APLICACION DE TECNICAS MICROANALITICAS A LA DETERMINACION DE LISINA EN GRANOS DE MAIZ.

Tesis

que presenta para su examen profesional de

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

ANA MARIA NUÑEZ NUÑEZ

ante la

UNIVERSIDAD MOTOLINIA

incorporada a la

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.

México, D. F.

1966.

Deseo expresar mi reconocimiento al personal técnico del Instituto Mexicano de Investigaciones Tecnológicas, A. C. y especialmente al Laboratorio Central Analítico, por la asistencia y facilidades que me fueron brindadas para la realización del presente trabajo.

CONTENIDO

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS.

INTRODUCCION.

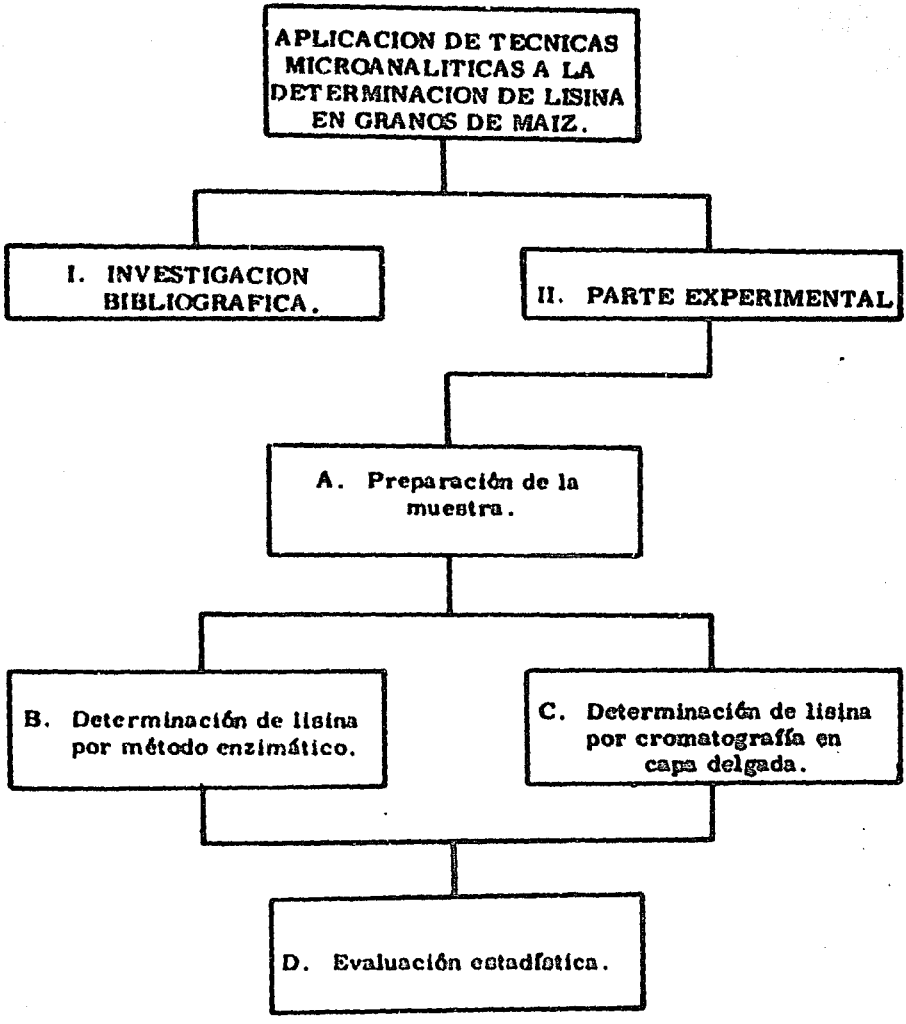
Uno de los objetivos en el estudio del desarrollo de líneas híbridas en el cultivo del maíz ha sido el incremento de su valor alimenticio, el que depende en gran parte del contenido y calidad de la proteína presente en el grano.

Por estudios realizados con proteína de maíz (zeína), se ha podido observar que el bajo contenido de lisina y triptofano en la misma, es uno de los factores que mayormente afectan su calidad, en virtud de lo cual, cualquier incremento de estos aminoácidos en las líneas híbridas desarrolladas, se considera de interés (4).

Hasta la fecha la evaluación de estas líneas, en lo que se refiere a su composición química, se ha llevado a cabo en muestras obtenidas a partir de varios granos molidos y analizados en conjunto, sin embargo se ha señalado la posibilidad de que exista diferente composición entre los granos de una misma variedad.

El presente trabajo se orientó al desarrollo de una técnica microanalítica que permita determinar el contenido de lisina individualmente en cada grano, a partir de muestras obtenidas sin dañar el germen del mismo, con el fin de que en caso de existir diferencias, sea posible seleccionar semillas con un mayor contenido de ese aminoácido para emplearlas en resiembras posteriores.

DIAGRAMA DEL PLAN DE TRABAJO.



I. - INVESTIGACION BIBLIOGRAFICA.

Entre los métodos analíticos más comúnmente empleados para la determinación de aminoácidos figuran el enzimático (1) y el de cromatografía en capa delgada (3, 5, 6).

De acuerdo con las metas fijadas en este trabajo, se estudió la aplicación de dichos métodos al microanálisis de maíz en grano, seleccionando condiciones adecuadas de operación.

Método Enzimático. Este método se basa en la reacción específica de ciertas enzimas con compuestos individuales de una mezcla, bajo determinadas condiciones de pH. En este tipo de reacciones, el compuesto se degrada produciendo bióxido de carbono, el que puede ser medido gasométricamente (1) o por técnicas colorimétricas (13). A partir del bióxido de carbono determinado, se puede calcular la cantidad del compuesto que lo produjo.

Para la determinación de lisina se aplica el hecho de que el Bacterium cadaveris elabora una enzima específica que degrada al grupo carboxilo de este aminoácido, produciendo bióxido de carbono y cadaverina (1). Este método ha sido empleado en el análisis de alimentos (12).

Cromatografía en Capa Delgada. Las técnicas cromatográficas emplean un sistema de disolventes constitui-

do por una fase móvil y una estacionaria. La separación ocurre cuando la mezcla, distribuida entre las dos fases, sufre una redistribución molecular atendiendo a su coeficiente de partición o sea a su solubilidad relativa en cada fase. Cuando la fase estacionaria es un adsorbente sólido, la técnica se llama cromatografía de adsorción y cuando es un líquido sostenido por algún tipo de soporte, la cromatografía se denomina de partición.

La cromatografía en capa delgada combina la cromatografía de adsorción y la de partición en una microescala. Este método de reciente desarrollo ha adquirido importancia debido a sus características de sensibilidad, rapidez y versatilidad, ya que combina las ventajas de la cromatografía de gases y las de la cromatografía en papel.

El procedimiento está basado en la elución de una mezcla de sustancias por medio de un sistema de disolventes adecuados a través de una capa delgada y homogénea de adsorbente. La separación que tiene lugar está dada por la relación existente entre dos afinidades diferentes y específicas para cada sustancia: la afinidad entre la sustancia y el adsorbente y la afinidad de la propia sustancia hacia el disolvente.

Actualmente existe una gran variedad de aparatos que permiten la aplicación de esta técnica. Entre los que presentan una mayor facilidad en su manejo se encuentra el ideado por Stahl(14), que permite la aplicación de un adsorbente en forma uniforme sobre las placas. El adsorbente más ampliamente usado el el gel de sílice G de acuerdo con la fórmula de Stahl, debido a su alta capacidad para separar los componentes de una mezcla (2).

II.- PARTE EXPERIMENTAL.

A. PREPARACION DE LA MUESTRA.

A partir de granos de maíz criollo amarillo, se ensayaron las técnicas de corte y perforación con el fin de seleccionar aquélla que permitiera obtener una mayor cantidad de muestra a partir de cada grano, sin dañar el germen del mismo.

1.- Técnica de corte.

Mediante el uso de una navaja se eliminó la cascarilla del endospermo y se efectuaron cortes en el grano teniendo cuidado de no dañar el germen. Por este medio se obtuvieron muestras a partir de cada grano, que variaron entre 14 y 74 mg.

2.- Técnica de perforación.

Con un alfiler se eliminó la cascarilla del endospermo y con una broca de 0.8 mm. se realizaron perforaciones múltiples en el grano. Por esta técnica se obtuvieron aproximadamente 20 mg. de muestra a partir de cada grano.

Una vez obtenidas las muestras por las dos técnicas, los granos se pusieron en condiciones de germinación, durante 72 horas.

De acuerdo con los resultados obtenidos (Tabla No. 1), se seleccionó la técnica de perforación como más adecuada para obtener muestras a partir de granos individuales de maíz, ya que además de no haber afectado la germinación de los granos, las muestras se obtuvieron en forma de polvo, lo que facilitó las operaciones siguientes en el análisis de las mismas.

B. DETERMINACION DE LISINA POR METODO ENZIMATICO.

1.- Hidrólisis de la muestra.

a) Método original.

La adaptación que hizo Olivé (11) al método de G.E. Schaiberger y A. Ferrari, consiste en hidrolizar 0.250 g. de muestra con 8 ml. de ácido clorhídrico 2.8 N, en ampolletas, durante 5 horas a 1.02 Kg/cm^2 de presión manométrica. Terminado el tiempo de hidrólisis, el hidrolizado se filtra por vidrio poroso, se evapora y se lava tres veces con aproximadamente 10 ml. de agua destilada. En seguida se evapora y se recupera con 10 ml. de solución amortiguadora de fosfatos (Na_2HPO_4/KH_2PO_4 - 0.2 M, 13:87 v/v), pH 6. La solución obtenida se filtra nuevamente por vidrio poroso.

b) Modificaciones al método original.

Con el fin de trabajar con una menor cantidad de muestra, se hicieron las siguientes modificaciones al método original.

Las muestras de maíz de 20 mg. aproximadamente, se hidrolizaron en ampolletas de 5 ml. de capacidad, con 4 ml. de ácido clorhídrico 2.8 N, en autoclave a 1.02 Kg/cm^2 de presión manométrica, durante 5 horas. Terminado el tiempo de hidrólisis las ampolletas se abrieron y el hidrolizado se filtró a presión por vidrio poroso. El filtrado se recibió en microcápsulas de vitreosil y el ácido presente se eliminó evaporando en baño de vapor; el resíduo resultante se disolvió en aproximadamente 5 ml. de agua destilada y se evaporó nuevamente a sequedad. Esta operación se repitió cuatro veces. Por último, el resíduo final se recuperó con un ml. de solución amortiguadora de fosfatos (Na_2HPO_4/KH_2PO_4 0.2 M, 13:87 v/v), pH 6 y se filtró a presión.

2.- Descripción del equipo empleado.

Se empleó un analizador automático (Auto-Analizador Technicon) que consta de las siguientes partes:

Muestreador.- Con capacidad para manejar 200 muestras y provisto de dos relojes que marcan el tiempo de toma de la muestra y el tiempo del ciclo total, que abarca el tiempo que transcurre entre la toma de una muestra y la toma de la siguiente.

Bomba proporcionadora.- Realiza automáticamente las operaciones de pipetear, medir, adicionar y mezclar los reactivos a la muestra. Consta de una serie de tubos de diferentes diámetros, por los que circulan los reactivos y aire libre de bióxido de carbono. Los reactivos son mezclados con la muestra por agitación mecánica, con ayuda de aire introducido.

Baño a temperatura constante.- En esta unidad se mantiene la temperatura necesaria para que actúe la enzima sobre el sustrato.

Colorímetro.- Este detector automático mide la decoloración del indicador debida a los diferentes niveles de concentración de bióxido de carbono proveniente de la descarboxilación del aminoácido.

Registrador.- Grafica sobre una carta móvil, los porcentajes de luz transmitida o absorbida en el colorímetro.

3.- Reactivos empleados.

a) Método original.

Hidróxido de sodio 1 N para eliminar el bióxido de carbono presente en el aire.

Enzima L-Lisina descarboxilasa (5 mg/ml de solución amortiguadora de fosfatos (Na_2HPO_4/KH_2PO_4 0.2 M, 13:87 v/v, pH 6).

Reactivo de color (2.3 ml. de solución amortiguadora $Na_2CO_3/NaHCO_3$ 1 M, 1:2 v/v, 0.9 ml. de fenolftaleína al 1%, 0.5 ml. de Brij-35 y agua destilada c.b.p. 1000 ml).

Curva tipo de clorhidrato de lisina.

b) Modificaciones al método original.

Hidróxido de sodio 1N.

Formol al 0.1% para evitar el contacto entre cada muestra durante la toma de las mismas.

Enzima L-Lisina descarboxilasa (1.25 mg/ml de solución amortiguadora de fosfatos (Na_2HPO_4/KH_2PO_4 0.2 M, 13:87 v/v, pH 6). Esta solución lleva además un antiespumante (Antifoam B) para evitar la formación de burbujas en el separador gas-líquido.

Reactivo de color. Se parte de una solución 1 M de Na_2CO_3 y $NaHCO_3$ 1:2 v/v, haciendo las diluciones necesarias para obtener una concentración de Na_2CO_3 de 1.5×10^{-4} M y de $NaHCO_3$ de 3×10^{-4}M. En un matraz se colocan aproximadamente 0.9 ml. de fenolftaleína al 1%, aproximadamente 0.25 ml. de Brij 35 y se afora a 500 ml. con la solución antes indicada.

4.- Técnica.

a) Método original.

El método adaptado por Ferrari (13) consiste en lo siguiente:

La muestra se introduce en el sistema con agua y aire libre de bióxido de carbono. Una alícuota se mezcla con un volumen apropiado de la solución de L-Lisina descarboxilasa y se pasa a través de un baño a 37oC, a la salida del cual se encuentra un separador gas-líquido. El líquido se elimina y el bióxido de carbono se adsorbe en una solución amortiguadora alcalina de carbonato y bicarbonato de sodio con fenolftaleína como indicador. El gas

adsorbido por la solución alcalina disminuye el pH de la misma reduciendo el color del indicador. La intensidad del color se mide a una longitud de onda de 555 milimicras. El tiempo de toma de la muestra es de 1.5 minutos y el ciclo total de 2 minutos (Figura No. 1).

b) Modificaciones al método original.

Se siguió la técnica original reduciendo el tiempo de toma de muestra a 1 minuto y el ciclo total a 1.5 minutos.

Por este método se determinó el contenido de lisina en 33 muestras obtenidas a partir del endospermo de diferentes granos de maíz de la variedad criollo amarillo y en 11 muestras de maíz de la variedad bolita, empleada como testigo, cuyo contenido de lisina se determinó con anterioridad.

C. DETERMINACION DE LISINA POR CROMATOGRAFIA EN CAPA DELGADA.

1.- Hidrólisis de la muestra.

a) Método original.

El método empleado por Hernández (8), consiste en hidrolizar en ampolletas 400 mg. de muestra con 25 ml. de ácido clorhídrico 6 N, en estufa a 110°C durante 24 horas. Terminado el tiempo de hidrólisis se abren las ampolletas y se añaden 200 mg. de carbón activado Darco G-60, se calienta a ebullición y se filtra por papel Whatman No. 1. El filtrado se evapora en cápsulas, se disuelve con aproximadamente 10 ml. de agua destilada y se lle-

va a sequedad y se recupera con 3 ml. de alcohol isopropílico al 10%.

b) Modificaciones al método original.

Se emplearon 4 ml. de ácido clorhídrico 6 N por cada 20 mg. de nuestra. La hidrólisis se llevó a cabo en ampolletas de 5 ml. durante 24 horas a 110°C. Finalizado el periodo de hidrólisis se abrieron las ampolletas, se adicionaron aproximadamente 15 mg. de carbón activado Darco G-60, calentando a ebullición y filtrando por papel Whatman No. 1. El filtrado se recibió en microcápsulas y se evaporó y lavó cuatro veces, empleando cada vez aproximadamente 5 ml. de agua destilada. Finalmente se llevó a sequedad y el hidrolizado se recuperó con 25 microlitros de alcohol isopropílico al 10%.

2.- Descripción del equipo empleado.

Cámaras cromatográficas rectangulares de vidrio Pyrex, con soporte de acero inoxidable.

Cromatoplacas de vidrio de 20 x 20 cm.

Aplicador y calibradores.

Microjeringas de 10 y 50 microlitros.

Densitómetro Densicord Modelo 542, filtro de 420 milimicras.

3.- Reactivos empleados.

Adsorbente gel de sílice G (Merck).

Disolventes: n-butanol: acético: agua(4:1:1 v/v) y fenol:agua (3:1 p/v).

Revelador de Moffat y Lytle: Solución I.- 50 ml. de solución de ninhidrina a 0.2% en etanol absoluto, 10 ml. de ácido acético, 2 ml. de 2,4,6 colidina. Solución II.- Solución de Cu $(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$ al 1% en etanol absoluto. Inmediatamente antes de usarse se hace la mezcla de la solución I con la solución II en la proporción de - 50:3.

Curva tipo de clorhidrato de lisina.

4. Técnica.

Preparación de las cromatoplacas. Las cromatoplacas se limpiaron con hexano para eliminar la grasa que pudiera estar presente. Durante un minuto se homogeneizaron en un mortero 25 g. de gel de sílice G con - 50 ml de agua destilada. El adsorbente así preparado se vació en el aplicador calibrado a 250 micras de espesor (2) y se extendió sobre las placas. Estas se dejaron a - temperatura ambiente hasta que su superficie tomó un - aspecto mate (10 minutos aproximadamente) y se colocaron en un desecador durante 24 horas (3, 14).

Aplicación de la muestra. En el extremo inferior de la placa y a una distancia de 1.5 cm. del borde, se - depositó un microlitro de hidrolizado dejando secar las aplicaciones.

Desarrollo de las cromatoplacas. El desarrollo bidimensional ascendente se llevó a cabo en la primera dimensión con n-butanol:acético: agua (4:1:1 v/v) durante

1.5 horas aproximadamente. Las placas se sacaron del disolvente y con el fin de eliminarlo se dejaron 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se desarrollaron en la segunda dimensión con fenol:agua (3:1 p/v), durante 2.5 horas aproximadamente. El desarrollo se llevó a cabo en ambos casos en cámaras previamente saturadas con los disolventes (9). La distancia recorrida por cada disolvente fue de 10 cm.

Revelado de las cromatoplacas. Después de secar las placas 10 minutos a 110°C, se revelaron con el reactivo policromático de Moffat y Lytle, durante 15 minutos a 110°C (3, 10).

Lectura de las cromatoplacas. Se realizó en el Densitómetro Densicord Modelo 542, empleando el filtro 420.

Mediante el procedimiento descrito se determinó el contenido de lisina en 20 muestras obtenidas a partir del endospermo de diferentes granos de maíz criollo amarillo y en 11 muestras de maíz testigo raza bolita.

D. EVALUACION ESTADISTICA.

Para el tratamiento estadístico de los resultados obtenidos en las determinaciones efectuadas, se aplicaron los siguientes conceptos:

Variancia.- Está dada por la suma de los cuadrados de las desviaciones, dividida entre el número de valores menos uno, o sea entre los grados de libertad.

$$s^2 = \frac{\Sigma(x - \bar{x})^2}{n - 1}$$

s^2 = variancia

x = cada valor obtenido.

$\bar{x}$ = media aritmética.

n = número de datos.

Desviación estándar.- Es la raíz cuadrada de la variancia.

$$s = \sqrt{\frac{\Sigma (x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Coeficiente de variación.- Es la desviación estándar expresada como un porcentaje de la media aritmética. Este valor ilustra el grado de variación de los datos respecto a la media aritmética, expresando en esta forma el porcentaje de error.

$$c.v. = \frac{100\ s}{\bar{x}}$$

c.v. = coeficiente de variación.

Prueba F.- Se emplea para relacionar dos variancias s_1^2 y s_2^2 basadas en ϕ_1 y ϕ_2 grados de libertad.

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2}$$

La variancia mayor se divide entre la menor. Si "F" calculada es mayor que "F" tabulada con 95 o 99% de

confianza, se rechaza que ambas variancias sean iguales y se acepta que son diferentes.

El tratamiento estadístico de los resultados obtenidos se orientó hacia tres aspectos fundamentales:

1.- Comparar el método enzimático con el de cromatografía en capa delgada, para ver si alguno de los dos ofrecía sobre el otro ventajas significativas en cuanto a exactitud.

2.- Conocer cuál de las dos técnicas microanalíticas ensayadas muestra en sus resultados una dispersión menor.

3.- Determinar si el contenido de lisina es diferente en cada grano de maíz de una misma variedad.

Respecto al primer punto se aplicó la "prueba F", relacionando las variancias de los resultados obtenidos por los dos métodos al analizar la muestra testigo (F_1):

$$F_1 = \frac{0.000725170}{0.00045842} = 1.58$$

En las tablas para un nivel de confianza de 95% se tiene un valor de:

$$F = 2.97$$

Para un nivel de confianza de 99%, un valor de:

$$F = 4.85$$

Para conocer cuál de las técnicas microanalíticas ensayadas mostraba en sus resultados una dispersión menor, se determinó el coeficiente de variación de los resultados obtenidos por ambos métodos:

Método enzimático:

$$c.v. = \pm 10.67\%$$

Cromatografía en capa delgada:

$$c.v. = \pm 9.17\%$$

Para determinar si el contenido de lisina es diferente en cada grano de maíz de un mismo origen, se aplicó la "prueba F", relacionando por una parte las varianciaas de los resultados obtenidos al analizar por el método enzimático muestras de maíz testigo y granos de maíz criollo amarillo (F_2), y por otra parte, relacionando las variancias de los resultados obtenidos al analizar por cromatografía en capa delgada muestras de maíz testigo y granos de maíz criollo amarillo (F_3).

Método enzimático:

$$F_2 = \frac{0.00717535}{0.00072517} = 9.89$$

Interpolando en las tablas se tiene para un nivel de confianza de 95% un valor de:

$$F = 2.692$$

Para un nivel de confianza de 99%:

$$F = 4.134$$

Cromatografía en capa delgada:

$$F_3 = \frac{0.00646332}{0.00045842} = 14.09$$

Interpolando en las tablas se tiene para un nivel de confianza de 95%:

$$F = 2.78$$

Para un nivel de 99% de confianza:

$$F = 4.43$$

III. - RESULTADOS.

TABLA No. 1

ENSAYO DE TECNICAS PARA LA OBTENCION DE LA MUESTRA A PARTIR DE GRANOS DE MAIZ CRIOLLO AMARILLO.

Grano.	Peso de la muestra obtenida. (g).	Técnica empleada.	Germinación.
1	0.0212	Corte.	No germinó.
2	0.0375	Corte.	No germinó.
3	0.0140	Corte.	No germinó.
4	0.0743	Corte.	No germinó.
5	0.0443	Corte.	Sí germinó.
6	0.0736	Corte.	No germinó.
7	0.0561	Corte.	Sí germinó.
8	0.0196	Perforación.	Sí germinó.
9	0.0210	Perforación.	Sí germinó.
10	0.0205	Perforación.	Sí germinó.
11	0.0200	Perforación.	Sí germinó.
12	0.0195	Perforación.	Sí germinó.
13	0.0181	Perforación.	Sí germinó.
14	0.0170	Perforación.	Sí germinó.
15	0.0233	Perforación.	Sí germinó.

TABLA No. 2

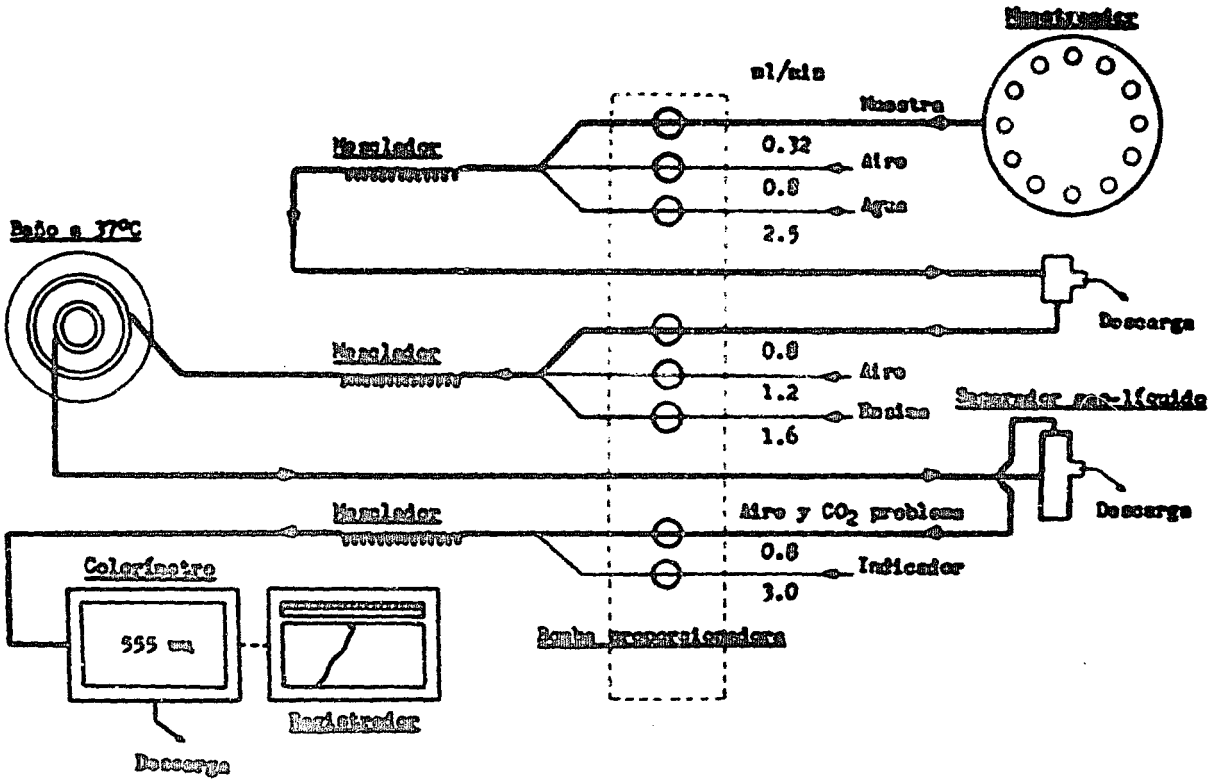
DETERMINACION DE LISINA EN MUESTRA DE MAIZ TESTIGO, BOLITA.

Determinación.	Lisina g/100 g.	
	Método enzimático.	Cromatografía capa delgada.
1	0.2095	0.2027
2	0.2132	0.2085
3	0.2329	0.2100
4	0.2333	0.2167
5	0.2512	0.2236
6	0.2521	0.2450
7	0.2671	0.2453
8	0.2721	0.2462
9	0.2725	0.2472
10	0.2829	0.2605
11	0.2869	0.2605
Media aritmética	$\bar{x}_1 = 0.2521$	$\bar{x}_2 = 0.2332$
Variancia.	$s_1^2 = 0.00072517$	$s_2^2 = 0.00045842$
Desviación Tipo.	$s_1 = 0.0269$	$s_2 = 0.0214$
Coeficiente de variación.	$c.v._1 = \pm 10.67\%$	$c.v._2 = \pm 9.17\%$

TABLA No. 3.

DETERMINACION DE LISINA EN GRANOS DE MAIZ CRIOLLO AMARILLO.

Determinación.	Lisina g/100 g. Método enzimático.	Cromatografía capa delgada.
1	0.0769	0.0662
2	0.0857	0.0900
3	0.1000	0.1381
4	0.1014	0.1418
5	0.1070	0.1465
6	0.1131	0.1749
7	0.1358	0.1830
8	0.1428	0.1861
9	0.1585	0.1866
10	0.1623	0.2062
11	0.1658	0.2065
12	0.1674	0.2080
13	0.1714	0.2105
14	0.1725	0.2124
15	0.1750	0.2347
16	0.1805	0.2811
17	0.1875	0.3100
18	0.2136	0.3267
19	0.2236	0.3276
20	0.2449	0.3758
21	0.2450	- - - -
22	0.2456	- - - -
23	0.2472	- - - -
24	0.2528	- - - -
25	0.2572	- - - -
26	0.2707	- - - -
27	0.2786	- - - -
28	0.2870	- - - -
29	0.2970	- - - -
30	0.3028	- - - -
31	0.3193	- - - -
32	0.3926	- - - -
33	0.4179	- - - -
$\bar{x}$ =	0.2090	0.2106
Media aritmética.	$\bar{x}_3$ = 0.2090	$\bar{x}_4$ = 0.2106
Varianza	s_3^2 = 0.00717535	s_4^2 = 0.00646332
Desviación Tipo.	s_3 = 0.0847	s_4 = 0.0803



ESQUEMA No. 1.- DIAGRAMA DE FLUJO EN LA DETERMINACION DE LISINA POR EL METODO ENZIMATICO, EN EL AUTOANALIZADOR TECHNICON.

IV.- CONCLUSIONES.

1.- De acuerdo con el resultado obtenido al aplicar la " prueba F" para comparar los dos métodos y ver si alguno de ellos ofrece sobre el otro ventajas significativas en cuanto a exactitud, se ve que el valor calculado para "F" es inferior al valor tabulado, por lo que ambos métodos se pueden considerar estadísticamente iguales. Las diferencias encontradas en la determinación de lisina en cada método no son estadísticamente significativas, con 99% de confianza.

2.- Al comparar sus coeficientes de variación, el método de cromatografía en capa delgada presenta en sus resultados una dispersión ligeramente menor que la que presenta el método enzimático.

3.- El método enzimático es práctico por su rapidez pero presenta el inconveniente de que la enzima L-Lisina descarboxilasa es un reactivo de importación y esto implica dificultad para conseguirlo.

El método de cromatografía en capa delgada es sencillo en equipo y accesible en reactivos.

4.- Al aplicar la " prueba F" para determinar si el contenido de lisina es diferente en cada grano de maíz de una misma variedad, debido a que los valores calculados son mayores que los tabulados, se concluye, con un nivel de 99% de confianza, que sí existen diferencias en el contenido de lisina de cada grano.

BIBLIOGRAFIA.

1.- Bergmeyer H. U.
"Methods of Enzymatic Analysis".
Academic Press - New York (1963).

2.- Bobbitt J.
"Thin Layer Chromatography"
Reinhold Publishing Corporation
New York (1964).

3.- Brenner M. Niederwieser A.
"Dünnschicht - Chromatographie von Aminosaüren".
Experientia 16: 378-383 (1960).

4.- Bressani R., Elias L. G., Santos M., Navarrete D., Scrimshaw N. S.
"Nitrogen and Essential Amino Acids Content in Different Varieties of Corn".
Arch. Venezolanos Nutric. 10: 85-100 (1960).

5.- Demole E.
"Applications de la Microchromatographie d'adsortion sur Couches Minces".
J Chromatog. 1: 24-33 (1958).

6.- Demole E.
"Progress Recents de la Microchromatographie sur Couches Minces".
J. Chromatog. 6: 2-21 (1961)

7.- Davies O. L.
"Statistical Methods in Research and Production".
Oliver and Boyd - Londos (1957).

8.- Hernández R.
"Estudio Comparativo de Diversos Métodos Analíticos para la Determinación de Lisina en Maíz".
Tesis: Escuela Nacional de Ciencias Biológicas,
I. P. N. - México, D. F. (1963).

9.- Honegger C.
"Influence of Chamber Saturation in Thin Layer Chromatography"
Helv. Chem. Acta 46: 1730-4 (1963)
C. A.: 59: 9296a.

10.- Moffat E. D., and Lytle R. I.
"Polychromatic Technique for the Identification of Amino Acids on Paper Chromatograms".
Anal. Chem., 31: 926 (1959).

11.- Olivé R. V.
"Variación del Poder Diastásico y Contenido de Proteínas y Lisina en Maíz y Trigo Malteado a Diferentes Condiciones".
Tesis: Facultad de Ciencias Químicas
U.N.A.M. México, D. F. (1965).

12.- Pomeranz Y., and Miller B. S.
"Comparation of Methods for Determination of Lysine in Cereals".
J. Assoc. Offic. Agr. Chemists.
46: 399-405 (1963)

13.-Schaiberger G. E., and Ferrari A.
"Automatic Enzymic Analysis for L-Lysine Via Descarboxilation".
Ann. N. Y. Acad. Sci. 87: 890-3 (1960).

14.- Stahl E.
"Thin Layer Chromatography . A Laboratory Handbook"
Academic Press - New York (1965).