

Solo Autor
No. 52 465
B476c
1945

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

Laboratorio de Bromatología y Toxicología

Prof. Dr.

Hermann Schmidt H.

Laboratorio de Medicina Experimental del Prof.

Prado Tagle

Jefe: Dr. Enrique Egaña
Hospital San Vicente

Don / 5.83
659

**CONTENIDO DE TIAMINA EN CAR-
NES MUSCULARES Y ORGANOS
DE VACUNOS**

TESIS DE PRUEBA PARA OPTAR
AL TITULO DE QUIMICO-FAR-
MACEUTICO DE LA UNIVERSI-
DAD DE CHILE.

sl

HERBERT BENTJERODT HENSE

1 9 4 5

Nº nec 52465

M
10476
1945

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

Laboratorio de Bromatología y Toxicología

Prof. Dr.

Hermann Schmidt H.

Laboratorio de Medicina Experimental del Prof.

Prado Tagle

Jefe: Dr. Enrique Egaña

Hospital San Vicente

CONTENIDO DE TIAMINA EN CAR- NES MUSCULARES Y ORGANOS DE VACUNOS

TESIS DE PRUEBA PARA OPTAR
AL TITULO DE QUIMICO-FAR-
MACEUTICO DE LA UNIVERSI-
DAD DE CHILE.



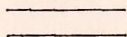
HERBERT BENTJERODT HENSE

1 9 4 5

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

Dr. H. Schmidt Hebbel,
Secretario Interino.

A MIS PADRES.



018
APRO
MIS AUMENTOS A LOS SEÑORES:

Dr. HERMANN SCHMIDT H.

Dr. ENRIQUE EGAÑA.

INTRODUCCION

En la alimentación humana, los "alimentos protectores" tienen una importancia fundamental, no sólo en la edad del desarrollo, sino también en la adulta.

Entre los alimentos protectores figura la carne, que constituye no sólo fuente primordial de proteína animal, sino también un aporte de vitaminas, especialmente del complejo B, y de iones. A pesar del hecho, que en Clínica y en los estudios de alimentación de grupos de población que se han hecho en Chile, se reconoce la importancia de la carne como factor alimenticio, no se dispone, sin embargo, de tablas nacionales que den a conocer el contenido general y particular de las carnes que se consumen en nuestro país. Es así como el contenido nutritivo de la carne chilena se ha valorizado de acuerdo con cifras y estudios realizados en el extranjero (1, 2, 3), especialmente en Inglaterra, Estados Unidos y Alemania; países en donde las características del terreno, de razas de animales y su alimentación, etc., son bastante diferentes a las nuestras.

Frente a estos hechos, que significan el trabajar con datos que no representan la realidad nacional, la Sociedad Chilena de Nutrición, Bromatología y Toxicología ha tomado la iniciativa de estudiar en forma metódica y sistemática, la composición de las carnes que se consumen en nuestro medio, y ha iniciado este estudio con el análisis de los músculos y órganos de vacuno, por ser éstos los de uso más frecuente.

Dentro del plan general a que nos referimos, nos ha correspondido el estudio del contenido de vitamina B1 o tiamina de la carne.

No puedo dejar de aprovechar la ocasión que se me presenta, para agradecer a la "Rockefeller Foundation", la generosa donación hecha al Dr. Enrique Egaña, gracias a la cual ha sido posible realizar este trabajo.



CAPITULO I

Estado actual del problema, sobre contenido de tiamina en la carne

Sabemos que la vitamina B1, desde el punto de vista de la alimentación general, tiene el ciclo siguiente: el individuo la recibe en forma no fosforilada, preferentemente; el organismo la fosforiliza, convirtiéndola en difosfotiamina; en esta forma íntegra diversos sistemas enzimáticos que catalizan reacciones del metabolismo intermediario, especialmente de los glúcidos, y también de lípidos. Actúa, además, en otras funciones de síntesis. La acción de la difosfotiamina se relaciona en especial con el metabolismo del piruvato, cuerpo que ha sido considerado como la "llave de paso" a través de la cual se conectan los diversos metabolismos (4). Las diferentes reacciones en que ella interviene son las siguientes, todas a partir de piruvato: formación de aldehído acético (por decarboxuación); de acetato (por oxidación); de lactato y acetato (por dismutación); de acetil-metil-carbinol, glucosa, citrato, diacetato y ácido a-laquo-giutárico (por condensación). La sola enunciación de estas numerosas e importantes reacciones, explica el rol fundamental de esta vitamina en la economía animal. Se trata, como se vé, de reacciones que constituyen fuentes apreciables de energía.

Por otra parte, sabemos que el músculo y los diferentes órganos animales, contienen ambas formas de la tiamina, es decir, fosforilada y no fosforilada (5).

En líneas generales, la preparación de un alimento, que sea fuente de vitamina B1, puede afectar el contenido de ella en cuatro diferentes formas, preferentemente (6):

- 1) Destrucción por el calor.
- 2) Pasaje de la vitamina al agua de cocción y no aprovechamiento ulterior de ésta.
- 3) En el caso de alimentos que contengan hueso, cáscara, semillas, etc., las cuales son separadas a menudo de la parte comestible, se introduce con ello un cierto error, en lo que se refiere al porcentaje de la vitamina, en relación al peso.
- 4) En el acto de preparación, el alimento puede adquirir o perder agua, y por lo tanto, peso, hecho que debe ser tomado en consideración en la valoración final.

En lo que se refiere a carne en particular, podemos decir que la preparación culinaria no afecta mayormente el contenido de tiamina, porque el tiempo de exposición al calor es corto, al ser asada, y, por otra parte, durante la cocción, la tiamina es capaz

de resistir en alto grado la destrucción, debido a su termoestabilidad, a pH fisiológico. Es así como las cifras del contenido de carne cruda, son relativamente semejantes a las de carne cocida, asada, etc. Christensen y colaboradores (6) han comunicado resultados, en los cuales dan una pérdida de un 20% en la carne de buey cocida, respecto a la cruda:

Ejemplo: cocida	0,4	gamas	por	gramo
cruda	0,5	"	"	"

Sin embargo, trabajos más modernos, entre los cuales podemos citar el de J. M. Mc. Intire, B. S. Schweigert, E. J. Herbst y C. A. Elvehjem (7), indican que la pérdida de la vitamina es muy variable, según los diferentes tipos de carne analizados y la preparación a que fueron sometidos.

Aún cuando reconocemos que el problema total, en lo que respecta a contenido de vitamina B1 de la carne, se resuelve con la medición de tiamina libre y fosforilada, nosotros hemos determinado solamente tiamina libre. Consideramos que ambas formas de la vitamina tienen cierta proporcionalidad entre sí, de tal manera que la medición de una, puede informar correlativamente acerca de la otra; es decir, que a contenido normal de clorhidrato de tiamina, corresponde contenido normal de difosfotiamina.

El Laboratorio dispone de reactivos biológicos y métodos químicos, de los cuales puede servirse para medir cuantitativamente una vitamina cualquiera. Se entiende que los primeros (los biológicos), nos informan acerca del contenido total. En el caso de la vitamina B1: tiamina libre y fosforilada; del ácido nicotínico: su forma libre y la enzimática (coenzimos I y II), etc. La técnica química, en general, se aplica a una forma; en el caso de la vitamina B1, sin embargo existen métodos químicos de aplicación general: el método del tiocromo y difosfotiocromo, entre otros. Desgraciadamente, no nos ha sido posible disponer del material necesario para realizar a la vez la técnica del difosfotiocromo.

El programa fijado para el estudio de los alimentos nacionales, comprende, en lo que se refiere a carne, los grupos musculares y órganos de mayor uso alimenticio en la población, comprobado por las encuestas que se han realizado entre nosotros (8,9).

Es así como hemos determinado el contenido de:

- | | |
|-------------------------|------------------|
| 1) "Pasta negra"; | 6) "Filete"; |
| 2) "Lomo liso"; | 7) "Pateada"; |
| 3) "Lomo vetado"; | 8) "Guachalomo"; |
| 4) "Asiento de picana"; | 9) Hígado; |
| 5) "Pollo ganso"; | 10) Riñón. |

CAPITULO II

Técnica

Hemos considerado importantes, en la determinación, los siguientes cuatro momentos:

- 1) Obtención de la muestra;
- 2) Preparación del filtrado;
- 3) Oxidación de la vitamina, presente en el filtrado, a tiorcromo, y
- 4) Lectura fluorométrica.

1) Obtención de la muestra:

Las muestras de carne han sido obtenidas de animales vacunos jóvenes (novillos de 2,5 a 4 años de edad), cuya procedencia y alimentación previa no fué posible establecer con precisión. Se han tomado las siguientes porciones anatómicas:

Región crural interior (Adductores del muslo) ("Posta Negra"); Parte anterior de los músculos de la gotera espinal ("Lomo liso"); Músculos espinales posteriores, o de la región posterior de la gotera espinal ("Lomo vetado"); Región muscular de la nalga (glúteos, semitendinoso y semimembranoso), parte cercana a la cola ("Pollo ganso"); Cervicales superiores ("Gua-chalomo"); Oblicuo externo y tensor del fascia lata ("Asiento de picana"); Dentellado mayor, pequeños dentellados, trapecio y músculos axilares ("Plateada"); Psoas ("Filete"); Hígado y Riñón.

Las muestras fueron preparadas dentro de las 10 horas consecutivas a la muerte del animal, el cual previamente fué sangrado, de tal manera que el material a determinar, contenía sólo pequeñísimos restos de sangre. Ocasionalmente fué guardado en el refrigerador, por un lapso no mayor de 12 horas. El filtrado se ha preparado de la muestra muscular, la cual naturalmente contenía tejido conjuntivo intersticial, vasos sanguíneos, nervios, etc.; en una palabra, lo usualmente comestible de la carne. Cabe advertir que el filtrado se preparó de porciones musculares que no estaban en contacto con el exterior. Esta última precaución nos permite afirmar que hemos trabajado con carnes en las cuales la pérdida de agua es mínima. En resumen, en la obtención de la muestra, nos hemos atendido a las normas que ha acordado la Sociedad Chilena de Nutrición, Bromatología y Toxicología, para esta clase de estudios.

2) Preparación del filtrado:

Con el objeto de obtener un filtrado que represente el contenido vitamínico de cierta cantidad de muestra, se siguió la siguiente técnica de extracción (10):

Se raspa la carne con una navaja y se muelen finamente 2,5 g. en un mortero de porcelana, con arena de cuarzo o arena calcinada y lavada. Se agrega en seguida 75 cc. de ácido sulfúrico N/10, se calienta durante 1 hora a 70° C., agitando frecuentemente. Luego, se calienta por una hora a 50° C., agregando previamente 0,30 g. de papaina (*) disuelta en 5 cc. de acetato de sodio, 2,5 molar, agitando con frecuencia y cuidando que la temperatura no sobrepase a la indicada, pues a 70° C. la acción enzimática es nula (11). Finalmente, se somete a un calentamiento en una estufa a temperatura constante de 37,5° C., durante 12 a 14 horas. Al cabo de este tiempo se hace pasar por filtro de Buchner, se completa un volumen conveniente (100 cc.) con agua destilada y se filtra nuevamente, hasta obtener un líquido transparente. El pH resultante es aproximadamente 4,5; que es el óptimo para la adsorción de la vitamina por el Decalso.

La cantidad de tiamina del filtrado permanece constante por cierto tiempo, nosotros lo comprobamos hasta un plazo de 4 días. Este hecho se explica, por el pH bajo y una temperatura adecuada, alrededor de 4 a 5° C.

En la obtención y preparación de los filtrados de órganos: hígado y riñón, nos hemos ajustado a la misma técnica que hemos descrito para músculo. Cabe señalar, que la muestra estaba constituida por un trozo de órgano, desprovisto de tejido graso, cápsula, etc. La muestra de Riñón comprende zona cortical y medular.

Experimentos preliminares se realizaron con el objeto de ensayar otras extracciones (12). Es así como intentamos la extracción por medio del ácido clorhídrico al 1% durante una hora, siendo la molienda y la preparación de la muestra, igual a la que hemos indicado para la extracción con H₂SO₄. Estudios comparativos de esta extracción y la del ácido sulfúrico, demostraron que esta última es mayor en un 30% aproximadamente. Por otra parte, el filtrado hecho con HCl tenía una consistencia tal, que su pasaje por el filtro de Gooch, en el momento de la adsorción por el Decalso, era dificultoso; debido, probablemente, a la falta de acción enzimática.

(*) El método original indica "clarasa", la cual es un producto comercial, que contiene fermentos diastásicos y proteolíticos: maltasa, tripsina, fermento lab, erepsina, lipasa y hemolisina. Su pH óptimo para diastasa es 5 a 5,6 y para reacciones proteolíticas, 8 a 8,4; la temperatura óptima es 50° C.

3) Determinación:

Hemos empleado el método fluorométrico de Jansen, modificado por Egaña y Meiklejohn (13). Estos autores hacen especial hincapié:

a) En la preparación de filtrados libres de fluorescencia interferente, lo que se consigue por medio del lavado previo con alcohol isobutílico;

b) En el porcentaje de recuperación de cantidades conocidas de vitamina, agregadas en el momento inicial, y

c) En el uso de una escala standard de tiocromo.

Se toma una cantidad conveniente de filtrado (25 cc.), el cual se agita vigorosamente en tubo con tapa de vidrio, con una cantidad igual de isobutanol, con el objeto de substraer la fluorescencia extraña que proviene del fermento y que interfiere en la lectura final. Se centrifuga y se toman 20 cc. de la capa inferior, los que se hacen pasar a través de 200 mg de Decalso (zeolito sintético), colocados sobre un disco de papel filtro, que cubre el fondo de un filtro-crisol de Gooch, conectado a la trompa de vacío. Para este objeto, el Decalso se ha suspendido previamente en 10 cc. de ácido acético al 1% y se ha filtrado por el Gooch. Pasados los 20 cc. de nuestro filtrado, lo que demora alrededor de 30 minutos, se lava el residuo que permanece sobre el filtro, con 10 cc. de ácido acético al 1%, con el objeto de eliminar sustancias extrañas que todavía puedan estar retenidas. (El filtrado que ya ha pasado a través del Decalso, acusa frente a la luz ultravioleta, una débil fluorescencia verdosa, lo que demuestra presencia de sustancias, que si bien no fueron extractadas por el lavado previo con isobutanol, tampoco son adsorbidas y por ello no interfieren en la lectura) El papel filtro con el Decalso y la vitamina adsorbida, se coloca en un tubo de centrifuga y se agita en primer lugar con 2 cc. de cloruro de potasio al 25%, hasta completa elusión. Luego se agrega cantidades variables de ferricianuro de potasio al 0,5%, que van de 0,2 a 0,5 cc., según la rapidez con que desaparece el color amarillo de la solución de ferricianuro, cuando ésta es agregada. Se agita nuevamente y se agrega 1 cc. de hidróxido de sodio al 20%. Se adicionan 5 cc. de alcohol isobutílico y se vuelve a agitar vigorosamente 2 minutos; luego se centrifuga.

4) Lectura fluorométrica:

Se toman 2 cc. de la capa de isobutanol y se hace la comparación a la luz de Wood, en cámara oscura, frente a soluciones standard de tiocromo; utilizando para este objeto, tubos Pyrex de vidrio no fuoresente (10 x 0,8 cm).

Los standard de tiocromo se han preparado en una escala equivalente a 0,05 — 0,1 — 0,2 — 0,3 — 0,4 — 0,5 — 0,6 — 0,8 — 1 — 1,2 — 1,4 — 1,6 — 1,8 — hasta 2 gamas, de clorhidrato de tiamina. Esta escala debe renovarse mensualmente. Naturalmente, se ha tomado en cuenta el factor de recuperación de cantidades conocidas de vitamina, agregadas en el momento inicial de la preparación del filtrado, factor que ha sido del orden del 50%. Igual resultado han obtenido otros autores (14) al estudiar el contenido de vitamina B1 en sangre. Como sabemos, la conversión máxima de la vitamina, es de un 65%, vale decir, 1 gama de clorhidrato de tiamina se convierte en 0,50 gama de tiocromo y no en 0,77 gama, que sería la conversión teórica, correspondiente al 100%. Al hablar entonces de 50% de recuperación, expresamos el hecho, que de una gama de vitamina B1 contenida en el tejido muscular, se recupera 0,38 gama, lo que constituye justamente el 50% de la transformación máxima.

Los reactivos usados son Merck, y C. B. Bakers Analyzed. El Decalso proviene de la Permutit Co., New York y fué preparado en la forma que sigue(13): se tritura finamente el Decalso en un mortero de porcelana y se somete en seguida a tres diferentes lavados en la centrífuga:

- 1) con ácido acético al 1%, dos veces;
- 2) con alcohol etílico, dos veces;
- 3) con acetona, una vez.

Este procedimiento en general, nos procura un elemento de gran superficie de adsorción, a la vez que libre de toda sustancia fluorescente.

El alcohol isobutílico y en general todo los reactivos, deben controlarse periódicamente, para comprobar la ausencia de fluorescencia.

CAPITULO III

Resultados

Los resultados parciales representan determinaciones en número de 8 a 10, para cada porción anatómica, que a su vez provienen de muestras tomadas de diferentes animales.

En el cuadro-resumen que damos a continuación hemos anotado las cifras que corresponden a los contenidos menor y mayor y la media aritmética correspondiente, como así mismo la fecha en que se obtuvo la muestra.

Para el cálculo estadístico de los resultados, nos hemos servido de la fórmula que utiliza la Sociedad de Biología de Santiago (15):

Desviación tipo de la media = Σ .

$$\Sigma = \sqrt{\frac{\Sigma d^2}{n \cdot n-1}}$$

donde Σd^2 significa la suma de los cuadrados de las diferencias de cada resultado con la media aritmética;

n, significa el número de resultados de la serie experimental.

"Esta fórmula indica que existe un 66% de probabilidad, que la diferencia entre el resultado verdadero y el que se obtiene en la determinación, no sea mayor que el error tipo (o desviación tipo de la media)".

También hemos aplicado el cálculo de la diferencia significativa, para resolver si los resultados de las distintas series de la determinación difieren significativamente, o bien, si la diferencia entre ellos es meramente casual.

$$D_s = \frac{m_1 - m_2}{\sqrt{\Sigma_1^2 + \Sigma_2^2}}$$

donde m_1 y m_2 representan las medias aritméticas y Σ_1 y Σ_2 representan los errores tipos respectivos. "La mayoría de los autores aceptan que si el resultado es 2 o más, la diferencia es significativa".

Aplicando esta fórmula, podemos decir que, entre "Posta Negra" y "Filete"; "Posta Negra" y "Lomo Vetado"; "Lomo Vetado" y "Lomo Liso", existe diferencia significativa, y también la hay entre el contenido de los órganos (Hígado y Riñón) y el de los grupos musculares, porque el resultado es mayor de 2; en cambio no la existe entre Riñón e Hígado.

Finalmente queremos consignar que la cifra media de clorhidrato de tiamina en músculo, es de 0,50 mg. por 100 g., en oposición a la de órganos analizados, en que es de 0,076 mg. por 100 g.

d) La preparación de la escala de tiocromo, debe hacerse a partir de esta substancia, químicamente pura y conservarse en forma adecuada.

Considerada así la aplicación del método del tiocromo, a la determinación de tiamina en carne, podemos decir que las cifras obtenidas por nosotros, tienen la precisión que procura todo método químico.

Por otra parte, las cifras que comunicamos, cuyo término medio es de 0,050 mg. por 100 g., para músculo, concuerdan con las obtenidas por otros autores (18). Llama la atención este hecho, por cuanto las muestras tienen origen distinto, lo que sugiere que los factores externos (calidad del suelo, tipo de alimentación, etc.), tienen una influencia relativa en lo que refiere al mayor o menor contenido de clonhidrato de tiamina de la carne.

2) Los resultados referidos en la presente Tesis, nos indican que la carne muscular constituye también, al lado de los órganos internos, un aporte de vitamina B1.

Las encuestas alimenticias de estudios clínicos y de sectores de la población, indican desgraciadamente, que el consumo de carne en nuestro medio, es reducido.

CUADRO DE LAS DETERMINACIONES.

(MUSCULOS Y ORGANOS FRESCOS)

Porción anatómica	Fecha en que se obtuvo la muestra	Número de determinaciones	mg Clorh. Tiamina por 100 g. — mínima y máxima.	mg Clorh. Tiamina por 100 g. — Media aritmética
1) "Posta Negra"	Abril-Mayo 1945	9	0.042 — 0.072	0.058 (+ 0.0032)
2) "Lomo Liso"	Mayo 1945	10	0.052 — 0.060	0.055 (± 0.0009)
3) "Lomo Vetado"	Mayo-Junio 1945	10	0.044 — 0.052	0.047 (± 0.0008)
4) "Pollo Ganso"	Junio 1945	9	0.046 — 0.054	0.050 (+ 0.0008)
5) "Guachalomo"	Junio 1945	9	0.048 — 0.056	0.052 (± 0.0009)
6) "Asiento de Picana"	Julio 1945	8	0.040 — 0.054	0.047 (± 0.0017)
7) "Plateada"	Julio 1945	8	0.044 — 0.052	0.049 (+ 0.0010)
8) "Filete"	Julio 1945	8	0.042 — 0.048	0.045 (± 0.0009)
9) "Hígado"	Junio 1945	10	0.072 — 0.084	0.078 (+ 0.0012)
10) "Riñón"	Julio 1945	9	0.070 — 0.080	0.075 (± 0.0013)

CAPITULO IV

Discusión

Algunos aspectos del trabajo que hemos realizado, merecen nuestra atención:

1) Queda demostrado que con el método del tiocromo, se puede estimar en forma exacta el contenido de clorhidrato de tiamina de la carne, a la vez que permite hacer mediciones rápidas y en serie. Por otra parte, la sensibilidad misma de esta metodología, es capaz de valorar cantidades tan pequeñas como 0,05 gama, hecho que da consistencia a los resultados obtenidos. Determinaciones previas, en carne de cerdo, que como es sabido contiene grandes cantidades de tiamina (16), nos confirmaron que a la vez, el método permite medir altas concentraciones.

Existen, eso sí, algunas condiciones experimentales que deben seguirse rigurosamente. Nos referimos a las siguientes:

a) La preparación del filtrado, la cual debe liberar toda la vitamina contenida intracelularmente; en este sentido, el uso exclusivo de ácidos no es suficiente, razón por la cual debe asociarse a la acción de fermentos, de acción enzimática general (proteolíticos, amilolíticos, etc.) como el que han usado McIntire, Schweigert, Henderson, Elvehjem (10), entre otros. Nuestros experimentos indican que basta la acción proteolítica, para asegurar que toda la tiamina contenida en la carne, pase al filtrado.

b) El lavado previo con isobutanol, se hace estrictamente necesario, debido a que el filtrado contiene sustancias fluorescentes interferentes, en cantidades apreciables; algunas provienen del fermento mismo. La fluorescencia de la vitamina oxidada (tiocromo) es, en cambio, pequeña. El inconveniente material que significa el gasto elevado de alcohol isobutílico queda subsanado, porque hoy día disponemos de un método rápido para recuperar este reactivo (17), y que consiste en agitar cada 100 cc. de isobutanol con 1,5 g. de carbón vegetal activado, durante 15 a 30 minutos, filtrando en seguida.

c) Hacemos hincapié en el concepto de factor de recuperación de cantidades conocidas de vitamina, agregadas en la preparación del filtrado al cual ha sido enunciado en el Capítulo II.

CAPITULO V

CONCLUSIONES

1) El contenido de corhidrato de tiamina, medido por el método del ticromo, expresado en mg. por 100 grs. de tejido, de los grupos musculares y órganos que se indican a continuación, es el siguiente:

a) Posta Negra	0,058 ($\pm$ 0,0032)
d) Lomo Liso	0,055 ($\pm$ 0,0009)
c) Lomo Vetado	0,047 ($\pm$ 0,0008)
d) Pollo Ganso	0,050 ($\pm$ 0,0008)
e) Guachalomo... ..	0,052 ($\pm$ 0,0009)
f) Asiento de Picana	0,047 ($\pm$ 0,0017)
g) Plateada	0,049 ($\pm$ 0,0010)
h) Filete... ..	0,045 ($\pm$ 0,0009)
i) Hígado... ..	0,078 ($\pm$ 0,0012)
j) Riñón	0,075 ($\pm$ 0,0013)

2) El promedio de vitamina B1 de la carne muscular de vacuno fresca, es 0,050 mg. por 100 g., y el de los órganos analizados: 0,076 mg. por 100 g.

B I B L I O G R A F I A

- 1) Boas Fixen, M. A. y Roscoe M. H., *Nutrit. Abstr. and Rev.*, 9: 795, 1940.
- 2) Booher L. y Hartzler E. R.—“The vitamin B1 content of foods in terms of crystalline thiamine”. *Technical Bulletin N.º 707*, U. S. A. Dept. of Agr. Washington D. C., 1939.
- 3) Stepp W., Kühnau J. und Schroeder: *Die Vitamine und ihre klinische Anwendung*; 2. Aufl., Stuttgart, 1937.
- 4) Guzmán Barrón E. S.—*Advances in Enzymology*, 3: 149, 1943.
- 5) Ochoa S. y Peters R. A., *Biochem. J.*, 32: 1501, 1938.
- 6) Christensen et al., *J. Agric. Res.*, 53: 415, 1936.
- 7) Mc. Intire J. M., Schweigert B. S., Herbst E. J. and Elvehjem C. A., *J. Nutrit.*, 28: 35, 1944.
- 8) Brunet Et. y Dragoni C., *L'Alimentation Populaire au Chile*; “*Revista Chilena de Higiene y Medicina Preventiva*”; vol. 1, N.º 10 a 12; Pág. 407 a 611; Dic. 1938.
- 9) Mardones J. y Cox R.—*La Alimentación en Chile*, 1942.
- 10) Mc. Intire J. M., Schweigert B. S., Henderson L. M. and Elvehjem C. A., *J. Nutrit.*, 25: 145, 1943.
- 11) Melnick D. and Field H., *J. Biol. Chem.*, 127: 535, 1939.
- 12) Gundlach A., *Valoración Química de Vitamina B1*. Tesis, Universidad de Chile, 1943.
- 13) Elgaña E. and Meiklejohn A. P., *J. Biol Chem.*, 141: 895, 1941.
- 14) Elgaña y colaboradores, *Am. J. Physiol.*, 137: 731, 1942.
- 15) Sociedad de Biología de Santiago.—“*Normas para la publicación de trabajos*”; Dic. 1944.
- 16) Harrington C. R., *Biochem. J.*, 34: 1341, 1940.
- 17) Pader M., *Ind. and Engin. Chem.*, 15: 25, 1943.
- 18) Hinman W., Halliday E. and Brooks M., *Ind. and Engin Chem.*, 16: 116, 1944.

