

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE SAN LUIS POTOSI

ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS



Obtención de Grenetina a partir de la
Hidrólisis parcial del Colageno de
Pielés, Tendones y Huesos.

TRABAJO RECEPCIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
Q U I M I C O

P R E S E N T A

Ma. de las Mercedes Ramírez Díez Gutiérrez

SAN LUIS POTOSI, S. L. P.

1 9 7 4

Con cariño y gratitud

A mis padres:

Dr. Ignacio Ramírez Hernández

Mercedes Díez Gutiérrez de Ramírez

A mis hermanos:

Martha Elena, Pilar, Ma. de Lourdes,

Ma. Concepción, Ma. Teresa, Ignacio

y Javier.

A mis familiares

A Alejandro

A mis maestros

A mis compañeros y amigos

Deseo expresar mi agradecimiento:

Al Sr. Antonio Barral P.

Al Sr. Luis Costanzo P.

Al Sr. Ing. Miguel García Maldonado

por su cooperación en la elaboración de este trabajo.

A los investigadores y al personal del Instituto de Investigación de Zonas Desérticas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

En especial, al Dr. Aldo Torre Florenzano, Jefe del Laboratorio de Fitoquímica del I.I.Z.D., que con su valiosa ayuda y asesoramiento hizo posible la realización de este trabajo.

INDICE

Capítulo I.- INTRODUCCION.

Capítulo II.- PARTE EXPERIMENTAL.

A) Material y Métodos.

B) Control de Calidad.

- Análisis físico.

- Análisis químico.

- Análisis físico-químico.

Capítulo III.- RESULTADOS.

Capítulo IV.- DISCUSION Y CONCLUSIONES.

Capítulo V.- BIBLIOGRAFIA.

CAPITULO I

Introducción.

INTRODUCCION.

Por medio de técnicas especiales, es factible aprovechar hoy en día, una amplia variedad de productos derivados de procesos primarios de fabricación, que anteriormente no eran utilizados.

Uno de esos productos es la Grenetina, que se obtiene por hidrólisis selectiva del colágeno, constituyente de las pieles, tendones y huesos de los animales.

La Grenetina es de gran utilidad en la Industria Alimenticia, en la Industria Farmacéutica, en la Industria de la Confitería, en la Industria Fotográfica, en la Industria de Adhesivos, etc. En ésta última, se utilizan "colas" que se obtienen por la hidrólisis de materias primas que contienen colágeno de un tipo bastante menos refinado. En la Industria Fotográfica se usa la Grenetina que se extrae de las pieles de cerdo, por ser de gran pureza.

El consumo de Grenetina en México, proviene de 3 focos industriales, los cuales se encuentran en el Estado de Guanajuato, en el Estado de Jalisco y en el Distrito Federal; sin embargo, existe un volumen muy bajo de producción, por lo cual se tiene que cubrir con importaciones.

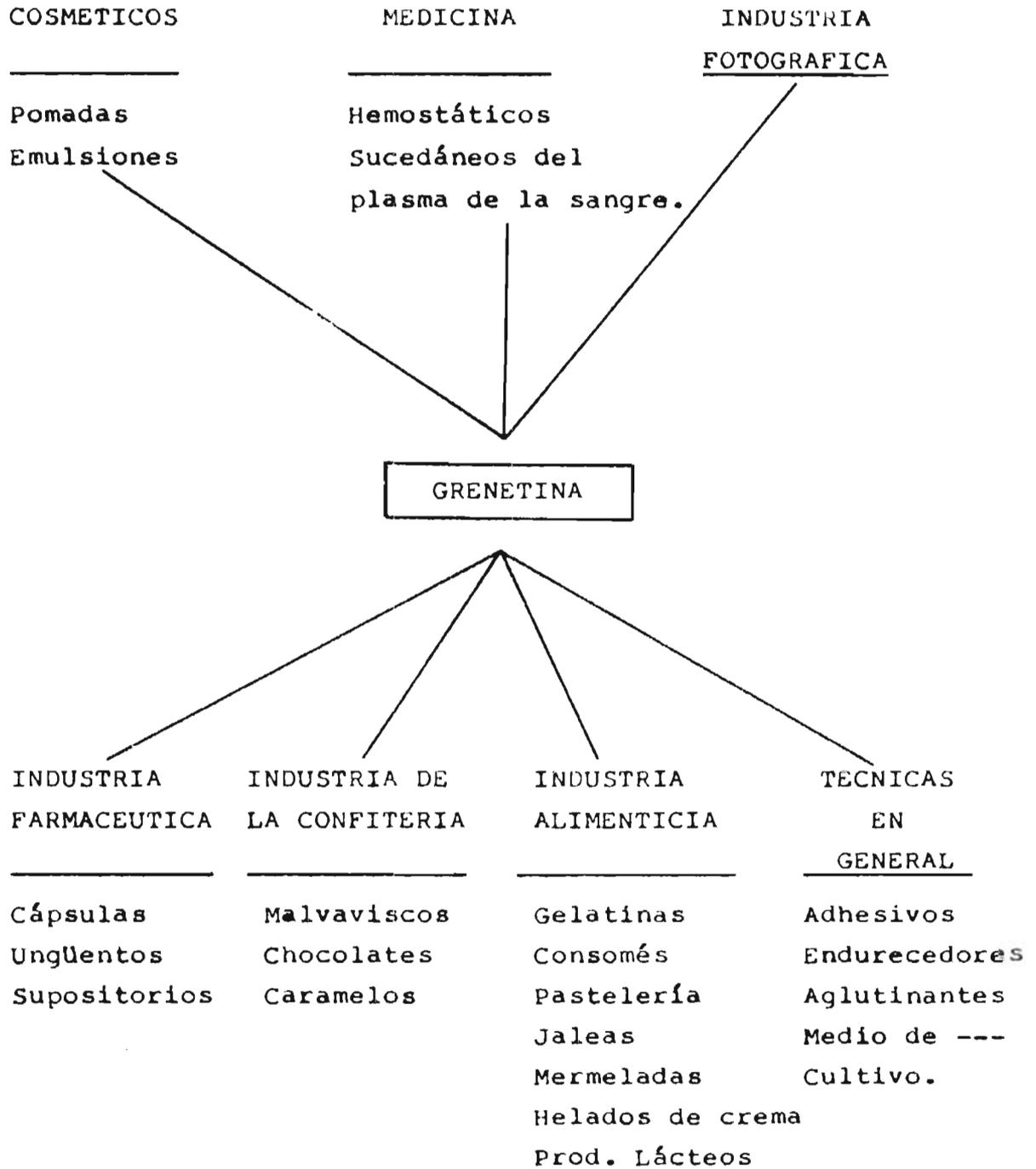
En la actualidad la Grenetina tiene gran demanda Nacional, se importa principalmente de los siguientes países productores: Estados Unidos, Argentina, Reino Unido, Alemania, Francia, etc. El costo y volumen de estas importaciones (DIRECCION GENERAL DE ESTADISTICA S.I.C.), ha sido:

<u>Año</u>	<u>Cantidad</u>	<u>Costo</u>
1966	278,261 Kg.	\$ 4,653,754.00
1967	207,778 Kg.	\$ 4,524,192.00
1968	67,289 Kg.	\$ 1,484,195.00
1969	267,286 Kg.	\$ 5,245,162.00
1970	347,714 Kg.	\$ 7,183,833.00
1971	455,772 Kg.	\$ 12,740,504.00

En el Estado de San Luis Potosí, en la Zona Media y - en la Zona de la Huasteca, podría ser factible el establecimiento de esta Industria, ya que se dispone de la materia prima requerida para su instalación.

Esperamos que el presente trabajo, efectuado en el Laboratorio de Fitoquímica del Instituto de Investigación de Zonas Desérticas de la Universidad Autónoma de San Luis -- Potosí, sea de utilidad práctica para toda aquella persona interesada en el estudio realizado.

APLICACIONES INDUSTRIALES DE LA GRENETINA



CAPITULO II

Parte experimental

A) Material y Métodos.

A) MATERIAL Y METODOS.

Material.

La materia prima, constituida por el colágeno, que frecuentemente se clasifica como escleroproteína, es el principal componente proteínico intercelular del tejido conectivo de pieles, tendones y huesos de varios animales domésticos como el buey, Bos taurus Linn., la oveja, Ovis aries Linn., etc. familia de los Bóvidos, todos pertenecientes al orden Artiodactyla, de la clase de los Mamíferos. (WALLIS, T.E.).

Preparación del material.

Para la extracción de Grenetina, se utilizó como materia prima "carnaza" de res, la cual nos fué proporcionada por la Curtiduría Barral de la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P.

Esta fué cortada en fracciones de \pm 6 x 6 cm. y se sometió a un tratamiento preliminar llamado "encalado" -- (este procedimiento consiste en macerar durante 3 semanas en una solución de cal al 15%, la materia prima y sirve para disolver la materia carnosa y saponificar las grasas). Posteriormente se llevó a un lavado en agua, agregando fracciones de Acido Clorhídrico al 10% para completar la eliminación de la cal y enseguida nuevamente se lavó con agua.

Método.

El método empleado de extracción, está basado en el descrito por KIRK, Raymond E. y OTHMER, Donald F., al que hemos efectuado ciertas variantes en razón al equipo del-

que disponíamos.

Descripción del método.

Se pesaron 500g. del material tratado y fueron colocados en un vaso de precipitado de tamaño adecuado, para hidrolizarlo parcialmente con Acido Clorhídrico al 10%, - ajustando la solución a un pH de 4.5 ± 0.5 ; el tiempo empleado en la hidrólisis fué de 6 horas a una temperatura de 55° - 65° C. (teniendo el cuidado de no exceder en la misma, ya que ésto daría por resultado la alteración de la Grenetina).

Posteriormente, el hidrolizado se filtró en caliente sobre lienzo, se continuó con un proceso de blanqueado, - utilizando Peróxido de Hidrógeno al 33%. (Por cada 100 ml de solución extractiva, se utilizó 1 ml. de Peróxido de Hidrógeno al 33%). A continuación por filtración fueron separadas las impurezas que resultaron.

El líquido claro obtenido, se concentró en un 80%, - dando por resultado una solución que presenta gran viscosidad, la que se colocó sobre papel de "celofán" para --- efectuar su secado en exposición directa a los rayos del sol y al aire del medio ambiente. El producto así obtenido produjo un rendimiento de 4.73% (23.65g.) de Grenetina; la cual se presenta en delgadas películas de color -- amarillo pálido.

B) Control de Calidad.

- Análisis físico
- Análisis químico
- Análisis físico-químico.

B) CONTROL DE CALIDAD.

Es importante efectuar la investigación y cuanteo - de Dióxido de Azufre, Arsénico y Metales Pesados en el - producto, ya que éstos pueden ser factor de intoxicación si se les encuentra en niveles de concentración altos; - siendo la Grenetina un producto ampliamente utilizado, - es requisito indispensable el efectuar estos análisis en todo trabajo.

Reportes bibliográficos (ROSE, A. y ROSE, E.) nos - indican que los límites de humedad en Grenetina, corres- ponden a 8 - 15 % y en cenizas a 2 - 3 %.

Análisis Físico.

La determinación de cada uno de los respectivos aná- lisis, fueron efectuados en Grenetina obtenida, Greneti- na de 1^a "testigo" y Grenetina de 2^a "testigo".

1.- Determinación de Humedad.

En una cápsula de porcelana de fondo plano, previa- mente tarada, fueron colocados 2g. de muestra, llevándo- se a continuación a la estufa a 98°- 105°C. durante 5 ho- ras hasta obtener peso constante. Posteriormente la -- cápsula con el contenido de muestra fué llevada a un de- secador y una vez que adquirió la temperatura del Labora- torio, se pesó.

Cálculos:

Muestra de Grenetina problema.

Peso de la cápsula vacía - 28.235g.

Peso de la muestra	-	2.000g.
Peso de la cápsula + muestra	-	30.235g.
Peso de la cápsula + muestra después de desecar.	-	29.950g.
Pérdida de peso por pérdida de humedad.	-	0.285g.
Por ciento de humedad	-	14.25

Muestra de Grenetina de 1^a "testigo".

Peso de la cápsula vacía	-	28.240g.
Peso de la muestra	-	2.000g.
Peso de la cápsula + muestra	-	30.240g.
Peso de la cápsula + muestra después de desecar.	-	30.032g.
Pérdida de peso por pérdida de humedad.	-	0.208g.
Por ciento de humedad	-	10.40

Muestra de Grenetina de 2^a "testigo".

Peso de la cápsula vacía	-	30.014g.
Peso de la muestra	-	2.000g.
Peso de la cápsula + muestra	-	32.014g.
Peso de la cápsula + muestra después de desecar.	-	31.815g.
Pérdida de peso por pérdida de humedad.	-	0.199g.
Por ciento de humedad	-	9.95

2.- Determinación de Cenizas totales.

5g. de muestra fueron colocados en un crisol de porcelana, previamente tarado. Un proceso de carbonización preliminar, fué efectuado con ayuda de un mechero de "Bunsen" y una vez terminado éste, se prosiguió a llevar la muestra a una mufla, a una temperatura de 600°C. hasta obtener cenizas blancas. El crisol fué llevado a un desecador y una vez que adquirió la temperatura del Laboratorio, se pesó.

Cálculos:

Muestra de Grenetina problema.

Peso del crisol vacío	=	25.671g.
Peso de la muestra	=	5.000g.
Peso del crisol + muestra	=	30.671g.
Peso del crisol + muestra después de haber llevado a la mufla a 600°C. durante 5 horas.	=	25.730g.
Peso de cenizas totales	=	0.059g.
Porcentaje de cenizas	=	1.18

Muestra de Grenetina de 1^a "testigo".

Peso del crisol vacío	=	21.520g.
Peso de la muestra	=	5.000g.
Peso del crisol + muestra	=	26.520g.
Peso del crisol + muestra después de haber llevado a la mufla a 600°C. durante 5 horas.	=	21.590g.

Peso de cenizas totales	=		0.070g.
Por ciento de cenizas	=	1.40	

Muestra de Grenetina de 2^a "testigo".

Peso del crisol vacío	=		21.595g.
Peso de la muestra	=		5.000g.
Peso del crisol + muestra	=		26.595g.
Peso del crisol + muestra después de haber llevado a la mufla a 600°C. duran- te 5 horas.	=		21.690g.
Peso de cenizas totales	=		0.095g.
Por ciento de cenizas	=	1.90	

3.- Prueba de Absorción de Agua.

La Grenetina es insoluble en agua fría, pero se hincha y ablanda cuando se sumerge en ella, absorbiendo gradualmente de 5 a 10 veces su peso de agua. (CONVENCION DE LA FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS, Inc.).

1g. de Grenetina se colocó en una probeta graduada de 20 ml., se aforó con agua y se mezcló bien. Se dejó en reposo durante 24 horas, se filtró el contenido de la probeta a través de lana de vidrio humectada; recibiendo el agua filtrada en otra probeta de 20 ml.

Volumen de agua absorbido en Grenetina problema.	-	5.5ml.
Volumen de agua absorbido en Grenetina de 1 ^a "testigo".	-	15.0ml.
Volumen de agua absorbido en Grenetina de 2 ^a "testigo".	-	17.0ml.

4.- Consistencia de Gel.

1g. de Grenetina y 99 ml. de agua, fueron colocados en un matraz Erlenmeyer, se dejó en reposo durante 15 minutos, llevando enseguida a B.M. y a una temperatura de -60°C . y efectuando de tiempo en tiempo una agitación del matraz hasta obtener una disolución total del producto. - Una vez logrado ésto, 10 ml. de la solución fueron transferidos a un tubo de ensayo, cuyo diámetro interno fué de 12 mm. (CONVENCION DE LA FARMACOEPA DE LOS ESTADOS UNIDOS Inc.) El tubo fué colocado en baño de hielo y mantenido durante 6 horas a una temperatura de 0°C . Una vez transcurrido el lapso de tiempo antes indicado, es retirado el tubo del baño de hielo, fué invertido éste y no se observó algún movimiento del gel. Por lo anterior observado, resultó la prueba positiva en las muestras de Grenetina.

Análisis Químico. (Cualitativo)

Los análisis siguientes nos sirven para la identificación de proteínas.

a) Al ser tratada la Grenetina con una solución de Trinitrofenol o de Dicromato de Potasio, se produce un precipitado amarillo. (CONVENCION DE LA FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS, Inc.).

A 1g. de Grenetina disuelto en 100 ml. de agua hirviente, se le agregaron 50 ml. de una solución de Trinitrofenol al 1%, produciéndose un precipitado de color amarillo.

A 1g. de Grenetina disuelto en 100 ml. de agua hirviente, se le agregaron 50 ml. de una solución de Dicromato de Potasio al 1%, previamente mezclada con 25 ml. de Acido Clorhídrico al 10%. Se obtuvo un precipitado muy fino de color amarillo pálido.

b) Al agregar a una solución de Grenetina, unas gotas de Acido Tánico, se produce una turbiedad. (CONVENCION DE LA FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS, Inc.).

10 ml. de una solución de Grenetina al 1%, fué tratada con 10 gotas de una solución de Acido Tánico al 1%, -- produciéndose una turbiedad en la solución.

c) La Grenetina debe estar libre de Condrina, misma que se forma a partir del condrinógeno del tejido conectivo.-- La ausencia de Condrina en la Grenetina, se demuestra por la solubilidad de ésta en Acido Acético. Además la so--

lución acuosa de la Grenetina no produce precipitado con el Cloruro Férrico. (WALLIS, T.E.).

500 mg. de Grenetina fueron disueltos en 30 ml. de Acido Acético.

1 ml. de solución de Grenetina al 1% y 10 gotas de solución de Cloruro Férrico, no produjeron ningún precipitado.

d) Reacción Xantoprotéica. Caracteriza ciertos grupos aromáticos en proteínas. El Acido Nítrico con la Grenetina en solución, produce una coloración amarilla que -- pasa a naranja por la adición de Hidróxido de Amonio. (BALANSARD, J. et BERNARD, P.).

1 ml. de Acido Nítrico fué agregado a una solución de Grenetina, observándose una coloración amarilla que -- cambió a naranja por la adición de Hidróxido de Amonio.

e) Reacción de Biuret. Caracteriza la función del enlace peptídico y la función aminada. Al ser tratada una solución de Grenetina, la cual contiene enlaces peptídicos en su molécula, produce en solución alcalina, un precipitado de color violeta característico, con Sulfato -- Cúprico. (BALANSARD, J. et BERNARD, P.).

1 ml. de solución de Grenetina fué alcalinizada con 4 ml. de solución de Hidróxido de Sodio concentrada y le fueron añadidas unas gotas de solución de Sulfato Cúprico al 1%. Observándose un precipitado de color violeta en la solución.

Análisis Químico. (Cuantitativo).

Determinación de Nitrógeno Total.

El método usado para la determinación, consiste en la oxidación de la materia orgánica con Acido Sulfúrico y la liberación del Amoníaco con Hidróxido de Sodio. (HORWITZ, William). Siendo de gran utilidad, para conocer la cantidad protéica, presente en el producto.

Técnica:

1g. de muestra se colocó en un matraz Kjeldahl; 0.7g. de Oxido Mercúrico libre de Nitrógeno, 15g. de Sulfato sódico anhidro y 25 ml. de Acido Sulfúrico concentrado le fueron agregados. El matraz en posición inclinada, se llevó a un calentamiento suave hasta que cesó de hacer espuma (30 minutos). Se continuó la digestión con flama alta, hasta obtener una solución incolora. Enseguida se enfrió el matraz Kjeldahl, se añadieron 200 ml. de agua destilada y 25 ml. de solución de Tiosulfato de Sodio, para la precipitación del Mercurio. Una vez logrado esto lo cual se presenta por la coloración negra que adquiere el precipitado, le fueron suministrados sin agitar, a la solución, pequeñas cantidades de Zinc en polvo y 25g. de Hidróxido de Sodio. El matraz es conectado inmediatamente a un refrigerante para continuarse el proceso de destilación.

50 ml. de Acido Clorhídrico 0.450 N. y 2 gotas de Rojo de Metilo al 0.2% como indicador, nos sirvieron de receptores del Amoníaco liberado durante la destilación.

Concluida la destilación, se retiró el matraz receptor y se tituló el destilado con Hidróxido de Sodio 0.51 N.

Cálculos:

Muestra de Grenetina problema.

Volumen de NaOH 0.51 N. gastado en la titulación = 27 ml.

50 ml. HCl 0.450 N. = 22.500 ml.N.

27 ml. NaOH 0.510 N. = 13.770 ml.N.

8.730 ml.N.

$$\% = \frac{\text{ml.} \times \text{N.} \times \text{m.e.} \times 100}{\text{P.}}$$

en donde:

m.e. = miliequivalente de la sustancia que se determinó.

ml. = volumen empleado en la titulación.

N. = normalidad de la solución usada.

P. = peso de la muestra, en gramos.

$$\% \text{ N} = \frac{8.73 \text{ ml.N.} \times 0.014 \times 100}{1\text{g.}}$$

$$\% \text{ N} = 12.22$$

$$\% \text{ Proteínas} = 76.38$$

Muestra de Grenetina de 1^a "testigo".

Volumen de NaOH 0.51 N. gastado en la titulación = 25 ml.

50 ml. HCl 0.450 N. = 22.500 ml.N.

25 ml. NaOH 0.510 N. = 12.750 ml.N.

9.750 ml.N.

$$\% = \frac{\text{ml.} \times \text{N.} \times \text{m.e.} \times 100}{\text{P.}}$$

en donde:

m.e. = miliequivalente de la sustancia que se determinó.
ml. = volumen empleado en la titulación.
N. = normalidad de la solución usada.
P. = peso de la muestra, en gramos.

$$\% N = \frac{9.750 \text{ ml.N.} \times 0.014 \times 100}{1\text{g.}}$$

$$\% N = 13.65$$

$$\% \text{ Proteínas} = 85.31$$

Muestra de Grenetina de 2^a "testigo".

Volumen de NaOH 0.510 N. gastado en la titulación = 26 ml.

50 ml. HCl 0.450 N. = 22.500 ml.N.

26 ml. NaOH 0.510 N. = 13.260 ml.N.

9.240 ml.N.

$$\% = \frac{\text{ml.} \times \text{N.} \times \text{m.e.} \times 100}{\text{P.}}$$

en donde:

m.e. = miliequivalente de la sustancia que se determinó.

ml. = volumen empleado en la titulación.

N. = normalidad de la solución usada.

P. = peso de la muestra, en gramos.

$$\% N = \frac{9.240 \text{ ml.N.} \times 0.014 \times 100}{1\text{g.}}$$

$$\% N = 12.93$$

$$\% \text{ Proteínas} = 80.85$$

Determinación de Sulfito.

Método Gravimétrico. (como Sulfato de Bario).

Técnica:

En un matraz de fondo redondo y cuello largo, fueron colocados 20g. de Grenetina con 150 ml. de agua destilada caliente; una vez disuelto el material en estudio, se le agregó 5 ml. de Acido Fosfórico y 1g. de Bicarbonato de Sodio, conectando inmediatamente un refrigerante, para destilar 50 ml. El destilado fué recibido en 50 ml. de solución acuosa de Yodo 0.1 N., este destilado se acidificó (pH 4.5) con Acido Clorhídrico concentrado, y agregando a continuación 2 ml. de solución de Cloruro de Bario y llevando a B.M. hasta que el líquido quedó casi incoloro.

El precipitado de Sulfato de Bario en caso de estar presente, se filtra, se lava y se incinera. (CONVENCION DE LA FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS, Inc.).

En esta determinación, no se observó presencia alguna de Sulfato de Bario, en cada una de las muestras de Grenetina ensayadas.

Una prueba complementaria de tipo cualitativo, fué efectuada para mayor seguridad de nuestro análisis. La prueba consiste en :

5g. de muestra, 30 ml. de agua y 2 ml. de Acido Fosfórico, fueron calentados 15 minutos a B.M. Un papel filtro humedecido con Yodato de Potasio, secado posteriormente, vuelto a humedecer con solución de almidón al 0.2% y vuelto a secar; fué colocado en la boca del matraz. En caso de estar presentes los sulfitos, el papel adquiere un color púrpura.

Los resultados por nosotros obtenidos en ésta prueba, fueron negativos.

Determinación de Metales Pesados.

Método Colorimétrico.

Este ensayo nos determinó el contenido en impurezas metálicas que son coloreadas por el Acido Sulfhídrico, -- expresado en términos, de partes (en peso) de Plomo por millón, según lo indica una comparación paralela de una solución tipo de Plomo. (CONVENCION DE LA FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS, Inc.).

Una solución de concentración conocida de Plomo fué preparada, utilizando Nitrato de Plomo, en tal forma de que 0.1 ml. de solución correspondiera a 1 parte de Plomo por millón.

Técnica:

Al residuo obtenido en la prueba para Cenizas totales, se le agregaron 2 ml. de Acido Clorhídrico concentrado y 0.5 ml. de Acido Nítrico concentrado, evaporándose hasta sequedad en B.M. Al producto obtenido se le agregó 1 ml. de Acido Clorhídrico 1 N. y 15 ml. de agua; se calentó algunos minutos, se filtró y lavó con agua hasta obtener en el filtrado 50 ml. Posteriormente 25 ml. del filtrado anterior fueron colocados en un tubo de Nessler. Formándose una serie de estos tubos, fueron agregados 2 ml. de Acido Acético diluido y diferentes cantidades de solución tipo de Plomo, agregando agua hasta obtener un volumen de 25 ml.

Simultáneamente 10 ml. de una solución acuosa de Acido Sulfhídrico, se colocaron en cada tubo, mezclando y dejando reposar durante 10 minutos. Posteriormente se comparó el color obtenido sobre una superficie blanca.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Para la Grenetina problema = 12 p.p.m. de Pb.
Para la Grenetina de 1^a "testigo". = 10 p.p.m. de Pb.
Para la Grenetina de 2^a "testigo". = 25 p.p.m. de Pb.
% Metales Pesados en Grenetina problema = 0.012
% Metales Pesados en Grenetina de 1^a "testigo" = 0.010
% Metales Pesados en Grenetina de 2^a "testigo" = 0.025

Determinación de Fósforo.

Método Gravimétrico. (como Pentóxido de Fósforo).

Técnica:

Se trataron las cenizas totales con 2 ml. de Acido Nítrico concentrado, evaporando a sequedad en B.M. Se tomó el residuo con agua caliente conteniendo unas gotas de Acido Nítrico. Se transfirió una cantidad de 10 ml. de la solución preparada, a un vaso de precipitado, agregándose Hidróxido de Amonio en exceso. Se calentó la solución agregando simultáneamente 70 ml. de solución de Molibdato de Amonio. Se llevó a digestión 1 hora a una temperatura de 65°C., hasta completa precipitación de Pentóxido de Fósforo. A continuación se filtró, se lavó y enseguida se disolvió el precipitado con Hidróxido de Amonio (1:1) y agua caliente. Posteriormente se neutralizó y se agregaron lentamente 15 ml. de Mixtura Magnésiana, - adicionando 12 ml. de Hidróxido de Amonio concentrado y se dejó reposar 2 horas. Se filtró, lavó el precipitado con Hidróxido de Amonio (1:9) y se incineró a 950°- 1000° C.

No se observó la presencia del precipitado de Pirofosfato de Magnesio, en las muestras de Grenetina.

Determinación de Arsénico.

Método complejométrico.

El Arsénico, para su determinación debe encontrarse en forma de Arseniato y se precipita así en solución valorada de Sal Magnésica, titulando el exceso de ésta en una porción del filtrado. (MERCK, E.).

Técnica:

10g. de Grenetina se disolvieron en 100 ml. de agua --- hirviente, a continuación se mezcló con 1g. de Cloruro de --- Amonio y 5 ml. de Hidróxido de Amonio concentrado, enseguida le fueron agregadas unas gotas de Peróxido de Hidrógeno al --- 33%, eliminando el exceso de éste, por ebullición. Poste--- riormente le fueron suministrados 25 ml. de solución 0.1 M.--- de Sulfato de Magnesio, se agitó la solución varias veces y se dejó reposar. Se filtró y se tomaron varias porciones --- de 20 ml. para la titulación por complejometría del exceso --- de Sulfato de Magnesio presente en el filtrado. Finalmente se tituló con solución 0.103 M. de la sal disódica dihidra--- tada del Acido Etilendiamino Tetraacético, utilizando 15 go--- tas de solución reguladora (Hidróxido de Amonio-Cloruro de --- Amonio) de pH 10 y 3 gotas de Negro de Eriocromo T como in--- dicador.

Cálculos:

Muestra de Grenetina problema.

Peso de la muestra en 20 ml. de solución = 1.6g.

Volumen de $MgSO_4$ 0.1 M. en 20 ml. de solución = 4.0 ml.

Volumen de EDTA. 0.103 M.
gastado en la titulación = 5.71 ml. (Ca+Mg)

Volumen de EDTA. 0.103 M. -
gastado en la titulación = $\frac{1.64 \text{ ml. (Ca)}}{4.07 \text{ ml. (Mg)}}$

4.0 ml. MgSO_4 x 0.105 M. = 0.420 ml.M.

4.07 ml. EDTA. x 0.103 M. = $\frac{0.41921 \text{ ml.M.}}{0.00079 \text{ ml.M. (Mg que reaccionó con As)}}$

0.00079 ml.M. (Mg que reaccionó
con As).

1 ml. EDTA. 0.1 M. = 1 ml. MgSO_4 0.1 M.
= 7.492 mg. As

0.00079 ml.M. = 0.0574 mg. As

% As = 0.003

Muestra de Grenetina de 1^a "testigo".

Peso de la muestra en 20 ml. de solución = 1.6g.

Volumen de MgSO_4 0.1 M. en 20 ml. de solución = 4.0 ml.

Volumen de EDTA. 0.103 M.

gastado en la titulación = 5.12 ml. (Ca+Mg)

Volumen de EDTA. 0.103 M. -

gastado en la titulación = $\frac{1.05 \text{ ml. (Ca)}}{4.07 \text{ ml. (Mg)}}$

4.0 ml. MgSO_4 x 0.105 M. = 0.420 ml.M.

4.07 ml. EDTA. x 0.103 M. = $\frac{0.41921 \text{ ml.M.}}{0.00079 \text{ ml.M. (Mg que reaccionó con As)}}$

0.00079 ml.M. (Mg que reaccionó
con As).

1 ml. EDTA. 0.1 M. = 1 ml. MgSO_4 0.1 M.
= 7.492 mg. As
0.00079 ml. M. = 0.0574 mg. As

% As = 0.003

Muestra de Grenetina de 2^a "testigo".

Peso de la muestra en 20 ml. de solución = 1.6g.

Volumen de MgSO_4 0.1 M. en 20 ml. de solución = 4.0 ml.

Volumen de EDTA. 0.103 M.

gastado en la titulación = 6.30 ml. (Ca+Mg)

Volumen de EDTA. 0.103 M. -

gastado en la titulación = 2.23 ml. (Ca)

4.07 ml. (Mg)

4.0 ml. MgSO_4 x 0.105 M. = 0.420 ml.M.

4.07 ml. EDTA. x 0.103 M. = 0.41921 ml.M.

0.00079 ml.M. (Mg que reaccionó
con As).

1 ml. EDTA. 0.1 M. = 1 ml. MgSO_4 0.1 M.
= 7.492 mg. As
0.00079 ml.M. = 0.0574 mg. As

% As = 0.003

Determinación de Calcio.

Método complejométrico.

Técnica:

20 ml. del filtrado de la determinación anterior fueron alcalinizados con Hidróxido de Sodio 4 N. hasta obtener un pH de 12, a continuación se le agregó Murexida como indicador y se tituló con solución 0.103 M. de EDTA.

Cálculos:

Muestra de Grenetina problema.

Volumen de EDTA 0.103 M. gastado en la titulación = 1.64 ml.

Peso de la muestra en 20 ml. de solución = 1.6g.

$$\% = \frac{\text{ml.} \times \text{M.} \times \text{milimol} \times 100}{\text{P.}}$$

en donde:

milimol = milimol de la sustancia que se determinó.

ml. = volumen empleado en la titulación.

M. = molaridad de la solución usada.

P. = peso de la muestra, en gramos.

$$\% \text{ Ca} = \frac{1.64 \text{ ml.} \times 0.103 \text{ M.} \times 0.040 \times 100}{1.6\text{g.}}$$

$$\% \text{ Ca} = 0.422$$

Muestra de Grenetina de 1^a "testigo".

Volumen de EDTA 0.103 M. gastado en la titulación = 1.05 ml.

28.

Peso de la muestra en 20 ml. de solución = 1.6g.

$$\% = \frac{\text{ml.} \times \text{M.} \times \text{milimol} \times 100}{\text{P.}}$$

en donde:

milimol = milimol de la substancia que se determinó.

ml. = volumen empleado en la titulación.

M. = molaridad de la solución usada.

P. = peso de la muestra, en gramos.

$$\% \text{ Ca} = \frac{1.05 \text{ ml.} \times 0.103 \text{ M.} \times 0.040 \times 100}{1.6\text{g.}}$$

$$\% \text{ Ca} = 0.270$$

Muestra de Grenetina de 2^a "testigo".

Volumen de EDTA 0.103 M. gastado en la titulación = 2.23 ml.

Peso de la muestra en 20 ml. de solución = 1.6g.

$$\% = \frac{\text{ml.} \times \text{M.} \times \text{milimol} \times 100}{\text{P.}}$$

en donde:

milimol = milimol de la substancia que se determinó.

ml. = volumen empleado en la titulación.

M. = molaridad de la solución usada.

P. = peso de la muestra, en gramos.

$$\% \text{ Ca} = \frac{2.23 \text{ ml.} \times 0.103 \text{ m.} \times 0.040 \times 100}{1.6\text{g.}}$$

$$\% \text{ Ca} = 0.574$$

Análisis Físico-Químico.

Determinación de Viscosidad.

La viscosidad que presentó una solución de Grenetina a un determinado pH, se determinó en la Industria Química-Delgar, S.A. de la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P.

Esta determinación se efectuó en "Copa Ford" No. 4, — obteniendo resultados, con la ayuda de tablas comparativas de viscosidades.

Tabla de viscosidades. a 25°C.

20 segundos	50 centipoises
24 segundos	65 centipoises
28 segundos	85 centipoises
31 segundos	100 centipoises
36.5 segundos	125 centipoises

Técnica:

Muestra de Grenetina problema.

24g. de Grenetina se disolvieron en 100 ml. de agua — hirviente, siendo el pH de la solución de 6 se enfrió ésta a una temperatura de 25°C. manteniéndose constante durante la determinación. Posteriormente se vertió la solución en la copa, siendo de 20 segundos el tiempo que empleó en pasar. La viscosidad obtenida fué de 50 centipoises.

Muestra de Grenetina de 1^a "testigo".

6g. de Grenetina se disolvieron en 100 ml. de agua — hirviente, siendo de 5 el pH de la solución, se enfrió ésta a una temperatura de 25°C. manteniéndose constante durante la determinación. Posteriormente se vertió la solu--

ción en la copa, siendo de 25 segundos el tiempo que empleó en pasar. La viscosidad obtenida fué de 70 centipoises.

Muestra de Grenetina de 2^a "testigo".

24g. de Grenetina se disolvieron en 100 ml. de agua hirviente, siendo el pH de la solución de 5, se enfrió ésta a una temperatura de 25°C. manteniéndose constante durante la determinación. Posteriormente se vertió la solución en la copa, siendo de 20 segundos el tiempo que empleó en pasar. La viscosidad obtenida fué de 50 centipoises.

CONTROL DE CALIDAD POR CROMATOGRAFIA
EN CAPA DELGADA.

Análisis Químico. (Cualitativo)

Después de hidrolizar la Grenetina con Acido Clorhídrico.

Las reacciones específicas que a continuación se describen, fueron efectuadas en el extracto obtenido en la hidrólisis de la Grenetina problema y Grenetina de 1^a -- "testigo".

a) Reacción de Biuret. La prueba se efectuó de la manera citada anteriormente. Observándose un precipitado de color azul, lo cual nos demostró la ruptura del enlace -- peptídico.

b) Reacción de la Ninhidrina. Caracteriza el grupo NH_2 - en α en relación al grupo CO.OH . Unas gotas de solución de Ninhidrina al ser agregadas a una solución de Aminoácidos, aparece una coloración violeta en la solución. (BALANSARD, J. et BERNARD, P.).

Se adicionó a una solución de Grenetina hidrolizada, unas gotas de solución al 1% de Ninhidrina y se llevó a ebullición algunos segundos; se observó en la solución -- una coloración azul violeta, demostrando la presencia de Aminoácidos.

c) Reacción Xantoprotéica. Se determinó de la manera citada anteriormente, la cual según los datos obtenidos, -- nos dió resultados positivos en las muestras.

d) Reacción de Millon. Está en relación con la función-fenol y el compuesto tirosina. Para esta reacción, se emplea el reactivo del mismo nombre, que es una solución de Nitrato Mercuríco y Mercuroso. El cual da un preci-

pitado blanco que por la acción del calor, toma un color-rosa en presencia de Tirosina o Fenoles. (MURILLO, Héc---tor).

2 ml. del reactivo de Millon fueron agregados a una-solución de Grenetina hidrolizada. Observándose la apa-rición de un precipitado blanco, que durante un calenta--miento no cambió a un color rosa.

Identificación de los Aminoácidos presentes en la Grenetina.

(Por Cromatografía Bidimensional en capa delgada).

Preparación del extracto.

1g. de Grenetina fué colocado en un matraz Erlenmeyer, se le agregaron 50 ml. de Acido Clorhídrico al 5%, - se llevó a reflujo en B.M. durante 14 horas, para lograr una hidrólisis completa. Una vez terminada ésta, el líquido se concentró a presión reducida, hasta obtener un volumen de 10 ml.

Preparación de las placas.

En la Cromatografía se emplearon placas de vidrio de 20 x 20 cm., sobre las cuales se extendió Gel de Sílice - G. de 250 micras de espesor, por medio del extensor descrito por Stahl. (RANDERATH, Kurt).

Para la preparación de las capas se utilizó: 30g. de Sílica "G" (Merck) y 60 ml. de agua destilada. Las placas se secaron a la temperatura ambiente del Laboratorio (12 horas aproximadamente) y fueron utilizadas después de haberse activado en la estufa a $100^{\circ} \pm 5^{\circ}C.$, durante 30 minutos. Con la ayuda de una micropipeta se aplicó 1 microlitro del extracto.

Para la primera dimensión, el sistema de solventes empleado fué:

Cloroformo / Metanol / Amoníaco al 17% (2-2-1 v/v). Solvente I.

Para la segunda dimensión, el sistema fué:

Fenol / Agua (75-25 p/p). Solvente II

El desarrollo de las placas se efectuó en cuba saturada.

La temperatura fué de $23^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

El tiempo de migración en el primer sistema fué de 120 minutos en 15 cm.

El tiempo de migración en el segundo sistema fué de 3 ho-ras en 15 cm.

Se utilizó como revelador, Ninhidrina al 0.2% en solución acetónica.

Para la identificación de los Aminoácidos, se utilizaron testigo en solución acuosa al 0.5%, de cada uno de los -- Aminoácidos siguientes:

Lisina, Arginina, Prolina, Glicina, Serina, Alanina, Treonina, Histidina, Metionina, Valina y Fenilalanina. Con-
excepción de los Acidos Aspártico y Glutámico, la Cisteí-
na, la Leucina y la Tirosina que son solubles en el Acido
Clorhídrico 0.5 N. Estos fueron cromatografiados uno a-
uno para obtener un cromatograma individual de referencia.

Por medio del Agua Oxigenada al 33%, la Metionina --
fué transformada en Metionina Sulfonada, que fué más fá--
cil detectar.

CAPITULO III

Resultados.

ANALISIS FISICO

PROPIEDADES FISICAS	GRENETINA PROBLEMA	GRENETINA DE 1º "TESTIGO"	GRENETINA DE 2º "TESTIGO"
ESTADO FISICO	FINAS ESCAMAS	POLVO FINO	POLVO FINO
COLOR	AMARILLO PALIDO	AMARILLO PALIDO	AMARILLO PALIDO
OLOR	SUI GENERIS	INODORO	INODORO
SABOR	INSIPIDO	INSIPIDO	INSIPIDO
% HUMEDAD	14.25	10.40	9.95
% CENIZAS	1.18	1.40	1.90
CONSISTENCIA DE GEL	POSITIVA	POSITIVA	POSITIVA
ABSORCION DE AGUA	5.5 VECES SU PESO DE AGUA	15 VECES SU PESO DE AGUA	17 VECES SU PESO DE AGUA

ANALISIS QUIMICO CUALITATIVO

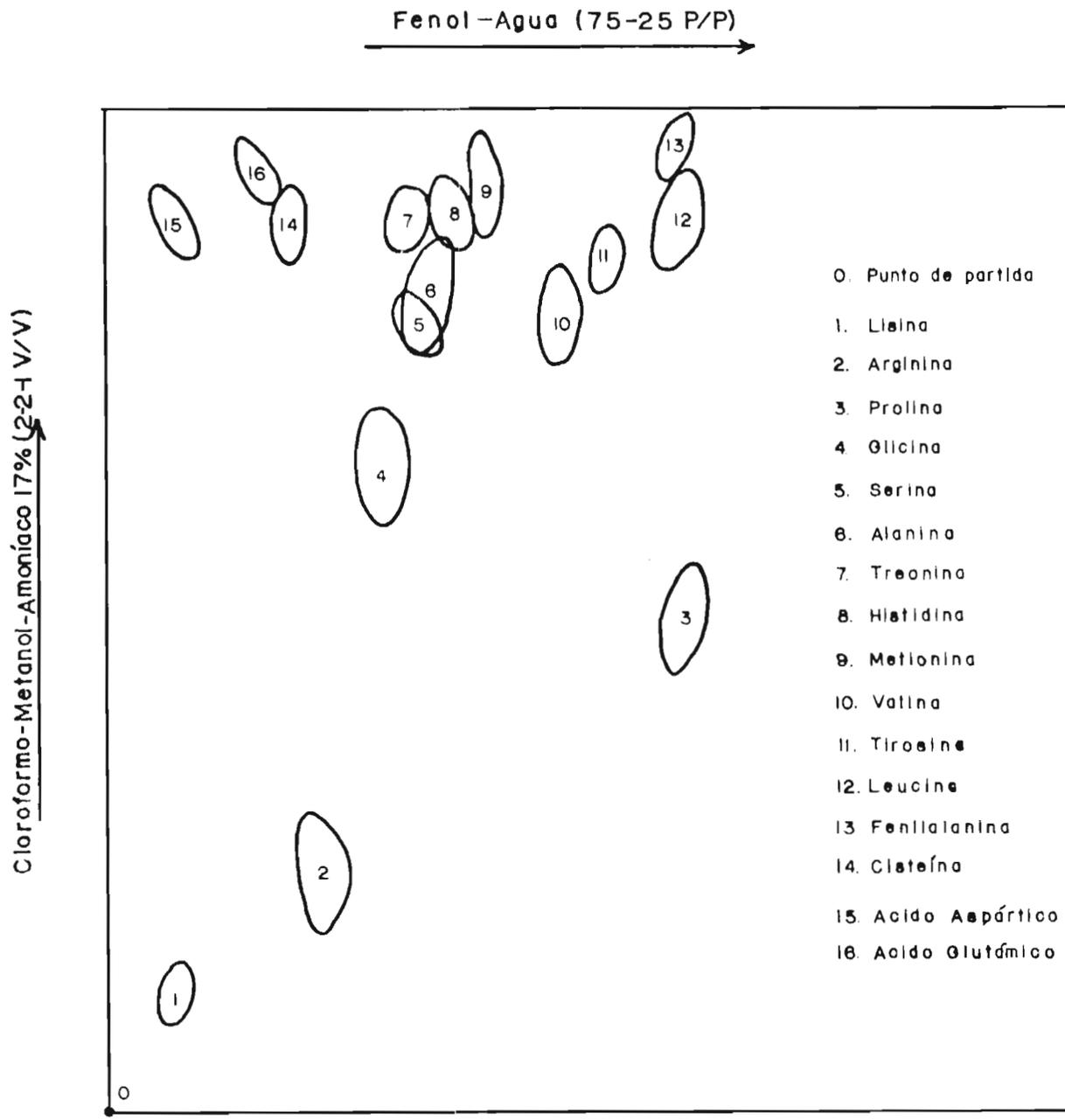
PRUEBAS	GRENETINA PROBLEMA	GRENETINA DE 1º "TESTIGO"	GRENETINA DE 2º "TESTIGO"
IDENTIFICACION DE SUSTANCIA PROTEICA			
SOLUCION DE ACIDO TANICO	POSITIVA	POSITIVA	POSITIVA
SOLUCION DE TRINITROFENOL	POSITIVA	POSITIVA	POSITIVA
SOLUCION DE DICROMATO DE POTASIO	POSITIVA	POSITIVA	POSITIVA
PRESENCIA DE CONDRINA	NEGATIVA	NEGATIVA	NEGATIVA
REACCION DE BIURET	POSITIVA	POSITIVA	POSITIVA
REACCION XANTO-PROTEICA	POSITIVA	POSITIVA	POSITIVA

**ANALISIS QUIMICO CUALITATIVO
DESPUES DE HIDROLIZAR
CON ACIDO CLORHIDRICO**

PRUEBAS	GRENETINA PROBLEMA	GRENETINA DE 1º "TESTIGO"
REACCION DE BIURET	NEGATIVA	NEGATIVA
REACCION XANTOPROTEICA	POSITIVA	POSITIVA
REACCION DE LA NINHIDRINA	POSITIVA	POSITIVA
REACCION DE MILLON	NEGATIVA	NEGATIVA

ANALISIS QUIMICO CUANTITATIVO			
DETERMINACION	GRENETINA PROBLEMA	GRENETINA DE 1º "TESTIGO"	GRENETINA DE 2º "TESTIGO"
% NITROGENO	12.22	13.65	12.93
% CALCIO	0.422	0.270	0.574
% METALES PESADOS	0.012	0.010	0.025
% ARSENICO	0.003	0.003	0.003

ANALISIS FISICO-QUIMICO			
DETERMINACION	GRENETINA PROBLEMA	GRENETINA DE 1º "TESTIGO"	GRENETINA DE 2º "TESTIGO"
VISCOSIDAD	50 CENTIPOSES	70 CENTIPOSES	50 CENTIPOSES

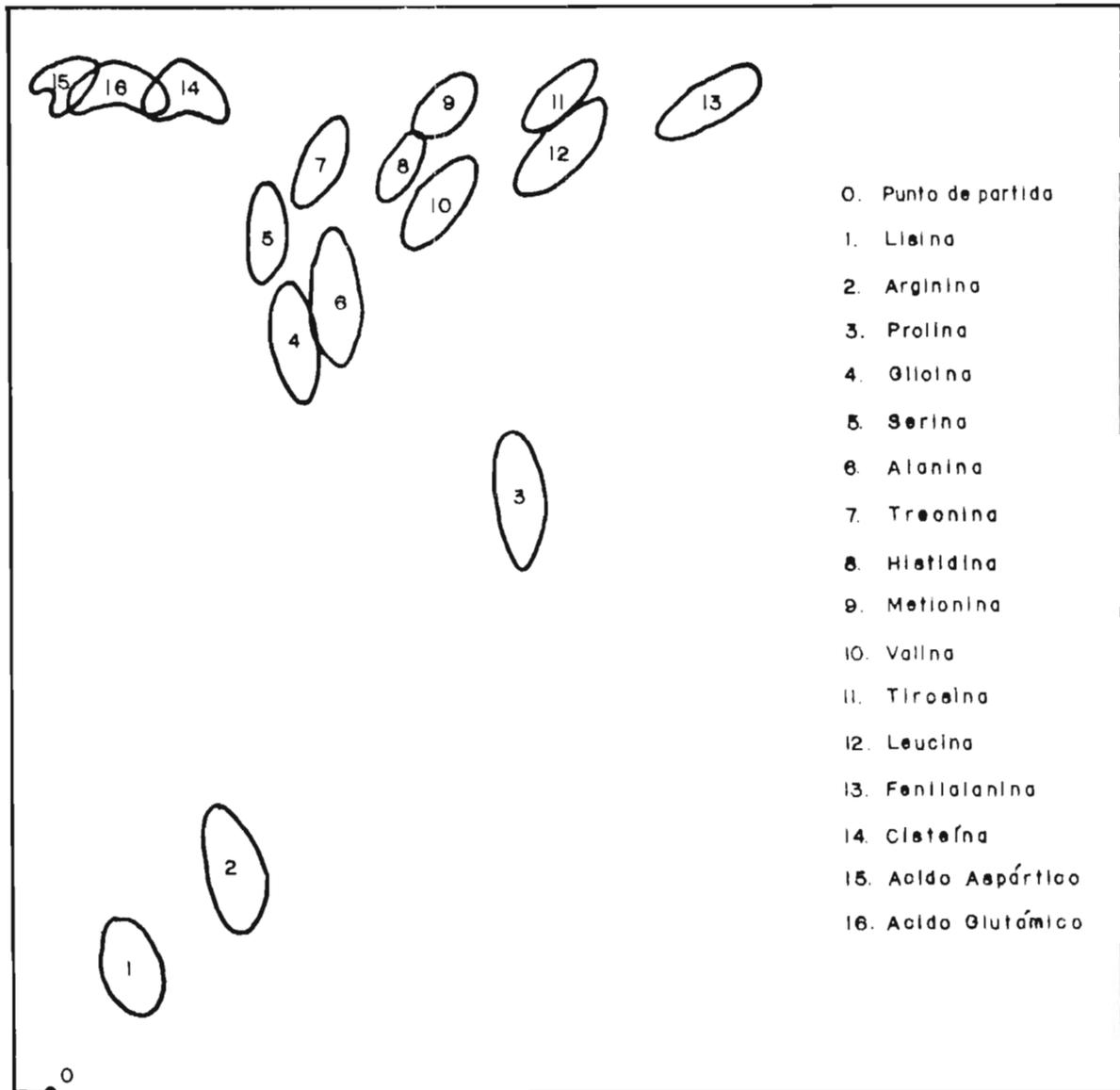


CROMATOGRAMA BASE OBTENIDO A PARTIR DE AMINOACIDOS TESTIGO EMIGRADOS UNO A UNO

Aminoácidos	R_f Solvente I	R_f Solvente II	Coloración de los Aminoácidos con el reactivo de la Ninhidrina.
1.Lisina	0.113	0.064	Rosa
2.Arginina	0.234	0.216	Rosa azul
3. Prolina	0.498	0.577	Amarillo
4.Glicina	0.648	0.273	Rosa naranja
5.Serina	0.788	0.311	Rosa azul
6. Alanina	0.824	0.319	Rosa azul
7.Treonina	0.761	0.283	Rosa azul
8.Histidina	0.886	0.303	Rosa violeta
9.Metionina	0.923	0.378	Rosa azul
10.Valina	0.801	0.453	Azul rosa
11.Tirosina	0.853	0.501	Rosa obscuro
12.Leucina	0.882	0.576	Rosa azul
13.Fenilalanina	0.970	0.572	Rosa azul
14.Cisteína	0.886	0.185	Rosa pálido
15.Ac. Aspártico	0.884	0.067	Azul
16.Ac. Glutámico	0.937	0.148	Azul violeta

Fenol-Agua (75-25 P/P) →

Cloroformo-Metanol-Amoniaco 17% (2-2-1 V/V) ↑



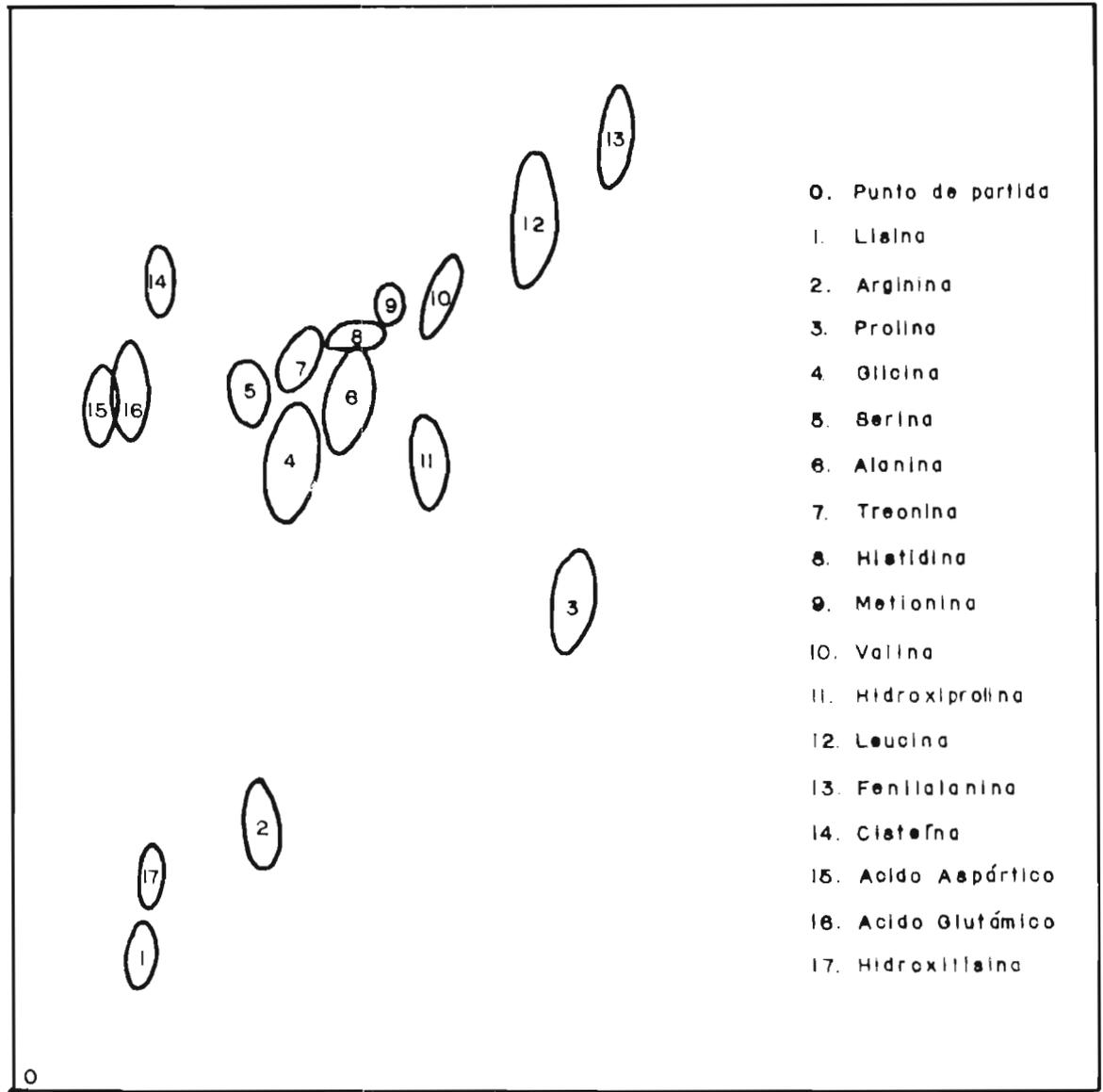
0. Punto de partida
1. Lisina
2. Arginina
3. Prolina
4. Glicina
5. Serina
6. Alanina
7. Treonina
8. Histidina
9. Metionina
10. Valina
11. Tirosina
12. Leucina
13. Fenilalanina
14. Cisteína
15. Acido Aspártico
16. Acido Glutámico

CROMATOGRAMA OBTENIDO A PARTIR DE LA MEZCLA DE AMINOACIDOS TESTIGO.

Aminoácidos	R_f Solvente I	R_f Solvente II	Coloración de los Aminoácidos con el reactivo de la Ninhidrina.
1.Lisina	0.118	0.069	Rosa pálido
2.Arginina	0.199	0.165	Rosa
3.Prolina	0.546	0.430	Amarillo
4.Glicina	0.699	0.223	Rosa naranja
5.Serina	0.796	0.197	Rosa
6.Alanina	0.736	0.267	Rosa obscuro
7.Treonina	0.859	0.250	Rosa
8.Histidina	0.862	0.327	Rosa
9.Metionina	0.917	0.366	Rosa
10.Valina	0.824	0.360	Rosa obscuro
11.Tirosina	0.918	0.472	Rosa obscuro
12.Leucina	0.873	0.475	Rosa obscuro
13.Fenilalanina	0.918	0.610	Rosa obscuro
14.Cisteína	0.932	0.120	Rosa
15.Ac. Aspártico	0.937	0.008	Azul
16.Ac. Glutámico	0.932	0.056	Azul violeta

Fenol-Agua (75-25 P/P) →

Cloroformo-Metanol-Amoniaco 17% (2-2-1 V/V) ↑



0. Punto de partida
1. Lisina
2. Arginina
3. Prolina
4. Glicina
5. Serina
6. Alanina
7. Treonina
8. Histidina
9. Metionina
10. Valina
11. Hidroxiprolina
12. Leucina
13. Fenilalanina
14. Cisteina
15. Acido Aspártico
16. Acido Glutámico
17. Hidroxilisina

CROMATOGRAMA OBTENIDO A PARTIR DE SOLUCION DE GRENETINA
PROBLEMA HIDROLIZADA.

Aminoácidos	R _f Solvente I	R _f Solvente II	Coloración de los Aminoácidos con el reactivo de la Ninhidrina.
1.Lisina	0.135	0.110	Rosa pálido
2.Arginina	0.250	0.226	Rosa pálido
3.Prolina	0.456	0.518	Amarillo
4.Glicina	0.585	0.255	Rosa naranja
5.Serina	0.650	0.218	Rosa azul
6.Alanina	0.642	0.308	Rosa violeta
7.Treonina	0.684	0.273	Rosa azul
8.Histidina	0.698	0.313	Rosa
9.Metionina	0.733	0.353	Rosa pálido
10.Valina	0.740	0.398	Rosa pálido
11.Hidroxiprolina	0.587	0.382	Amarillo
12.Leucina	0.808	0.478	Rosa pálido
13.Fenilalanina	0.882	0.559	Rosa pálido
14.Cisteína	0.750	0.137	Rosa violeta
15.Ac. Aspártico	0.641	0.079	Azul
16.Ac. Glutámico	0.650	0.108	Azul violeta
17.Hidroxilisina	0.200	0.120	Rosa pálido



Aminoácidos	R_f Solvente I	R_f Solvente II	Coloración de los Aminoácidos con el reactivo de la Ninhidrina.
1.Lisina	0.234	0.050	Rosa pálido
2.Arginina	0.170	0.083	Rosa pálido
3.Prolina	0.415	0.450	Amarillo
4.Glicina	0.468	0.211	Rosa naranja
5.Serina	0.588	0.164	Rosa azul
6.Alanina	0.535	0.263	Rosa
7.Treonina	0.568	0.206	Rosa pálido
8.Histidina	0.620	0.249	Rosa violeta
9.Metionina	0.558	0.326	Rosa pálido
10.Valina	0.641	0.350	Rosa pálido
11.Hidroxiprolina	0.497	0.327	Amarillo
12.Leucina	0.716	0.429	Rosa pálido
13.Fenilalanina	0.750	0.497	Rosa pálido
14.Cisteína	0.562	0.116	Rosa azul
15.Ac. Aspártico	0.502	0.055	Azul
16.Ac. Glutámico	0.497	0.077	Azul violeta

INTERPRETACION DE LOS CROMATOGRAMAS.

El estudio del Cromatograma obtenido del extracto --- de la Grenetina problema hidrolizada, nos permite hacer no tar, por la posición y el color de las manchas que presen tan respectivamente, la presencia de los siguientes Amino-ácidos:

Lisina, Arginina, Prolina, Glicina, Serina, Alanina, Treonina, Histidina, Metionina, Valina, Leucina, Fenilalanina, Cisteína, Acido Aspártico y Acido Glutámico.

Se observó la presencia de Hidroxiprolina, se carece de testigo, pero según la Bibliografía consultada (SHRI---NER, R., FUSON, R. Y CURTIN, D.) presenta una mancha de co lor amarillo pálido y un Rf de 0.38.

La aparición de un Aminoácido suplementario en el cro matograma, nos hace suponer la existencia de la Hidroxili- sina, por la disminución de color que tuvo la Lisina poste- riormente en el cromatograma y por su posición en éste.

El testigo de Tirosina, no se observó en el cromato- gram, se realizó la reacción de Millon para la mejor com- probación de la misma, la cual nos dió negativa.

La intensidad y las dimensiones de las manchas de la- Glicina, Prolina e Hidroxiprolina nos demuestra la presen- cia de éstos en una proporción mayor.

CAPITULO IV

Discusión y Conclusiones.

DISCUSION Y CONCLUSIONES.

Debido a los numerosos productos que contienen Grenetina como ingrediente esencial y a la gran demanda que tiene ésta en el mercado Nacional hemos realizado este estudio, tomando en consideración que la Grenetina es un producto cuyos gastos de importación, anualmente ascienden -- aproximadamente a 12 millones de pesos.

La técnica de extracción de Grenetina que se empleó - en este trabajo, es relativamente económica y el tiempo empleado sumamente corto; por lo que podemos afirmar, que es posible la obtención de Grenetina, a partir de pedazería residual de Tenerías y de tendones y huesos de origen animal. Por lo cual el establecimiento de ésta industria es factible y el mercado del producto está asegurado.

Los resultados obtenidos en las pruebas físicas y químicas del control de calidad tanto en la Grenetina problema como en las Grenetinas testigos, nos ayudan a valorar - las técnicas empleadas en los análisis. La calidad de la Grenetina obtenida, fué demostrada, tanto antes como después de la hidrólisis, tomando como base las Grenetinas -- testigo, ya que los resultados fueron semejantes, con la - excepción del análisis físico-químico realizado para la -- determinación de viscosidad, el cual resultó ser superior - en uno de los testigo.

De los productos de la hidrólisis de la Grenetina se identificaron los siguientes Aminoácidos:
Lisina, Arginina, Prolina, Glicina, Alanina, Serina, Valina, Fenilalanina, Histidina, Treonina, Metionina, Leucina, Cisteína, Acido Glutámico, Acido Aspártico, Hidroxiprolina e Hidroxilisina.

Los resultados alcanzados en el análisis en general nos demuestra la calidad de la Grenetina que se obtuvo, - así como las condiciones de pureza especificadas para este producto.

Por las consideraciones antes mencionadas y por el - rendimiento obtenido en la extracción de Grenetina, creemos posible su industrialización en la Zona de la Huasteca y en la Zona Media de el Estado de San Luis Potosí.

CAPITULO V

Bibliografía.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- DIRECCION GENERAL DE ESTADISTICA S.I.C.
Anuario estadístico del Comercio Exterior de los -
Estados Unidos Mexicanos. México, 1966, p.181, 203.
Ibid 1967, p. 188,211
Ibid 1968, p. 199,223
Ibid 1969, p. 195,220
Ibid 1970, p. 193-194, 217
Ibid 1971, p. 197,222,588

- 2.- BALANSARD, J. et BERNARD, P.
Notes Pratiques de Chimie Végétale.
Medicine Tropicale, Marseille, Paris, 1950, 6, ---
p.1017.

- 3.- CALVET, Enrique.
Química General Aplicada a la Industria.
Salvat Editores, S.A. Barcelona, España, 1953, 6, -
p.700-703.

- 4.- CLARK, J.M.
Bioquímica Experimental.
Editorial Acribia, Zaragoza, España, 1966, p.95-104.

- 5.- CONVENCION DE LA FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS, Inc.
Farmacopea de los Estados Unidos de América.
Editorial Interamericana, S.A. Washington, D.C. --
1955, 15, p.373-374.

- 6.- FIESER, L. y FIESER M.
Química Orgánica.
Grijalvo, S.A. México, 1968, p.510.

- 7.- FONT QUER, P. y Col.
Medicamenta.
Editorial Labor S.A. Barcelona, 1969, 3, p.746-747.
- 8.- HORWITZ, William.
Methods of Analysis of the Association of Official-
Agricultural Chemists. A.O.A.C.
Washington, D.C. 1965, p.325-326.
- 9.- KIRK, Raymond E. y OTHMER, Donald F.
Enciclopedia de Tecnología Química.
Editorial Hispano-Americana, México, 1962, 8, ----
p.799-807.
- 10.- LAGUNA, Jose.
Bioquímica.
La Prensa Médica Mexicana, México, 1962, p. 284-289.
- 11.- LAW, Harry D.
The Organic Chemistry of Peptides.
Wiley-Interscience, London. 1970, p.12-17.
- 12.- LEES, R. y Col.
Manual de Análisis de Alimentos.
Editorial Acribia, España, 1969, p. 14-20.
- 13.- LOEB, Jacques.
Proteins and the theory of colloidal behavior.
Mc Graw-Hill, New York. 1924, p. 273-279.

- 14.- MARTIN, Eric W. y Col.
Farmacia Práctica de Remington.
Editorial UTEHA, México. 1965, p. 701-702.
- 15.- MERCK, E.
Métodos complexométricos de valoración.
Merck, E., Darmstadt, Alemania. 3^a edición, p. 19-20.
- 16.- MERTZ, Edwin T.
Bioquímica.
Publicaciones Cultural, S.A. México, D.F. 1971, -
p.61-71.
- 17.- MURILLO, Héctor.
Química Orgánica.
Editorial Porrúa, S.A. México. 1958, p. 165.
- 18.- PUECH, A., DURU, C. et PRIEUR, D.
Travaux de la Société de Pharmacie de Montpellier.
Montpellier, Paris. 1968, 28, 4, p. 253.
- 19.- RANDERATH, Kurt.
Chromatographie sur couches minces.
Gauthier-Villars, Paris. 1964, p. 25, 110-115.
- 20.- ROSE, A. y ROSE, E.
Diccionario de Química y de Productos Químicos.
Ediciones Omega, Barcelona. 1959, p. 493.
- 21.- SHRINER, R., FUSON, R. y CURTIN, D.
Identificación sistemática de Compuestos Orgánicos.
Editorial Limusa-Wiley, México. 1972, p. 285.

22.- WALLIS, T. E.

Manual de Farmacognosia.

Editorial C.E.C.S.A., México. 1966, p. 514.

