

40 2ci



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**DETERMINACION DE TIAMINA Y RIBOFLAVINA
EN PAN DE CAJA**



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
Q U I M I C O
P R E S E N T A :
ENGRACIA RUIZ CARRILLO

México, D. F.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1990



Universidad Nacional
Autónoma de México

UNAM



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

- I. INTRODUCCION**
- II. OBJETIVO**
- III. GENERALIDADES**
- IV. METODOLOGIA**
- V. RESULTADOS**
- VI. DISCUSION**
- VII. CONCLUSIONES**
- VIII. BIBLIOGRAFIA**

I. INTRODUCCION

Desde la antigüedad la humanidad ha vivido con la constante preocupación de su alimentación; el hombre prehistórico llevaba una vida errante, pues se dedicaba a buscar plantas y animales para alimentarse. Con el advenimiento de la agricultura, cambió su vida de nómada a sedentaria; pero siguió con la misma preocupación, pues pronto aprendió que la alimentación era la base de su desarrollo tanto físico como intelectual, y que si no satisfacía esta primera necesidad no lograría satisfacer debidamente cualquier otra.

Aún en pleno siglo XX, a pesar del desarrollo alcanzado, de los avances científicos y los desarrollos tecnológicos, no ha podido el hombre resolver satisfactoriamente el problema de una adecuada alimentación, ya que las dos terceras partes de la población mundial consumen una dieta incorrecta.

Cálculos conservadores demuestran que en el mundo existen 460 millones de personas con hambre permanente y que por lo menos el 40% son niños, toda esta gente pertenece a los sectores marginados de las grandes ciudades y a los sectores rurales.¹³

El economista Malthus exponía en su ensayo sobre el principio de la población que "los medios de existencia aumentan en progresión aritmética, en tanto que la población crece en progresión geométrica".¹⁰ Asimismo sus adeptos -- tratan de demostrar que la sobrepoblación del globo terrestre es la única causa de todas las desgracias sociales.

Desde este punto de vista no es posible explicar de que un continente como Africa, típico por el lento crecimiento de su población posea el más bajo nivel de vida, o que Kenya que tiene una densidad de población 21 veces menor que Inglaterra, cuente con una renta por cápita 16 veces menor que ese país, al igual que Bolivia donde la densidad de población y renta por cápita son res

pectivamente 35 y 7 veces menores que en los Estados Unidos (la renta caracteriza el grado de riqueza del país, así como el bienestar material del pueblo).

Malthus en su teoría plantea el crecimiento de la población como un problema aislado, sin tomar en cuenta que está estrechamente relacionado con las condiciones económicas y políticas; así mismo, no toma en cuenta los recursos de la naturaleza, y subestima al hombre respecto a su conocimiento de la misma para su beneficio y aprovechamiento.³⁰

Datos oficiales de la FAO muestran que sólo el 17% de la población mundial ingiere más de 30g. de proteína de origen animal por día (cantidad juzgada suficiente), mientras que un 25% consume apenas de 15g. a 30g. y el 58% -- restante dispone de una cantidad inferior a los 15g. diarios. La falta de proteínas y otros nutrimentos, tales como sales minerales y vitaminas en las dietas, se manifiestan en forma bien caracterizada por síndromes clínicos; marasmo, kwashiorkor, pelagra, beriberi, escorbuto, etc. Las carencias son principalmente el resultado de una alimentación errónea a lo largo de la vida.

Siempre ha existido un desequilibrio social; la miseria y el hambre han sido compañeras habituales, contrarrestando con el lujo y la riqueza.^{32 30} Y si bien es cierto que la naturaleza ofrece recursos enormes para satisfacer las necesidades de subsistencia de las poblaciones, es preciso que se tome conciencia de estos hechos y que la repartición de la riqueza sea más justa y equitativa. Se calcula que sólo el 10% de las áreas cultivables en el mundo están en producción, quedando aún más grandes reservas por explotar, tal aseveración fue hecha por los científicos que participaron en el 17o. Congreso Internacional de Geografía al valorar la capacidad mundial de producción de alimentos a través del aprovechamiento de mayores áreas de cultivo y del mejoramiento de técnicas agrícolas. A través de este mejoramiento es posible intensificar la

producción agrícola; lo que significa que la desnutrición no es producto de la pobreza de los suelos; la desnutrición es ante todo producto de una mala distribución, y de una deficiente planificación de la economía. Si se observa - las áreas donde existe una deficiente alimentación fácilmente se puede notar que pertenecen a los lugares que hasta hace poco vivieron o viven aún bajo un régimen colonialista como Asia, Africa y América Latina; sitios en los cuales la ingestión de una dieta inadecuada coincide con su elevado aumento de población y su pobreza. 15

A pesar del aumento de la producción agrícola, a partir de la última década las reservas de alimentos han disminuido notablemente. Analizando el -- problema se observa que el aumento en la demanda de alimentos corresponde a: un aumento en la demanda de cereales para uso forrajero; al incremento de la fabricación de productos suntuarios que tienen alto precio⁵ (productos que serán destinados a sociedades en auge). La disminución de reservas se debe a: una serie de condiciones climatológicas adversas, como intensas sequías sobre todo en zonas semiáridas, que han menguado la producción de alimentos, y a la escasez de energéticos, ya que el principal material crudo utilizado en la -- agricultura moderna de los Estados Unidos y demás países desarrollados es el petróleo, producto natural no renovable, siendo la agricultura dependiente de la energía, el costo de la producción también tiende a elevarse al parejo del incremento de los costos de combustible. Se tiene la seguridad de que las -- fuentes de energía tradicionales son escasas y su precio se ha elevado mucho, por lo que se debe pensar en otras fuentes de energía, pues resulta antieconómico invertir 1 Kcal. de combustible para producir una cantidad de maíz que -- proporcione 2.8 Kcal. ³⁶ 34

Toda esta serie de factores ha provocado un alza en los precios de los - alimentos, poniéndolos cada vez más fuera del alcance de las gentes de esca--

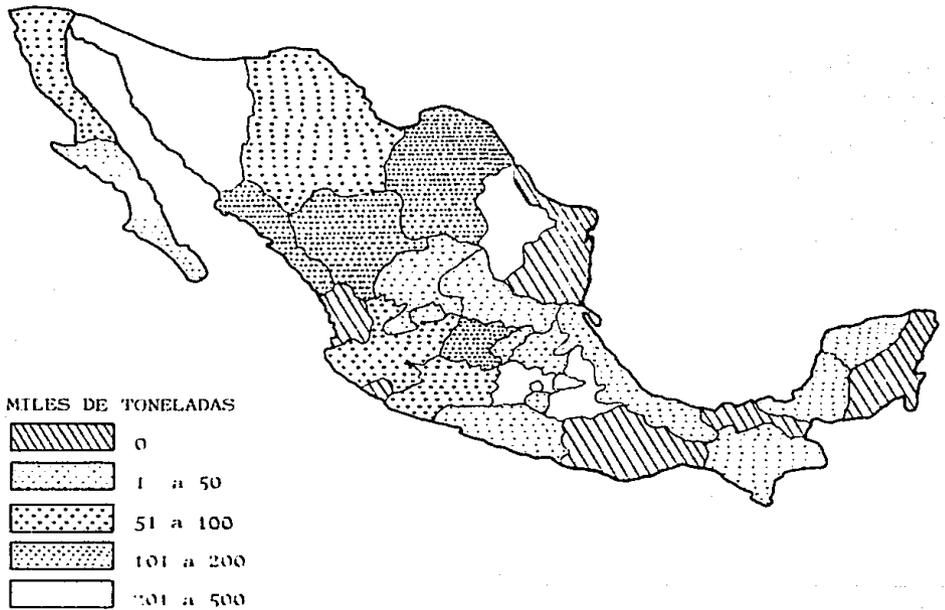
ses recursos económicos.

No se puede negar la importancia del ritmo de crecimiento de la población mundial, la cual en 1975 fue de 3,400 millones de personas, con un incremento semanal de 1.200,000 personas, para 1981 se tiene una población de 5,000 millones de habitantes y para el año 2000 tendrá de 6,000 a 8,000 millones de personas (de este acelerado crecimiento demográfico, corresponde gran parte a los países en desarrollo), y los aspectos sociales e históricos tales como el bajo nivel de agricultura de los países en desarrollo y su penoso estado de economía. Se concluye que la situación se ha de agravar aún más en un futuro no muy lejano, pues como señalara Boyd-Orr "La producción de alimentos no ha alcanzado jamás su pleno desarrollo porque la civilización occidental se ha propuesto como finalidad de la producción no crear la cantidad de alimentos indispensable para satisfacer las necesidades de la humanidad, sino la producción de alimentos que se puedan vender ventajosamente".

En los países en desarrollo predomina el consumo de productos de origen vegetal sobre todo las gramíneas. Dependiendo de cada región el alimento básico en arroz, trigo, maíz, etc. La producción anual de cereales en México es de 2.320 millones de toneladas, 29 toneladas por cada millón de habitantes (cantidad probable).

Se manifiesta una situación contrastante donde por un lado las ciudades gozan de los privilegios de la urbanización y una mejor alimentación, y por el otro los sectores rurales y marginados carecen de esos privilegios. Por ejemplo el consumo de trigo en México es el que se observa en el siguiente mapa.¹

1
CONSUMO ANUAL DE TRIGO SEGUN ENTIDAD FEDERATIVA 1986.



II. OBJETIVO

El objetivo de este trabajo se consideró importante debido a que en México, la incidencia de enfermedades por deficiencia de vitaminas es muy frecuente, principalmente por deficiencia de vitaminas A, B₁, B₂, B₆, en los siguientes estados de la República Mexicana: desde el Bajío hasta Zacatecas y Durango, un anillo alrededor del Valle de México, incluyendo el estado de Guerrero, Oaxaca, Chiapas y la zona henequenera de Yucatán.

Asimismo el consumo de cereales en forma o en sus derivados son una fuente importante de vitaminas en la dieta del pueblo mexicano, principalmente de vitamina B₁ (Tiamina) y vitamina B₂ (Riboflavina). Por todo esto creí necesario conocer el contenido de estas vitaminas en varias marcas comerciales de pan de consumo generalizado, con el fin de conocer el aporte de estos productos a los requerimientos diarios de estas vitaminas para el hombre.

III. GENERALIDADES

Las vitaminas con compuestos orgánicos que se requieren para el crecimiento normal y mantenimiento de la vida de los animales, (inclusive del hombre quien es incapaz de sintetizar la mayoría de ellas), son efectivas en pequeñas cantidades actuando como cofactores con acción catalítica, cuantitativa y marcadamente específica. 7,46 40 41

Debido a que las vitaminas son un conjunto de sustancias químicamente heterogéneas se les puede clasificar de acuerdo con su función bioquímica, distinguiéndose una categoría que proporciona coenzimas, tal como pirofosfato de tiamina y riboflavina como flavin-adenín-dinucleótido, las cuales suministran coenzimas que actúan como substratos de reacciones intermedias que conducen a su incorporación a los grupos prostéticos.

Otra clasificación es la que se refiere a sus características de solubilidad, así las vitaminas A, D, E y K constituyen el grupo de las liposolubles, y la tiamina, la riboflavina, la niacina, la piridoxina, el ácido fólico, el ácido pantoténico, la biotina, la cianocobalamina y el ácido ascórbico constituyen el grupo de las hidrosolubles. ²⁸ De las vitaminas hidrosolubles las que nos interesan son B₁, B₂.

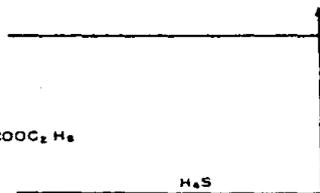
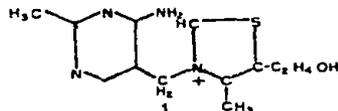
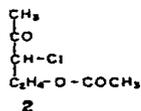
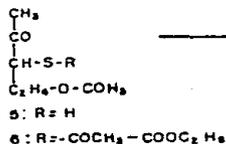
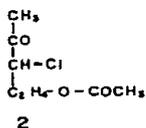
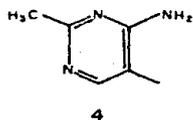
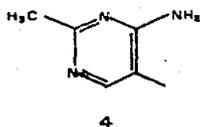
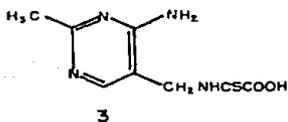
Vitamina B₁ o Tiamina.- fue aislada en 1925, se encuentra libre en la naturaleza en las semillas de los cereales, en los tejidos animales y en la levadura se encuentra como fosfato de tiamina y de esta forma participa como coenzima en diversos sistemas enzimáticos, como por ejemplo:

- a) α -cetoácido descarboxilasas.
- b) α -cetoácido oxidasas.
- c) fosfoacetolasas.
- d) transacetolasas ¹²

Síntesis de Tiamina.

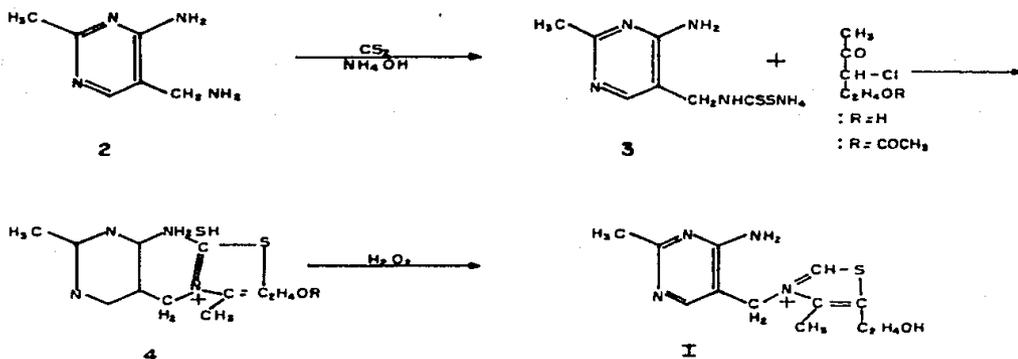
1. Método general.- Un nuevo método para sintetizar tiamina (I) fue realizado por Matsukawa al hacer reaccionar 5-tio-oxalil-aminoetilpirimidina (3) con acetato de cloroacetona (2), y 5-formilaminoetilpirimidina (4) con acetato de 3-acetil-3-mercapto-1-propil (5).

Posteriormente se encontró, que en el método anterior se usó acetato de α -acilmercaptopropil (6): R-acil en lugar de (5) también se obtiene el mismo -- producto (I), y que una reacción entre ácido sulfhídrico (H_2S) o tiocetona y -- una mezcla de (3) y (2) da tiamina.



H_2S

2. Segundo método.- En 1946, Sumi descubrió un nuevo método para sintetizar tiamina. En este método el 5-aminometilpirimidina (2), se hizo reaccionar con CS_2 y NH_4OH para dar ditiocarbamato (3), el producto se hizo reaccionar con el acetato (4) del compuesto de cloroacetona para formar mercaptotiamina (4:R: $-\text{COCH}_3$) que fue oxidado con peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Para obtener tiamina. ⁴²



La deficiencia de tiamina causa, en términos generales fatiga muscular, - anorexia, palpitaciones y degeneración de los nervios, padecimiento conocido - como beriberi.

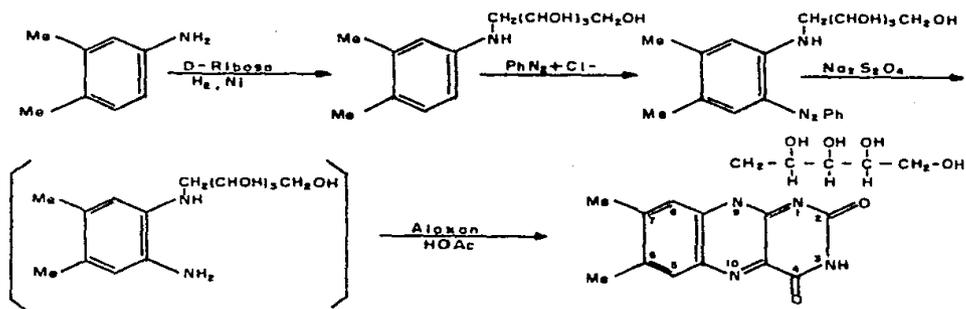
Recomendaciones diarias:

0.5 mg/1000 kcal ingeridas.

En adultos la ingesta no debe ser menor de 1 mg. de tiamina.

Riboflavina o Vitamina B₂.- Se encuentra en la naturaleza exclusivamente como integrante de las dos flavinas coenzimas, el mononucleótido (F M N) y el adenin dinucleótido (F A D). Estas coenzimas prostéticas F M N y F A D, se encuentran firmemente unidas a las proteínas, funcionan aceptando átomos de hidrógeno de los piridín nucleótido reducidos y en la eliminación de dos átomos de hidrógeno de carbonos adyacentes, dando lugar a un doble enlace.¹¹

Síntesis de Riboflavina.

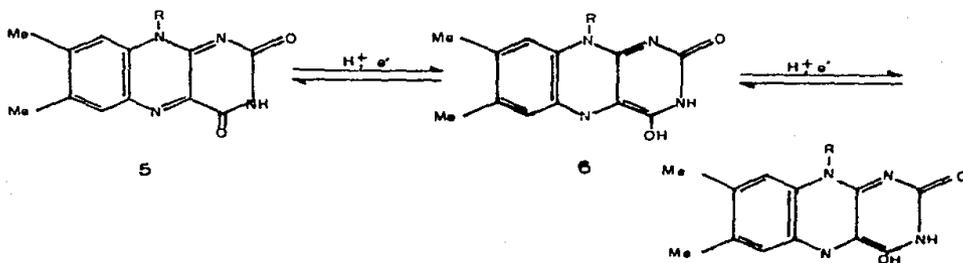


boflavina de algún factor condicionante que perturba la absorción o utilización de la vitamina; se caracteriza por lesiones no específicas; de piel, lengua y ojos.

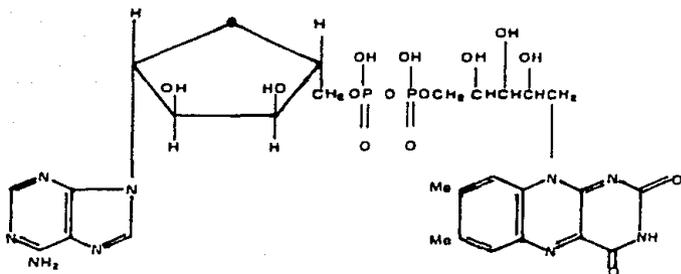
La arriboflavinosis humana.- queilosis, queratitis con vascularización corneana, dermatitis, que aparece ya sea en forma aislada o acompañada a otras avitaminosis como la pelagra, cede en pocos días a la administración de la riboflavina.

Procesos enzimáticos.- Mecanismo de acción de la riboflavina. La riboflavina desempeña un papel importante en los sistemas enzimáticos relacionados con las oxidaciones celulares.

La coenzima, flavin-adenin nucleótido (5), es importante en el sistema de oxidación biológica y la reducción que afecta únicamente al anillo de isoaloxazina, producida por dos electrones trazadores. Dando lugar a la formación de radicales (b). 2



La riboflavina puede atacar como un agente fotosensitizador y la molécula se oxida por un electrón donador. La estructura del dinucleótido (5) se basa en una degradación severa, incluyendo la hidrólisis de adenosin-5'-fosfato riboflavin-5'-fosfato.²



Recomendaciones diarias:

0.6 mg/1000 Kcal ingeridas

En adultos la ingesta no debe ser menor de 1.2 mg.

Las fuentes principales de esta vitamina, son: las vísceras como hígado, riñón y corazón; la levadura y la carne de cerdo.

De los métodos descritos para la determinación de tiamina y riboflavina, se pueden mencionar los siguientes:

1. Cromatografía en capa fina.
2. Cromatografía líquida.
3. Cromatografía líquida de alta resolución.
4. Cromatografía líquida de alta presión.
5. Cromatografía de intercambio catiónico.
6. Cromatografía de Gases.
7. Análisis volumétrico.
8. Análisis por resonancia magnética nuclear de Protón.
9. Análisis por Espectrofotometría de U.V.
10. Métodos fluorescentes y de fluorescencia inducida por rayos laser.
11. Método de complejación.

Describiremos brevemente cada uno de estos métodos.

1. Por medio de la cromatografía en capa fina se pueden determinar algunas vitaminas solubles en agua. En general se utiliza clorhidrato de tiamina como estándar y se eluye con una solución 0.1 N de HCl. Para el caso de la riboflavina se usa como eluyente ACOH 0.02 N, luego de separar las vitaminas del soporte cromatográfico se determinan sus espectros de tiamina y riboflavina en las muestras separadas y en ocasiones se usa la técnica fluorimétrica para determinar la concentración de dichos compuestos.⁷

Algunos ejemplos de determinación de estas vitaminas se mencionan en se--

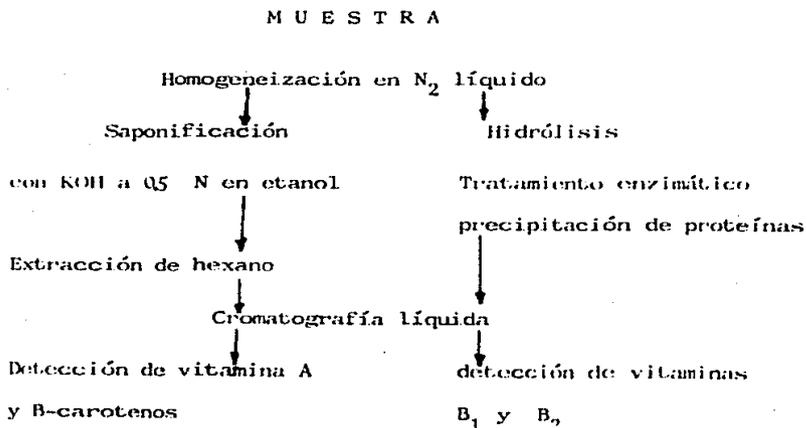
guida:

- a) Determinación de riboflavina en orina: en este procedimiento la muestra se hace reaccionar con diastasa para liberar la riboflavina, se pasa a través de una columna de permutita T (resinas de intercambio catiónica) para eliminar elementos minerales y la riboflavina se separa por cromatografía en capa fina sobre sílica gel HR usando piridina-ácido acético-agua en proporciones 19:2:79 como eluyente. La vitamina se cuantifica por fluorometría.²⁶
- b) Algunos colorantes orgánicos, por ejemplo riboflavina, eryrocina y violeta ácido se han determinado separándolos por cromatografía en capa fina usando metil celulosa como fase estacionaria, sobre un soporte plástico y una fase móvil formada de una solución al 2.5% de NaOAc , o una solución al 2% de citrato de sodio; conteniendo ambos NH_3 al 5%. posteriormente se separa la banda correspondiente, se extrae y determina el compuesto.²¹
- c) Determinación selectiva de vitaminas B_2 y B_6 en muestras farmacéuticas: en este análisis se usa talco activado y disolventes como BuOH-HOAc y H_2O en proporciones 40:10:50 para la vitamina B_1 y Dioxano-agua 70:30 para la vitamina B_2 . La visualización de las manchas se hace mediante diazoación y reacción con p-anisidina.⁴
- d) Determinación de vitaminas solubles en agua, en tabletas y granulos de multivitamínicos. Para la determinación de vitaminas solubles en agua en estas presentaciones farmacéuticas que contienen clorhidrato de tiamina, riboflavina, clorhidrato de piridina nicotinamida y ácido p-amino benzoico, su separación cuantitativa se realiza sobre una placa de sílicagel, utilizando una mezcla de ácido acético glacial-acetona-metanol-benceno para la fase móvil.

Los clorhidratos de tiamina y piridoxina se determinan después de extracción del absorbente por espectrofotometría de UV. La riboflavina por fluorimetría y el p-amino benzoico por colorimetría después de diazoción.⁸

2. Cromatografía líquida. La utilidad de la cromatografía líquida automatizada se ilustra en análisis de vitamina A, B-caroteno, tiamina y riboflavina en alimentos.⁴⁴

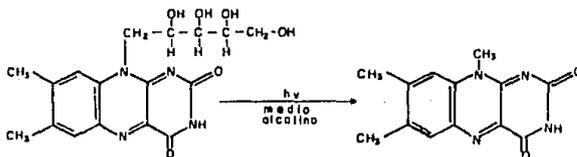
El aparato usado en estos análisis cromatográficos permite realizar 25 - análisis de vitaminas A₁ y B -carotenos o 25 análisis de tiamina y riboflavina por día, con una desviación estándar de 3%. Las columnas utilizadas son de vidrio rodeada de una chaqueta metálica y se pueden trabajar a presiones superiores a 100 atm. Si se requiere una mayor presión se usan columnas metalicas, se emplean detectores de UV y fluorimétricos y la muestra se trabaja según el siguiente esquema.



3. **Cromatografía líquida de alta resolución.**- Por este procedimiento, la riboflavina se determina en muestras de alimentos (conteniendo alrededor de $\mu\text{g/g}$) por hidrólisis ácida (sol 0.125 M. de H_2SO_4 a 120°), y tratamiento posterior con Tada-Diastasa a pH alrededor de 4.6 y la cromatografía líquida de alta resolución, se efectúa sobre una columna empacada con silicagel micro partícula, utilizando un fluorómetro de flujo. ³⁷

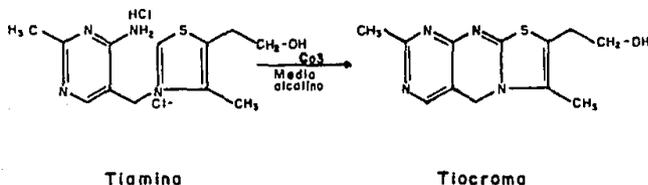
Un procedimiento de cromatografía líquida de alta resolución con reactivos de par-iónico estudia el efecto de los alquil sulfonatos sobre el tiempo de retención de algunas vitaminas solubles en agua a diversas proporciones de $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$. En general los tiempos de retención para los componentes aumentan con el incremento de la longitud de la cadena del reactivo o par-iónico. Este incremento además depende del compuesto que se estudia y del contenido de -- MeOH en la fase móvil. El estudio se hace con algunas vitaminas solubles en agua entre las que se encuentran la B_1 y B_2 . ¹¹

4. **Cromatografía líquida de alta presión.**- La determinación de tiamina y riboflavina que se hace en carne y derivados de carne por este procedimiento, primero se efectúa la cromatografía propiamente dicha y después se detectan las sustancias fluorométricamente. La riboflavina se convierte a lumiflavina por irradiación con luz ultravioleta y la tiamina se oxida a tiocromo previo esto a la separación cromatográfica. Este método permite detectar cantidades de 0.05 ng de tiamina y 0.02 ng. de riboflavina. ⁹



Riboflavina

Lumiflavina



Otro método de análisis de vitaminas solubles en agua por cromatografía líquida de alta presión se realiza sobre dos columnas unidas en fase:

M Bondapak y M Bondapak NH_2 .

En este estudio se observa el efecto sobre los tiempos de retención de cada vitamina y la separación de las mismas en una muestra de multivitaminicos cuando se varían las proporciones de agua/metanol y sales, solución buffer y reactivos, para cromatografía de par iónico. Cada vitamina se eluye en forma satisfactoria de M Bondapak C_{18} , el M Bondapak NH_2 . La velocidad de elución de las vitaminas es mayor con esta última columna que en el caso de utilizar M Bondapak C_{18} , los picos correspondientes son más agudos y el orden de elución es esencialmente inverso.^{46 9}

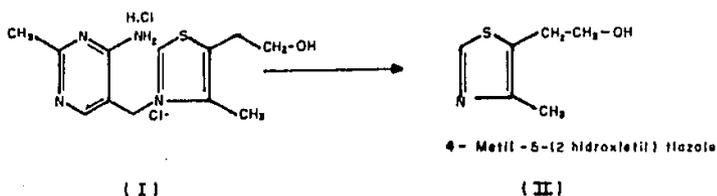
5. Cromatografía de intercambio catiónico, también se puede efectuar un análisis de vitaminas por cromatografía líquida de alta presión utilizando resinas Aminex A 5 pl 5.7. Se separan y determinan las siguientes vitaminas: Vitamina B_{12} , nicotinamida, acida nicotínico, piridoxina y riboflavina.

En este procedimiento el ácido ascórbico (cuando está presente), interfiere con la determinación de vitamina B_{12} .³²

La tiamina y riboflavina se separan también en Aminex A5 usando una solución 0.03 M de KCl en una solución buffer de fosfato de potasio (pH 8.0) como

fase móvil, en estas condiciones descritas la reproductibilidad es excelente y el método es sensible a cantidades de 100 a 250 ng de vitaminas.

6. Cromatografía de gases. Un procedimiento modificado para la determinación de vitaminas B₁ en soluciones estándar y en tabletas vitamínicas por cromatografía de gases, consiste en las modificaciones hechas en la instrumentación del método y en el procedimiento para la transformación de la tiamina (I) al 4-metil-5-(2-hidroxiethyl) tiazol (II), el método se realiza en una columna de vidrio empacado con un 5% de OV-17 sobre CHROMOSORB WAWMCS, la determinación se efectúa con estándares externos e internos, utilizando un detector de ionización de flama (FID) y un detector N-p (NPD) para el método de estándar interno y externo respectivamente, para todas las determinaciones con FID se usa ciclo octanol como estándar interno.



El compuesto II purificado se usa como estándar externo. Los resultados se convierten a $\mu\text{/ml}$ o mg/tableta de (I) utilizando factores apropiados. El intervalo de concentraciones detectados con FID es de 10 a 20,000 μg de (I). Las ventajas de este método es el incremento en la velocidad y facilidad del análisis, así como el pequeño volumen de muestra requerida (1 l).³⁹

6. Análisis volumétrico.- Un método volumétrico para la determinación de riboflavina en soluciones, consiste en agregar 3 ml de KIO_4 al 0.23% a 1 ml de solución de riboflavina al 0.02% dejando en reposo durante 20 minutos; des-

pués se agrega tres gotas de rojo de metilo y 2 ml. de acetona. El ácido fórmico que se forma por este tratamiento se titula con solución de sosal al 0.001N al vire amarillo del indicador. El error es menor o igual al 2.28%.^{31 19}

8. Análisis por resonancia magnética nuclear de protón.- La determinación simultánea de B₁ y B₆ se puede llevar a cabo por espectrometría de resonancia magnética nuclear, este método es rápido y cuantitativo y se puede efectuar en presencia de vitamina B₂, sin necesidad de realizar una separación previa. Las áreas de los picos cuyos desplazamientos sean 2.55 ppm son usados para determinar la cantidad de muestra que se encuentra presente en la solución problema. En esta determinación se usa el ácido maleico cuya señal aparece a 6.0 ppm, la integral del área de los picos se relaciona con dicha señal. El método funciona con mezclas que contienen de 0.05 a 1.5 mM de cada vitamina y se aplica el análisis de algunas preparaciones farmacéuticas.^{20 11}

9. Análisis por Espectrofotometría de U.V.- La tiamina y riboflavina también pueden determinarse espectrofotométricamente a partir de preparaciones de vitaminas a 445 nm. para riboflavina y a 274 y 261 nm para la tiamina, la primera se cuantea después de disolver la muestra en HCl 0.1 N y la segunda se determina como el Bromuro correspondiente.²⁰

10. Métodos Fluorescentes y de Fluorescencia Inducida por Rayos Laser. Se pueden detectar partes por trillon de varias vitaminas (Acetado de Vitamina A, Vitamina B₂, B₆ y B₁₂), mediante la fluorescencia inducida por los rayos laser, esta determinación se realiza por una continua aplicación de rayos laser que inducen fluorescencia molecular. Este método fluorescente también se puede aplicar a compuestos que por naturaleza no sean fluorescentes.⁴⁰

La concentración límite para detectar riboflavina por esta técnica es de 1.25×10^{-12} M; la fuente de excitación proviene de colorantes laser tal como el 2(-4-bifenil) -5-fenil-1,3,4-oxadiazol. La longitud de onda de excitación

a 375 nm hace máxima la absorción de riboflavina.

La fluorescencia se monitorea a 540 nm y se utiliza una señal promedio.³⁹

También se han determinado las cantidades de Tiamina y Riboflavina en mas caradas por el método de fluorescencia del Tiocromo y Lumiflavina, respectivamente de pastas de carne y jamón.

La fluorescencia encontrada está entre 14 y 40% para la tiamina y del 25 al 60% para la riboflavina, la cantidad aparente de vitamina corresponde a la cantidad encontrada por análisis estándar y la cantidad real se fija por experimentos, en los cuales se agrega una cantidad conocida de vitamina justo antes del análisis; las cantidades de vitaminas enmascaradas corresponden a las diferencias.¹⁸

La riboflavina y tiamina se extraen con piridina y AcOH de muestras de - complementos alimenticios, y su concentración se determina fluorométricamente transformando la tiamina a tiocromo previo a su análisis.²⁴

De todos estos métodos mencionados anteriormente, son los fluorométricos los que más se utilizan en análisis de tiamina y riboflavina en alimentos, ya que son bastante confiables y sencillos y no requieren de equipos sofisticados ni caros, con lo que es fácil realizarlos en cualquier laboratorio, por - lo tanto para este trabajo se eligieron estos métodos.

RECOMENDACIONES DIARIAS DEL CONSUMO DE VITAMINAS B₁ Y B₂⁴⁷ 33

EDADES	TIAMINA (mg)	RIBOFLAVINA (mg)
0 - 3 meses	0.6	0.7
4 - 6 meses	0.05	0.06
6 - 11 meses	0.6	0.8
7 - 12 meses	0.4	0.6
12 - 23 meses	0.6	0.8
1 - año	0.5	0.6
2 - años	0.5	0.7
3 - años	0.6	0.8
4 - 6 años	1.1	1.3
Adolescentes masculinos		
11 - 13 años	1.3	1.6
13 - 15 años	1.2	1.7
14 - 18 años	1.5	1.8
Adolescentes femeninos		
11 - 18 años	1.2	1.4
Hombres		
16 - 19 años	1.4	2.0
18 - 34 años	1.4	1.7
35 - 54 años	1.3	1.7
55 - y más años	1.1	1.5
Mujeres		
16 - 19 años	1.0	1.3
18 - 34 años	1.0	1.2
35 - 54 años	1.0	1.2
55 y más años	1.0	1.2
Embarazada	0.2	0.3
Lactantes	0.5	0.7

IV. METODOLOGIA

Las marcas estudiadas de pan de caja fueron las siguientes:

1. Wonder blanco.
2. Wonder integral.
3. Bimbo blanco.
4. Bimbo integral.
5. Sunbeam integral
6. Sunbeam blanco.
7. Filler integral.
8. Pan negro.

Las muestras se adquirieron en diferentes centros comerciales, y para su muestreo se tomaron panes de 10 bolsas para cada una de las marcas y tipos de pan. Se molieron, homogenizaron, secaron y de aquí se tomó una muestra para la determinación de vitaminas.

Los métodos empleados se mencionan a continuación.

DETERMINACION DE HUMEDAD. 3

Fundamento: Se basa en la evaporación del agua de la muestra por calentamiento en una estufa.

MATERIAL:

Cajas Petri.

Estufa al vacío (lab-line Instruments, Inc.).

Termómetro

Desecador

Balanza Analítica

Procedimiento;

En una caja de Petri previamente tarada, se pesan aproximadamente 5 g de la muestra bien mezclada, que se esparce por toda la superficie de la misma. Posteriormente se coloca dentro de la estufa formando vacío a una presión -- equivalente de 25 mm. de Hg o menos, a una temperatura de 98° a 100°C; por un tiempo de 5 horas, transcurrido el tiempo se cubre la caja Petri dejando que -- se enfríe a temperatura ambiente en un desecador y se pesa, se continúa la de terminación hasta obtener peso constante.

Cálculos:

$$\% \text{ de Humedad} = \frac{\text{Peso de la Humedad}}{\text{Peso de la Muestra}} \times 100$$

DETERMINACION DE GRASA CRUDA ³

Es la fracción soluble en disolventes orgánicos, o sea lípidos simples, lípidos complejos y lipoides.

Material:

Aparato extractor de grasas "LABCONCO"
 Cartuchos de porcelana porosos
 Vasos para grasa
 Desecador

Reactivos:

Eter etílico

Método:

Pesar de 2 a 5 g de muestra, colocarla en un cartucho; si es un polvo fino, ponerle un tapón de algodón para evitar que se salga la muestra. A los vasos a peso constante se les ponen 40 ml de éter etílico y junto con los cartuchos se colocan en el aparato, se dejan a reflujo hasta que la extracción de grasa sea completa. (4 horas mínimo). Después se destilan los disolventes hasta eliminación y los vasos se ponen en la estufa por 30 minutos; se dejan enfriar en un desecador y se pesan.

Cálculos para pasar grasa y vitaminas en base húmeda (pan normal)

$$\% \text{ Grasa cruda} = \frac{\text{Grasa extraída}}{\text{peso de muestra}} \times 100$$

$$\% \text{ vitamina (mg/100 g)} = \frac{\text{mg/100 g base seca (100 - (\% H - \% Grasa))}}{100}$$

TRATAMIENTO PREVIO DE LA MUESTRA ³

Debido a que las vitaminas son microelementos que se encuentran combinados normalmente en el alimento con los principales macroelementos que lo constituyen, como son proteínas, carbohidratos y grasas, es necesario separarlas de dichos constituyentes para efectuar su determinación cuantitativa.

Los procedimientos más comunes que se utilizan para la separación de vitaminas, son: la hidrólisis ácida, indudablemente más rápida y la hidrólisis enzimática que es más lenta pero brinda resultados más satisfactorios.

Las condiciones de la hidrólisis enzimática, como son concentración y tipo de enzima, pH de la solución, tiempo y temperatura de incubación se señalarán más adelante.

Las enzimas más comunmente usadas son las proteolíticas, las cuales actúan sobre las proteínas hidrolizándolas, liberando de esta forma a las vitaminas que se halla atrapadas. La papaína y la tripsina son las enzimas más apropiadas para estos fines. La acción conjunta con la enzima diastasa ayuda a obtener mejores resultados, al desdoblar los carbohidratos, los cuales son otro obstáculo en la liberación de las vitaminas.

HIDROLISIS ENZIMÁTICA POR MEDIO DE PAPAÍNA Y DIASTASA

MATERIAL:

Olla de presión.

Estufa de Incubación.

Matraces Erlenmeyer para la hidrólisis de 125 ml.

Matraces volumétricos de 100 ml.

Embudos

Frascos de color ámbar de 100 ml.

Papel Whatman No. 42

Papel aluminio.

REACTIVOS:

- Papaína en polvo con actividad de 0.2 unidades de hidrólisis de la leche.
- Diastasa, Taka Diastasa o Clarasa 900, capaz de licuar en 10 minutos 450 veces su peso de almidón seco.
- Solución reguladora de Acetato de Sodio con un pH de 4.62.

PROCEDIMIENTO:

Se pesa exactamente 1 g de muestra, la cual estará ya desengrasada y perfectamente homogenizada, pasándose al matraz erlenmeyer que servirá de recipiente para la hidrólisis y, por lo tanto, estará protegido de la luz, forrándolo con papel aluminio. De las enzimas papaína y diastasa, se pesa exactamente 200 mg, y todo este material se disgrega en el matraz de hidrólisis, añadiéndose posteriormente 80 ml de solución reguladora de Acetato de Sodio pH 4.62. Se lleva el matraz de hidrólisis a la estufa de incubación, a una temperatura de 37°C por un lapso de 24 horas.

Pasado este tiempo se transfiere el matraz a la olla de presión, y se calienta a 120°C por 30 minutos, a una presión de 2 lb/pulg², después de lo cual se pasará al matraz volumétrico en donde se afora a 100 ml con agua destilada. Se homogeneiza perfectamente la solución y se filtra a través de papel Whatman No. 42, desechando los primeros 5 ml, y recibiendo los restantes en los frascos de color ámbar, los cuales se protegen de la luz cubriéndolos con papel aluminio y se guardan en refrigerador.

DETERMINACION DE TIAMINA ²²

Fundamento: Está basado en la oxidación de la tiamina a tiocromo el --- cual exhibe una fluorescencia azul que puede ser medida en un radiofluorómetro y cuya intensidad es proporcional a la cantidad de tiamina presente.

Materiai:

- Radiofluorómetro Beckman
- Buretas de 50 ml
- Centrífuga
- Agitador de tubos
- Tubos de centrífuga
- Pipetas serológicas de 1, 2 y 5 ml.
- Propipetas
- Matraces volumétricos de 100 ml, 25 ml
- Cronómetro

Reactivos:

- Hidróxido de potasio R.A. 30%
- Ferricianuro de Potasio R.A. 300 mg en 6 ml de H₂O
- Alcohol isobutílico R.A.
- Alcohol etílico R.A. al 94%
- Solución A.- Se prepara disolviendo 30 gr de Hidróxido de Potasio en 100 ml de agua destilada.
- Solución B.- Se prepara disolviendo 300 mg de Ferricianuro de Potasio en 6 ml de agua destilada.
- Mezcla Oxidante.- Se prepara mezclando las soluciones anteriores.

SOLUCION DE TIPO DE TIAMINA.

Se pesan exactamente 50 mg de clorhidrato de Tiamina U.S.P. previamente secada a 105°C por espacio de 2 horas, y se disuelven en 500 ml de ácido clorhídrico 0.01 N con lo cual se tiene una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$. Esta solución puede conservarse en refrigeración guardada en frasco de vidrio ámbar.

SOLUCION INTERMEDIA.

Se toma un ml de la solución tipo y se pasa a un matraz volumétrico de 100 ml en donde se afora con agua destilada, de esta solución se tiene una concentración de 1.0 $\mu\text{g/ml}$ de clorhidrato de tiamina.

SOLUCION DE TRABAJO

Se toman 2 ml de la solución intermedia y se llevan a un volumen de 25ml con agua destilada, de esta manera se tiene una concentración de 0.08 $\mu\text{g/ml}$ de clorhidrato de tiamina.

PROCEDIMIENTO

Se toman por duplicado 5ml de la solución del desengrasado y desproteinizada y se colocan en los tubos de centrifuga, añadiéndoles después 5 ml de la mezcla oxidante medidos con bureta.

Se mezclan perfectamente con un agitador de tubos y se dejan en reposo durante 90 segundos, procediéndose inmediatamente a la adición de 10 ml, gota a gota y de una sola vez de alcohol isobutílico libre de fluorescencia utilizando una bureta para tal fin. Se agita vigorosamente y se centrifugan los tubos durante un minuto a 2000 rpm para la perfecta separación de las 2 fases.

Se toman 5 ml de la capa superior con la ayuda de propipeta y se pasan a los tubos de ensaye, se añade 2 ml de alcohol etílico al 94%, y se mezclan nuevamente con el agitador de tubos. Se procede a la lectura de la solución de trabajo y solución problema en el radiofluorómetro, utilizando un filtro primario (360-365 nm) y un secundario de 460-489 nm).

Esta determinación debe hacerse en un cuarto oscuro y corriendo siempre un blanco de reactivos.

CALCULOS:

La cuantificación del clorhidrato de tiamina presente tanto en el problema como en la solución de trabajo, se lleva a cabo mediante la aplicación de la siguiente fórmula.

g de Clorhidrato de Tiamina/100 g de muestra.

$$= \frac{Fa \times 0.08}{Fb} \times F.D \times 100$$

en donde: Fa. es la lectura fluorométrica de la solución problema.

Fb. es la lectura fluorométrica de la solución de trabajo.

F.D. es el factor de dilución.

0.08 es la concentración en g/ml de solución de trabajo.

DETERMINACION DE LA RIBOFLAVINA³

Fundamento.- La medida de la fluorescencia amarillo-verdosa que se produce al reaccionar la riboflavina con la piridina en ácido acético glacial y cuya intensidad es proporcional a la cantidad de vitamina B₂ presente, constituye el principio de esta determinación.

Se sabe que el intervalo de pH en el que se trabaje es definitivo, ya que a un pH de 6-7 se manifiesta a la máxima intensidad pero en intervalo de 3-5, la intensidad es más o menos constante y se elimina con ello factores adversos como son la concentración de fierro y otros minerales que interfieren; por lo tanto, la zona de lectura se realiza en dicho intervalo teniéndose así la seguridad de que la fluorescencia medida corresponde únicamente a la cantidad de riboflavina presente en la muestra.

MATERIAL:

Radiofluorómetro Beckman

Bureta automática

Matraces aforados de 10, 100 y 200 ml

Parrilla eléctrica

Baño de vapor

Pipeta serológicas de 2 y 5 ml

REACTIVOS:

Piridina R.A.

Acido acético glacial R.A.

MEZCLA DE DISOLVENTES (volumen a volumen)

Piridina 10 ml

Acido acético glacial 1 ml

Agua destilada 40 ml

SOLUCION TIPO RIBOFLAVINA

La riboflavina U.S.P. es secada dentro de un secador con vacío y ácido sulfúrico durante 24 horas, después de lo cual queda lista para ser utilizada.

En la balanza analítica se pesan exactamente 80 mg de Riboflavina y se llevan a un matraz volumétrico de 200 ml, en donde se añaden 100 ml de mezcla de disolventes. El matraz se coloca durante 10 minutos en un baño de vapor para la disolución total de la riboflavina. Transcurrido este tiempo se enfría el matraz y se afora con la mezcla de disolventes. Esta solución tiene una concentración de $400 \mu\text{g/ml}$.

SOLUCION INTERMEDIA

De la solución tipo se toman 5 ml y se afora a 100 ml con la mezcla de disolventes para tener una concentración de $20 \mu\text{g/ml}$ en dicha solución.

SOLUCION DE TRABAJO.

Se toman 2 ml de la solución anterior y se aforan a 100 ml con la mezcla de disolventes, obteniéndose una nueva solución cuya concentración es de $0.4 \mu\text{g/ml}$.

PROCEDIMIENTO

En matraces volumétricos de 10 ml se colocan por duplicado 2 ml de la solución desproteinizada y se añade 5 ml de mezcla de disolventes. Los matraces se colocan en baño de vapor durante 30 minutos, y pasado este tiempo se enfrían y aforan a 10 ml con la mezcla de disolventes. Se mide la fluorescencia de la solución problema y de la solución de trabajo en un fluorómetro con un filtro primario (420-440 nm) y un filtro secundario (550-700 nm).

Es recomendable también en este caso correr un blanco de reactivos, y efectuar la determinación de esta vitamina en un recinto oscuro.

CALCULOS.

La cantidad de vitamina B₂ presente en la muestra, puede ser calculada a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{mg de Riboflavina/100 g de muestra} = \frac{\text{Fa} \times 0.4}{\text{Fb}} \times \text{F.D.} \times 100$$

En donde:

Fa. es la lectura fluorométrica de la solución problema.

Fb. es la lectura fluorométrica de la solución de trabajo.

FD. es el factor de dilución.

0.4 corresponde a la concentración en $\mu\text{g/ml}$ de la solución de trabajo.

NOTA: El material que se utiliza para la determinación de la tiamina y riboflavina debe dejarse durante algunos días en una solución de ácido nítrico diluido 1:1 con agua destilada a fin de eliminar la fluorescencia que traen consigo dichos materiales.

V. RESULTADOS

CONTENIDO DE HUMEDAD Y GRASA DE LA MUESTRA		
Muestra	% Humedad	% Grasa (base húmeda)
Wonder blanco	38.39	0.97
Wonder integral	38.61	0.93
Binbo blanco	37.43	1.05
Binbo integral	37.42	2.17
Sunbeam blanco	37.00	1.26
Sunbeam integral	35.43	1.41
Filler integral	35.00	2.30
Pan negro	32.69	2.99

CONTENIDO DE TIAMINA Y RIBOFLAVINA

mg/100 g

MARCA	TIAMINA	RIBOFLAVINA
Wonder blanco	0.37	1.14
Wonder integral	0.40	3.27
Bimbo blanco	0.30	1.04
Bimbo integral	0.37	1.33
Sunbeam blanco	0.38	0.95
Sunbeam integral	0.75	2.39
Filler integral	0.69	1.46
Pan negro	0.71	3.27

CONTENIDO DE TIAMINA Y RIBOFLAVINA

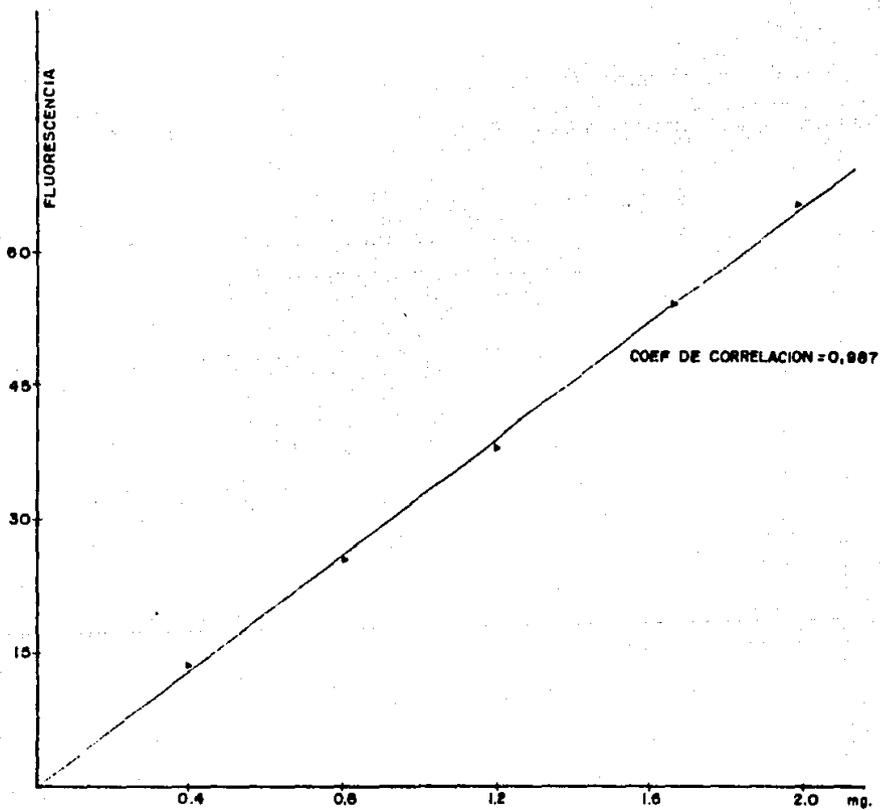
mg/30 g *

MARCA	TIAMINA	RIBOFLAVINA
Wonder blanco	0.11	0.34
Wonder integral	0.12	0.98
Bimbo blanco	0.09	0.31
Bimbo integral	0.11	0.40
Sunbeam blanco	0.11	0.28
Sunbeam integral	0.22	0.72
Filler integral	0.21	0.44
Pan negro	0.21	0.98

* 30 g equivale al peso aproximado de una rebanada

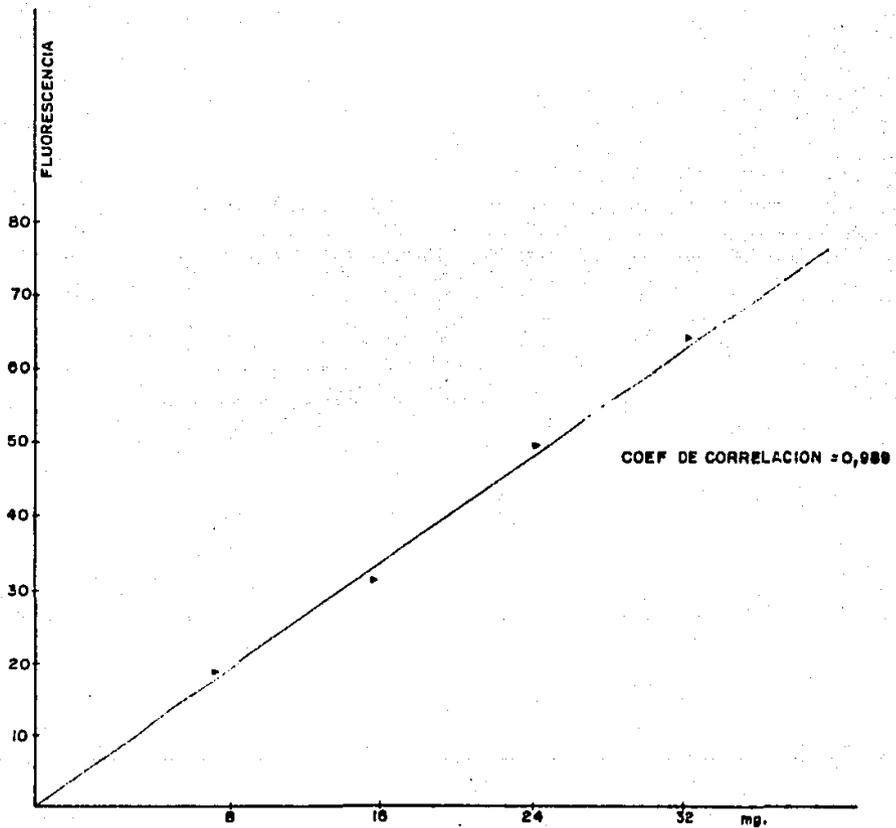
CURVA ESTANDAR DE RIBOFLAVINA

METODO FLUOROMETRICO



CURVA ESTANDAR DE TIAMINA

Método fluorométrico del tiocromo



VI. DISCUSION

De la observación de las curvas patrón tanto para tiamina como para riboflavina, se puede afirmar que los métodos usados son confiables para el análisis de estas sustancias y que presentan linealidad a través de un intervalo amplio de concentración, así como el intervalo en que se trabajó. Su coeficiente de correlación fue bastante aceptable.

Desde el punto de vista del análisis químico en los datos obtenidos experimentalmente, se observó que las muestras no difieren mucho en cuanto al contenido de humedad, más sin embargo, sí se notó una clara tendencia hacia un mayor contenido de grasa en la muestra con harina integral y en cuanto al contenido de vitaminas el pan Filler integral, pan negro y sunbeam integral son los que tienen mayor contenido de tiamina. Wonder integral y pan negro seguidos por los demás panes integrales son los que tienen mayor contenido de riboflavina y el Wonder blanco, Bimbo blanco y Sunbeam blanco tienen el más bajo contenido de tiamina y riboflavina.

REQUERIMIENTO DE TIAMINA.

- a) Adultos de 1.2 a 2.0 mg en promedio 1.7 mg por día.
- b) Niños 0.5 mg al nacer hasta 1.5 a los 16 años.

REQUERIMIENTOS DE RIBOFLAVINA.

- a) Adultos de 1.2 mg a 2.0 mg en general 1.7 por día.
- b) Embarazo y lactancia 2 mg.
- c) Niños 0.06 mg al nacer, aumentando hasta 2 mg a los 15 años.

Si consideramos que como promedio una gran parte de la población urbana consume dos rebanadas de pan diario (60 g) esto aporta solamente el 5.6% al 13.7 % de los requerimientos diarios por adultos de itamina y 1.7% a 51% de riboflavina.

Por lo que es necesario consumir una dieta balanceada con verduras verdes, hígado, leche levaduras y legumbres.

Lo ideal sería que consideráramos los datos obtenidos para que todo el pan se fabricara incluyéndose la cáscara y de esa manera se pudiera contribuir en mayor medida a disminuir el grado de deficiencia de estas vitaminas que aquejan a una gran parte de nuestra población.

Otra medida usual consiste en la restitución del valor nutritivo, consistente en la adición (enriquecimiento) de los nutrientes deficientes (vitamina B₁ y B₂ de este trabajo); es mediante su adición que desde el punto de vista nutricional no es fácil conocer el valor de enriquecimiento de los productos derivados de los cereales. Un estudio publicado en Nutrición Reviews, considera las diferencias encontradas en el contenido nutricional de la harina de trigo refinada y de la enriquecida.

En este medio se plantea la cuestión de que aunque el enriquecimiento restituye la tiamina perdida durante la molienda, otros nutrientes se encuentran en la harina enriquecida y en el pan en tales cantidades, que sólo corresponden a una fracción de su concentración original en el grano entero.

En esta serie de informes se demuestra, a través del análisis que los productos elaborados con harina enriquecida no pueden considerarse equivalentes a los productos fabricados con el grano entero.

VII. CONCLUSIONES

- 1) Los métodos fluorométricos³ usados para la determinación de tiamina y riboflavina, son métodos confiables para el análisis de productos a base de cereales.
- 2) Los panes elaborados de harinas integrales tienen un mayor contenido de tiamina y riboflavina.
- 3) El aporte de dos rebanadas de pan de caja para tiamina fue de 12.5% al 31.4% y de riboflavina fue de 28% al 298% de los requerimientos - diarios para el adulto.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

VIII. BIBLIOGRAFIA

1. Abastos y Comercialización de Productos Básicos (Trigo). 1988.
2. Acheson, R.M. An Introduction of the Chemistry of Heterocyclic Compounds. Second Edition. 1967.
3. Association of official Agricultural Chemists official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists. Tenth Ed., Washington D.C. (1965).
4. G. Belica. E. Popescu, V. Petrescu, R.P. Rev. Chim 30 600 (1979).
5. Banco Nacional de Comercio. "Declaración del foro de Roma sobre - los problemas de la alimentación". Diciembre, 1974.
6. P.B. Beeson and Walsh Mc. D.- Tratado de Medicina Interna. 13a. -- Edición. (1974).
7. T. Bican Fister, V. Drazin J. of Chromatography 77, 384 (1973).
8. M. Blesova, M. Zehradicek, Cesk Farm 28, 100 (1979).
9. Y.W.A., Catharin, A.M. Frederick, J. Agric. Food Chem. 28, 483 (1980)
10. Coriani. "Opiniones divergentes sobre la alimentación y población -- mundial". Rev. de la FAO, Vol. 4, No. 2, marzo-abril, 1971.
11. G.L. Coleman; S. Afr. Pharm 46, 621 (1979).
12. Con E.E. & Stumpf P.K.- Bioquímica Fundamental. 2a. Ed. Limusa Ed. México, 1974.
13. De Castro J. "Libro Negro del Hambre". Ed. Buenos Aires, 1972.
14. Documento que propone medidas de acción para evitar la crisis - de alimentos. Conferencia Mundial de la Alimentación. En Prensa.
15. Fisher P. Bender A. Valor Nutritivo de los Alimentos. Limusa Wiley. Editorial, (1972).
16. J.K. Edijala Analyst 104, 637 (1979).

17. A. Floridi, C. A. Fini, C.A. Palmerini, A. Rossi. Riv. Sci. Tecnol Alimenti Nutr. Um. 6, 197. (1976).
18. A. Frouin, H. Beerens, D.Roussin, F. Poncelet, N. Roll. Ann Falsif Expert. Chim. 68, 173 (1975).
19. L. O. Grom, O.T. Vasiléhuk, I.R. Shumelyanko Farm. Zh. 31, 68 (1976)
20. M.S.S. Hassan, J. Assoc. of Anal. Chem. 61, III (1978).
21. H. J. Helou, Rev. Bras. Farm. 55, 75 (1976).
22. Hoffman F. La Roche & Co. Ltd. Analitical Procedures for the -- determinacion of vitamins in multivitamin reparation. Basle. Switzerland (1969).
23. J. T. Janjic, A.G. Milovanovic, Glas. Hem. Drus; Beograd 41, 293 (1973).
24. N. Kurel, Krmivarstuislužby 13, 263, (1977).
25. Kir F. Othmer, D.F.- Encyclopedia of Chemical Tchnology.
26. U. Kraemer, R. Bitsch, D. Hoetzel, Klin Wochenschr. 55, 243 (1977).
27. Mahler H. R., Cordes E.H. Biological Chemistry. Harper & Row -- Publisher. 2a. Edición New York (1971).
28. Malin K. "El hambro en el mundo". Ed. Cártago, 1963.
29. A.V. Markova, Farm. Zh 4; 78 (1976).
30. Moricheu-Deuchent J. "La salud en el mundo". Ed. Cártago. Dikos Tau. 1971.
31. Necesidades de vitamina A, Tiamina, Riboflavina y Niacina. Informe de un grupo mixto FAO/OMS de expertos. Ser. Inf. Tec. No. 362. OMS. (1965).
32. V. Noe; M. Psallidi Riv. Soc. Ital. Scialiment 5, 29 (1976).
33. Nutrients in wheat flour and bread NUTR. REV., 25, 118 (1967)
34. Pimentel D., et el. "Food Production and the Energy Crisis".

- Science Vol. 182, 2 nov. 1973.
35. Reuck, D. A.V.S. and Maeve Ciba Foundation Study Group No. 11. The Mechanismo of Action of water soluble vitamins.
 36. E. E. Richard, J. Harris, Jr. H. R. Miller, J. Chromatogr 193, 470 (1980).
 37. J. P. Richardson, P.J. Favell, c.G. Goley, D.A. Jones Proc. Anal. Div. Chem. Soc. 15, 53 (1978).
 38. H. J. Richardson, Anal Biochem 83, 754 (1977).
 39. J. H. Richardson, B.W. Wallin, D.C. Johnson, L.W. Hrubesh. Anal Chim Acta 86, 263 (1976).
 40. Rosenberg H.R. Chemistry and Physiology of the vitamins Interscience Publisher Inc. N.Y. (1942).
 41. Schopfer W.H. Vitaminology. London Interscience Publisers (41950).
 42. Shimazono and Eishkekatsura Tiamina Review of Japanese Literature on Beriberi and Tiamine.
 43. Stephens, G.A. (Hormonas and vitamins). A. Hanbook for Physicians - and Pharmacits (1947).
 44. T.Van de Weerdhof, L. M. Wiervum and H. Reissenweber Journal of Chromatography 83, 455 (1973).
 45. White A. handler Ph. Smith E. y Steeen W. Principios de Bioquímica 2a. Edición Mc Graw Hill Book. Company N.Y. (1964).
 46. World. Wid Hlthn. Techn. Ser., 1967, 362.
 47. H.B.R., Wills; C.G. Shaw R.W. Day J. Chromatogr Sci 15, 262 (1977).