como nota final se tomará la nota media de ambas evaluaciones. 4=8-10; 3=7-8; 2=5-6; 1=0-4

Criterio	4	3	2	1
Tono	Se utiliza el tono adecuado durante toda la presentación facilitándolo.	En general, se utiliza bien el tono adecuado durante toda la presentación.	En general, no se utiliza bien el tono adecuado durante toda la presentación.	El tono utilizado no facilita seguir adecuadamente la presentación.
Paradas	Se han realizado 2 paradas o más para facilitar la comprensión de la presentación.	Se ha realizado una única parada para facilitar la comprensión de la presentación.	Han realizado paradas pero no de un modo adecuado.	No se ha realizado ninguna parada.
Comprensión	Han respondido de un modo adecuado todas las preguntas planteadas.	Han respondido de un modo adecuado casi todas las preguntas planteadas.	No han respondido de un modo adecuado casi ninguna de las preguntas planteadas.	No han respondido de un modo adecuado ninguna de las preguntas planteadas.
Preparación	El alumno está totalmente preparado y lo ha planificado.	El alumno está preparado pero necesitaba una mayor planificación.	El alumno necesitaba una mayor preparación y planificación.	El alumno no ha preparado la planificación.
Tiempo	Entre 10 y 15 minutos	Entre 15 y 20 minutos	Entre 5 y 10 minutos	Más de 20 minutos o menos de 5 minutos
Vocabulario	Utiliza un vocabulario científico extenso describiendo aquellas palabras que no pueda entender el público.	Utiliza un vocabulario científico extenso pero no describe el vocabulario nuevo.	Utiliza un vocabulario científico adecuado pero no describe el vocabulario nuevo.	No utiliza un vocabulario científico adecuado.
Actitud	Se encuentra seguro y tranquilo dirigiéndose al público.	Se encuentra seguro dirigiéndose al público.	En ocasiones se encuentra seguro dirigiéndose al público.	No se encuentra seguro ni se dirige al público.

Tabla Anexa 3. Rúbricas para evaluar al oyente actuando como miembro del tribunal en las presentaciones realizadas por sus compañeros (Entregables E8 y E13) – Todos los apartados igual. Lo evaluará el profesor. 4=8-10; 3=7-8; 2=5-6; 1=0-4

Criterio	4	3	2	1
Atención	Ha estado atento durante toda la presentación tomando apuntes.	Ha estado atento durante casi toda la presentación tomando apuntes.	Ha estado escuchando la presentación pero no ha tomado apuntes.	No ha mostrado interés durante la presentación.
Sugerencias	Ha realizado sugerencias interesantes y detalladas a los presentadores.	Ha realizado alguna sugerencia interesante a los presentadores.	Las sugerencias realizadas no han sido relevantes.	Las sugerencias realizadas no tenían sentido crítico alguno.
Preguntas	Ha realizado preguntas interesantes y detalladas a los presentadores.	Ha realizado alguna pregunta interesante a los presentadores.	Las preguntas realizadas no han sido relevantes.	Las preguntas realizadas no tenían sentido crítico alguno.

Tabla Anexa 4. Criterios de evaluación para los presupuestos entregados (Entregable E6) – Todos los apartados puntúan igual. 4=8-10; 3=7-8; 2=5-6; 1=0-4

Criterio	4	3	2	1
Reactivos	La lista está bien realizada.	En la lista se encuentra la mayoría de los reactivos.	Faltan numerosos reactivos en la lista.	Faltan la mayoría de los reactivos.
Presupuesto	El presupuesto es claro. Ha consultado a más de un distribuidor (tanto el precio como el plazo de entrega).	El presupuesto es claro pero sólo ha consultado a un único distribuidor (tanto el precio como el plazo de entrega).	Presupuesto desordenado. Sólo ha consultado un único distribuidor y no ha tenido en cuenta el plazo de entrega.	Presupuesto incoherente.

Tabla Anexa 5. Rúbricas para evaluar el cuestionario realizado a los expertos de tercer ciclo (Entregable E5). 4=8-10; 3=7-8; 2=5-6; 1=0-4

Criterio	4	3	2	1
Preguntas	Ha realizado preguntas interesantes y detalladas a los presentadores.	Ha realizado alguna pregunta interesante a los presentadores.	Las preguntas realizadas no han sido relevantes.	Las preguntas realizadas no tenían sentido crítico alguno.



Olivares, M., Zuloaga, O. (2012). ¿Son fiables los productos que encontramos en los supermercados?
– IKD baliabideak 4 -<http://cvb.ehu.es/ikd-baliabideak/ik/olivares-zuloaga-04-2012-ik.pdf>



Reconocimiento – No Comercial – Compartir Igual (by-nc-sa): No se permite un uso comercial de la obra original ni de las posibles obras derivadas, la distribución de las cuales se debe hacer con una licencia igual a la que regula la obra original.