

REPORTE DE RESIDENCIA PROFESIONAL

NOMBRE DEL TRABAJO:

CARACTERIZACIÓN DE METABOLITOS EN RAIZ *DE Canavalia ensiformis*. L.

ALUMNO: CASTELLANOS BEZARES BENJAMIN

CARRERA: ING. BIOQUIMICA

ASESOR: DR. JOAQUÍN ADOLFO MONTES MOLINA

INDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN.....	6
II. JUSTIFICACIÓN.....	8
III. OBJETIVOS.....	9
3.1 Objetivo general.....	9
3.2 Objetivos específicos.....	9
IV. CARACTERIZACIÓN DEL AREA EN QUE PARTICIPÓ.....	10
4.1 historia de la institución.....	10
4.2 ubicación de la escuela.....	10
4.3 misión.....	11
4.4 visión.....	11
4.5 valores de la institución.....	12
4.6 área en que se desarrollara el proyecto	12
V. PROBLEMAS A RESOLVER.....	12
VI. ALCANCES Y LIMITACIONES.....	13
VII. MARCO TEÓRICO.....	14
7.1 descripción.....	14
7.2 origen.....	15
7.3 nombres comunes.....	15
7.4 fenología.....	16
7.5 nodulación.....	16
7.6 composición química.....	16
7.7 hábitat.....	18
7.8 distribución.....	19
7.9 usos y beneficios.....	19
7.10 importancia económica y distribución.....	20
7.11 aspecto fito-sanitario.....	20
7.12 toxicidad.....	21
7.13 canavanina.....	22
7.14 determinación de aminoácidos.....	23
7.15 cromatografía de líquidos de alta resolución.....	24
7.16 cromatografía en fase reversa.....	24
7.17 aplicaciones de cromatografía de fase inversa.....	25
7.18 derivatización.....	26
7.19 derivatización pre-columna.....	26
7.20 derivatización post-columna.....	27

7.21 agentes derivatizantes.....	28
7.21.1 ninhidrina	28
7.21.2 cloruro de dansilo	28
7.21.3 cloruro de dabsilo	28
7.21.4 dinitrofluorobenceno	29
7.21.5 fenilisotiocianato	29
7.21.6 ortoftaldehido	29
7.21.7 fluorenilmetil cloroformato.....	29
7.21.8 etoximetilenmalonato de dietilo	29
7.21.9 aminoquinolil-n-hidroxisuccinimidil carbamato	30
7.22 los metabolitos secundarios desempeñan múltiples papeles.....	30
7.23 CLASES PRINCIPALES DE METABOLITOS SECUNDARIOS.....	31
7.23.1 Terpenos.....	3
7.23.2 Compuestos fenólicos	32
7.23.3 Glicósidos	33
7.23.4 Alcaloides.....	34
VIII. PROCEDIMIENTO Y DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS..	35
8.1 obtención de la materia prima.....	35
8.2 colecta de material vegetal.....	35
8.3 medición de variables.....	35
8.3.1 medición de longitudes.....	36
8.3.2 medición de masa (peso).....	36
8.3.3 medición de diámetros.....	36
8.3.4 medición de clorofila.....	36
8.4 procesamiento de la materia prima.....	36
8.5 extracción de l-canavanina de raíz.....	37
8.6 proceso de derivatización.....	37
8.7 identificación de canavanina.....	37
IX. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
X. CONCLUSIÓN.....	46
XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47

INDICE DE CUADROS

CUADRO 1. COMPOSICIÓN BROMATOLÓGICA DE LOS FORRAJES (%).....16

**CUADRO 2. COMPOSICIÓN BROMATOLÓGICA DE LAS HOJAS EN LOS
FORRAJES (%).....17**

**CUADRO 3. COMPOSICIÓN BROMATOLÓGICA DE LOS TALLOS EN LOS
FORRAJES (%).....17**

CUADRO 4. COMPOSICIÓN BROMATOLÓGICA DE LOS GRANOS (%).....17

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Localización del ITTG.....	11
Figura 2. Análisis estadístico de la variable longitud de raíz de <i>Canavalia ensiformis</i> desde el día de la siembra hasta los 180 dde.....	38
Figura 3. Análisis estadístico de la variable peso de raíz de <i>Canavalia ensiformis</i> desde el día de la siembra hasta los 180 dds.....	40
Figura 4. Análisis estadístico de la variable número de nódulos en la raíz de <i>Canavalia ensiformis</i> desde el día de la siembra hasta los 180 dds.....	41
Figura 5. Análisis estadístico de la variable peso de nódulos en la raíz de <i>Canavalia ensiformis</i> desde el día de la siembra hasta los 180 dds.....	42
Figura 6. Análisis estadístico de la variable diámetro de nódulos en la raíz de <i>Canavalia ensiformis</i> desde el día de la siembra hasta los 180 dds.....	43
Figura 7. Producción de clorofila en plantas de <i>C. ensiformis</i> desde la emergencia hasta los 180 dde.....	44

I. INTRODUCCION

La *Canavalia ensiformis* L. es una planta de la familia de las leguminosas. Que sobresale por sus múltiples usos como cultivo comercial, alimentación de ganado, cultivo de cobertura o abono verde, biofumigante del suelo, acuicultura, fitorremediación y para la fauna silvestre (Sheahan, 2013).

En México, después de las compuestas, las leguminosas constituyen la segunda familia más grande de plantas fanerógamas (Sousa y Delgado, 1998). Los estados más ricos en especies de esta familia, en nuestro país, son Oaxaca y Chiapas (Sousa, 1986).

El aminoácido libre canavanina (ácido 2-amino-4-(guanidinooxy) butanoico) fue descubierto originalmente en tres especies estrechamente relacionadas de *Canavalia* (Kitagawa y Tomiyama de 1929; Kitagawa, 1937; Damodaran y Narayanan, 1939). Unos de los principales componentes tóxicos de la planta presente en el grano de canavalia (*Canavalia ensiformis*) y algunas otras leguminosas (Rosenthal, 1977). Es un aminoácido no proteico análogo a la arginina. Sus propiedades tóxicas se deben a la similaridad estructural, ya que interfiere con el metabolismo de la arginina, inhibe la síntesis de proteínas, bloquea las síntesis de RNA y DNA, afecta el sistema inmune y es un potente antimetabolito que resulta tóxico a diferentes tipos de organismos (Van, 1987).

Sprent & Mckey en 1994 señalo la presencia de canavanina, lectinas (concanavalina A), inhibidores de proteasa, factor de flatulencia, alcaloides, saponinas, y polifenoles. Estos elementos son metabolitos secundarios que se encuentran en la semilla formados en el metabolismo secundario en el cual Valdés y Balbín (2000) definen el metabolismo secundario como la biosíntesis, la transformación y la degradación de los compuestos endógenos mediante proteínas de especialización, las cuales se han formado como resultado de los procesos de diferenciación y se clasifican según su significación biológica y función en la célula productora.

Algunos productos del metabolismo secundario tienen funciones ecológicas específicas como atrayentes o repelentes de animales. Muchos son pigmentos que

proporcionan color a flores y frutos, jugando un papel esencial en la reproducción atrayendo a insectos polinizadores, o atrayendo a animales que van a utilizar los frutos como fuente de alimento, contribuyendo de esta forma a la dispersión de semillas. Otros compuestos tienen función protectora frente a predadores, actuando como repelentes, proporcionando a la planta sabores amargos, haciéndolas indigestas o venenosas. También intervienen en los mecanismos de defensa de las plantas frente a diferentes patógenos, actuando como pesticidas naturales (García & Pérez, 2009).

Se agrupan en cuatro clases principales:

- Terpenos: Entre los que se encuentran hormonas, pigmentos o aceites esenciales.
- Compuestos fenólicos: Cumarinas, flavonoides, lignina y taninos.
- Glicósidos: Saponinas, glicósidos cardíacos, glicósidos cianogénicos y glucosinolatos.
- Alcaloides.

El objetivo de este trabajo es evaluar los metabolitos secundarios de defensa presentes en la raíz de *canavalia ensiformis* mediante un estudio fotoquímico preliminar donde se determina la presencia o ausencia de los principales grupos de metabolitos en una especie vegetal. No existen informes de estudios en raíz de *C. ensiformis*, de manera que la caracterización de sus metabolitos y la evaluación de la presencia de L-canavanina por HPLC, contribuiría a un mejor y total manejo de la planta de *Canavalia ensiformis*.

II.JUSTIFICACIÓN

Dado que cada uno de los grupos de compuestos está relacionado con actividades biológicas específicas, partiendo de los resultados obtenidos en el estudio fotoquímico preliminar es posible orientar investigaciones posteriores para determinar la actividad biológica de las especies en cuestión y los principios activos involucrados.

El aminoácido L-Canavanina es un aminoácido tóxico que se encuentra principalmente en la semilla de esta planta y se ha demostrado que es tóxico para los humanos y animales.

La identificación y cuantificación de este aminoácido será de utilidad para asegurarse que ese órgano de la planta causara daño o no al ingerirlo. Además, la identificación puede ser de utilidad para la extracción de este aminoácido, o crear técnicas de eliminación de este elemento u orientar a investigaciones posteriores respecto a este aminoácido.

III.OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar desarrollo y metabolitos secundarios de defensa presentes en raíz de *Canavalia ensiformis*.

3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Cuantificación y comparación del desarrollo de la raíz y componentes.
- Evaluar la cantidad de fenoles, flavonoides, carotenos y licopenos, en la raíz de *Canavalia ensiformis*.
- Cuantificación de L-canavanina en raíz de *Canavalia ensiformis* por HPLC.

IV. CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA EN QUE PARTICIPÓ

4.1 HISTORIA DE LA INSTITUCIÓN

En los años 70's, llego al estado de Chiapas el movimiento nacional de extensión educativa para la Educación, con la intervención del gobierno del estado de Chiapas ante la federación. Esta gestión dio lugar a la creación del Instituto Tecnológico Regional de Tuxtla Gutiérrez (ITRTG).

El 1971, el Gobernador del Estado, Dr. Manuel Velasco Suárez, colocó la primera piedra de lo que pronto seria el centro educativo de nivel medio superior principal de la entidad.

En 1972, con una infraestructura de dos edificios con ocho aulas, dos laboratorios y un taller en construcción abren sus puertas el Instituto Tecnológico Regional de Tuxtla Gutiérrez con las carreras de técnico en motores de combustión interna, en electricidad, en químico laboratorista y en máquinas y herramientas.

En 1974 comenzó el nivel superior, con las carreras de Ingeniería Industrial en Producción e Ingeniería Bioquímica de Productos Naturales.

Actualmente es considerado una de las dos máximas casas de estudios del estado de Chiapas, junto con la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Su lema es Ciencia y Tecnología con Sentido Humano y su actual director es el Ing. Tomás Palomino Solórzano.

4.2 UBICACIÓN DE LA ESCUELA

La escuela se encuentra ubicada en Carretera Panamericana Kilómetro 1080, Terán, C.P. 29050 Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, este lugar cuenta con los requerimientos de escuela por estar en fácil acceso ya que se encuentra en la

avenida principal de la ciudad, cuenta con las instalaciones necesarias para las carreras impartidas.

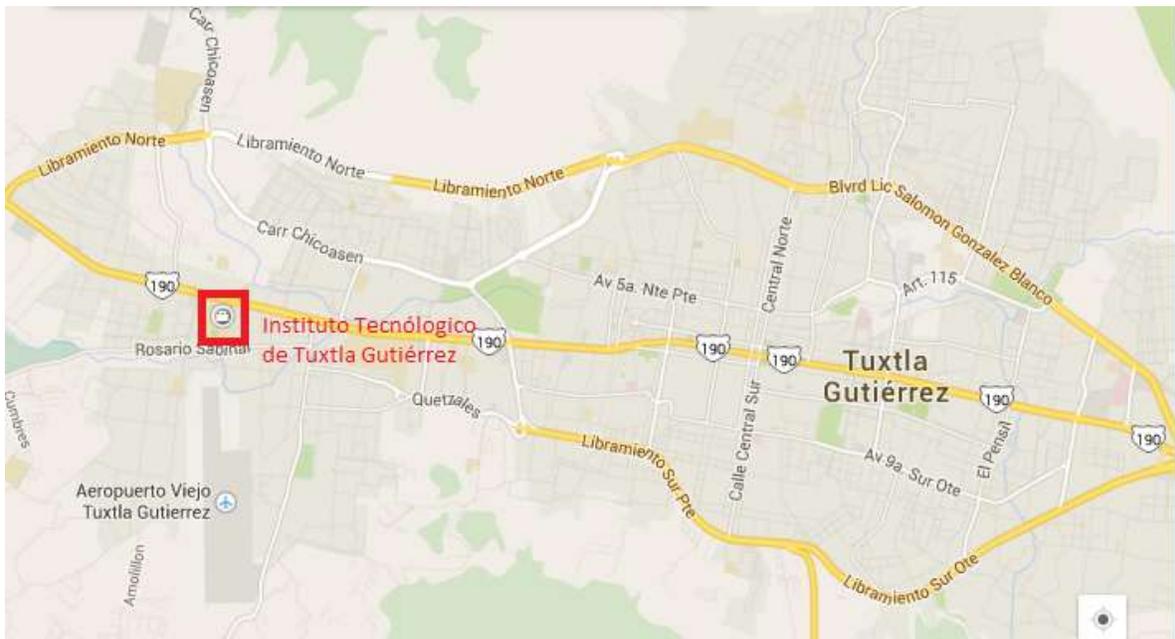


Figura 1. Localización del ITTG.

4.3 MISIÓN

Formar de manera integral profesionales de excelencia en el campo de la ciencia y la tecnología con actitud emprendedora, respeto al medio ambiente y apego a los valores éticos

4.4 VISIÓN

Ser una Institución de excelencia en la educación superior tecnológica del sureste, comprometida con el desarrollo socioeconómico sustentable de la región.

4.5 VALORES DE LA INSTITUCIÓN

El ser humano

El espíritu de servicio.

El liderazgo.

El trabajo en equipo.

La calidad.

El alto desempeño.

Respeto al medio ambiente

4.6 ÁREA EN QUE SE DESARROLLARA EL PROYECTO

El proyecto “Caracterización de metabolitos en raíz de *Canavalia ensiformis*” se desarrolló en los laboratorios siguientes: laboratorio de analítica y biología molecular, laboratorio de biotecnología y en el invernadero del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez.

V. PROBLEMAS A RESOLVER

- Mayor aprovechamiento de la raíz de *Canavalia ensiformis*.
- Determinar la presencia de metabolitos de defensa presentes en la planta.
- Cuantificación en raíz de L-Canavanina

VI. ALCANCES Y LIMITACIONES

Este trabajo desea evaluar la presencia o ausencia de los principales grupos de metabolitos secundarios en la raíz de *Canavalia ensiformis*, así como comprobar y cuantificar el aminoácido tóxico presente en la misma de una manera rápida y eficaz con el uso del HPLC.

El análisis por HPLC nos permite obtener resultados fiables y de alta calidad gracias a la sensibilidad del equipo, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, ideal para la separación de especies no volátiles o termolábiles y por su gran aplicabilidad a sustancias que son de interés en la industria.

No obstante la mayor limitación que se puede encontrar en la realización del proyecto es la rentabilidad de este, al hacer uso del cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia (HPLC), demanda una considerable inversión de capital en instrumentación y reactivos de alto valor económico.

Otra limitación importante es la falta de estandarización de la técnica para la cuantificación de L-Canavanina, la cual se efectuó.

VII. MARCO TEÓRICO

Canavalia ensiformis. L.

7.1 DESCRIPCIÓN

Arbustos anuales o trepadores perennes de 1-2 m de altura. Tallos glabros o adpreso-pubescentes. Foliolos elípticos u ovado elípticos, de 5.7-20 cm. De longitud, 3.2-11.5 cm de ancho, obtusos, subagudos o brevemente acuminados, más o menos cuneados, ligeramente coriáceos, glabrescentes o con pubescencia esparcida y venación realzada, retículas sobre ambas superficies.

Peciolo de 2.3-11 cm de longitud; raquis de 1-3.5 cm de longitud; peciólulos de 1-11 mm de longitud, cubiertos de pelos cortos blancos, moderadamente densos; estipulas tempranamente deciduas. Inflorescencias con raquis de 5-12 cm de longitud, pedúnculo de 10-34 cm de longitud, recto, subtendiendo de 10-20 flores; pedicelos de 2-5 mm de longitud; bractéolas de 2mm de longitud, orbiculares, obtusas. Cáliz de 14-16 mm de longitud, tubular, pubescencia con pelos cortos blancos, esparcidos; labio superior ancho, emarginado o truncado de 5 mm de longitud, más corto que el tubo, labio inferior de 4 mm de longitud, 3 lobado, costado superior del cáliz abruptamente constricto por detrás con ápice apiculado.

Corola de hasta 3 cm de longitud, rosada, estandarte rosado a purpura, redondeado de 2.75 cm de longitud, emarginado.

Legumbre linear-oblonga, 15-35 cm de largo y 3-3.5 cm de ancho, lignificada, ligeramente incurva, estipitada, rostrada, con 15-20 semillas, espiralmente dehiscente, tostado pálida; cada valva con tres costillas longitudinales, 2 en cada sutura, y una costilla extra a 5 mm de la costilla ventral.

Semillas oblongas, moderadamente comprimidas, color marfil o blancas con una marca parduzca incospicua cerca del hilo, no boyantes o impermeables, las de mayores dimensiones de 1.45-2.1 x 1.5 cm, las de dimensiones menores de 1-1.5 x 1.5 cm, teniendo un espesor de 0.7-1 cm; hilo de 5.5-9 mm de longitud (Beyra et

al, 2004). El desarrollo del cultivo tiene una duración de 191 días, repartidos en dos fases: la vegetativa de 69 días y la reproductiva de 122 días (Marmolejo et al, 1986).

La ubicación del género *Canavalia* dentro de la subtribu *Diocleinae* está sustentada por caracteres tales como foliolos y cáliz eglandulares; estilo terete; inflorescencias por lo general nodosas; bractéolas presentes; semillas con hilo linear; presencia del aminoácido Canavanina; y número cromosómico de $2n=22$ (Lackey, 1981).

El género *Canavalia* está subdividido en 4 subgéneros (Sauer, 1964; Gillet et al., 1971).

Subgénero *Catodonia* propio del nuevo mundo.

Subgénero *Wenderotia* propio del nuevo mundo.

Subgénero *Canavalia* del viejo y nuevo mundo.

Subgénero *Maunaloa* endémico de Hawái.

7.2 ORIGEN

Cultivada desde las regiones sureñas de Estados Unidos hasta América del Sur. Su origen se encuentra en Centroamérica y las Antillas. Existe evidencia arqueológica de su cultivo desde hace varios miles de años en México, Perú y Arizona (Benavides et al. 2010).

7.3 NOMBRES COMUNES

Se conoce con los nombres vulgares de frijol machete, haba de burro, nescafé, poroto gigante, Jack vean, pois sabre y otros (Roing, 1965; Legel, 1981). “haba de caballo”, “frijol de bibijagua” (Beyra et al., 2004).

7.4 FENOLOGIA

Flores durante todo el año, de enero a diciembre (Beyra et al., 2004)

7.5 NODULACIÓN

Los nódulos de *C. ensiformis* son redondos o ligeramente ovalados, 1-4 mm de diámetro, superficie rugosa, firmemente adheridos a la raíz, y gran porcentaje con coloración rosada; lo cual demuestra que la mayoría s o n nódulos efectivos. *C. ensiformis* presenta buena nodulación y distribución uniforme, es decir corresponde a la categoría 3C. El número aproximado de nódulos fue 50-100 por planta. O sea que la nodulación se puede clasificar como "abundante" (Marmolejo et al., 1986)

7.6 COMPOSICIÓN QUÍMICA

La aleloquímica de la semilla como defensa química contra los herbívoros, ha sido descrita por Johns (1994), quien señaló la presencia de canavanina, lectinas (concanavalina A), inhibidores de proteasa, factor de flatulencia, alcaloides, saponinas, y polifenoles.

A continuación, se muestran tablas con la composición bromatológica de algunas partes de la planta de *Canavalia*. Los indicadores bromatológicos son: proteína bruta (PB), fibra bruta (FB), lignina, extracto etéreo, cenizas, Ca, P, K, Mg, fibra neutro detergente (FND) y fibra ácido detergente (FAD); (Díaz et al., 2002).

Cuadro 1. Composición bromatológica de los forrajes (%)

Especie	PB	FB	FAD	Ligina	Celulosa	Extracto etereo	Ceniza	Ca	P	K
Canavalia	20.05	36.35	36.32	12.09	23.50	1.46	9.45	2.01	0.23	2.17

Cuadro 2. Composición bromatológica de las hojas en los forrajes (%)

Especie	PB	FAD	Ligina	Celulosa	Extracto etereo	Ceniza	Ca	K	Mg
Canavalia	24.83	27.15	10.19	16.65	2.23	10.99	2.82	1.48	0.54

Cuadro 3. Composición bromatológica de los tallos en los forrajes (%)

Especie	FND	FAD	celulosa	Extracto etéreo	Lignina	Ceniza	Ca	P	K
Canavalia	69.23	56.71	39.92	0.34	16.00	5.91	1.12	0.20	1.64

Cuadro 4. Composición bromatológica de los granos (%)

Especie	PB	FB	FND	Ligina	Ceniza	Ca	Mg	K
Canavalia	32.69	12.94	36.42	2.04	3.51	0.32	0.20	1.03

En la semilla de *Canavalia ensiformis* se encuentra la Concanavalina A (Con A), es una proteína globular de origen vegetal, cuyo contenido varía entre 1 y 3 % en peso (Ganem & Martin, 2000). La Con A inhibe significativamente la actividad específica de la enzima α -amilasa pancreática (León et al., 2007).

Las semillas de canavalia tienen un 30% de contenido de proteínas y un 60% de carbohidratos que la coloca como una importante fuente de gran valor energético y proteico (Udedibie, 1990). A pesar de las ventajas aparentes de esta especie para la producción de proteínas, la utilización de la canavalia ha sido limitada, debido a la presencia de ciertos factores anti nutricionales, entre los que se encuentran los inhibidores de proteasas, de α -amilasas, lectinas y aminoácidos no proteicos como la L-canavanina, que reducen la calidad nutricional de las proteínas (Gómez, 1990, Michelangeli & Vargas, 1994).

Aplicando un tratamiento de extrusión, las actividades inhibitorias de tripsina, quimotripsina y α -amilasa disminuyen hasta un 95%, La actividad hemaglutinante

se eliminada totalmente, como resultado de la alta temperatura empleada durante el proceso de extrusión. Pero el contenido de canavanina no se elimina (Nelson, 2003). por lo tanto, se necesitan de otros métodos como el tostado, malteado, remojo o peletizado.

Afortunadamente, muchas leguminosas han podido volverse útiles como alimento cuando se descubrió que sus toxinas pueden neutralizarse en forma simple mediante la cocción, germinación, fermentación y/o remojo; procesos que proveen alimentos comestibles, sanos y libres de materiales tóxicos (Fraile et al. 2007).

7.7 HÁBITAT

Nativa probablemente de América tropical, ahora dispersa en todos los trópicos por introducción, es la especie más cultivada en África tropical (Baker, 1926). India, Indonesia, Taiwán, Hawái (Degener & Degener, 1969) y en toda el área neotropical como fuente de proteína vegetal para la nutrición, abonos verdes, conservación de suelos, control biológico y también en la alimentación humana (Aymard & Cuello, 1991).

Sauer (1964) indicó que esta especie fue domesticada en el continente americano, en tiempos precolombinos (1300 AD) por pobladores de varios sitios del suroeste de los Estados Unidos para alimento humano, por sus semillas comestibles, por lo que todos los especímenes con datos del hábitat provienen de cultivos o han escapado a hábitats artificiales. Toleran un amplio rango de textura y fertilidad del suelo; crece bien en suelos de tierras bajas tropicales altamente lixiviadas, pobres en nutrientes y pedregosos, así como también en suelos ácidos y salinos y en suelos arcillosos húmedos. Esta especie no es muy afectada por anegamiento y la salinidad y es resistente a periodos de sequías por su profundo sistema radical, que le permite sobrevivir en la humedad almacenada en el suelo. Se desarrolla desde 0-800 m sobre el nivel del mar (NAS, 1979; Bernal & Jiménez, 1990).

7.8 DISTRIBUCIÓN

Estados unidos; Antillas mayores (cuba, Jamaica, Haití, república dominicana, puerto rico); Antillas menores (islas vírgenes, Guadalupe, dominica, Martinica, santa lucia, barbados, granada, trinidad y Tobago); México, América central (Guatemala, honduras británicas, el salvador, honduras, costa rica, panamá); América del sur (Colombia, Venezuela, Perú, argentina, Paraguay, Surinam, Brasil, Bolivia, Guayana francesa); África (Senegal, sierra leona, Liberia, costa de marfil, Ghana, Nigeria, Camerún, sao thome, Congo, Angola, Egipto, sudan, ethiopia, Kenia, tanganyika, Mozambique); reuñión; Mauricio; Asia (india, burma, malaya, Singapur, indonesia, borneo, Vietnam, china, filipinas, Japón); Oceanía (isla mariana, isla carolina, isla Hawái, nueva guinea, nueva caledonia); Australia. En cuba, en las provincias de la habana, ciudad de la habana y villa clara (Beyra et al., 2004).

7.9 USOS Y BENEFICIOS

Diversos autores consideran que *Canavalia ensiformis* podría ser un cultivo del futuro como una alternativa en la alimentación animal, por su contenido de proteína; Bernal & Correa (1992) indicaron el alto contenido en proteína cruda, el porcentaje de digestibilidad y su rango de adaptabilidad a diversos tipos de suelos, climas y alturas sobre el nivel del mar. Por tanto, esta especie tiene alta capacidad de uso, pues puede utilizarse como suplemento nutritivo en la alimentación animal de cerdos, aves y rumiantes, así como en la alimentación humana en zonas áridas en donde reemplaza la deficiencia de cereales, ya que posee una alta proporción de aminoácidos esenciales con excepción del triptófano. Como todas las leguminosas, es importante en la recuperación de suelos al aumentar el porcentaje de nitrógeno. Usándose como abono verde, así como sus semillas por presentar una alta germinación. Además, por la gran cantidad de folloje que produce una lata cobertura, es utilizada como control de plagas y malezas, en la protección de cultivos y contra la erosión hídrica (Bernal & Correa, 1992). Es importante señalar que de ella se pueden extraer enzimas y otros compuestos químicos de alta utilidad en medicina. Los citados autores resumieron además que esta especie es una

fuerza industrial de lectinas y ureasa con actividad hematoaglutinante específica, necesaria en procesos médico-legales, medicina e investigación antropológicas, y señalaron además que la ureasa, fue la primera enzima aislada, y la concanavalina, la primera lectina descubierta. Bernal & Correa (1992) resaltaron también el carácter rústico de esta planta, que le permite desarrollarse en suelos muy minerales y no necesita demasiados cuidados agro-culturales.

7.10 IMPORTANCIA ECONÓMICA Y DISTRIBUCIÓN

El potencial de esta planta como productora de granos con un alto contenido de carbohidratos y proteínas, además de su capacidad para fijar nitrógeno y proteger el suelo, la hacen una buena alternativa de cultivo para las regiones tropicales. En la actualidad se siembra prácticamente en todas las regiones tropicales del mundo y se cultiva extensamente en el sur de los Estados Unidos. En el país se siembra en el estado de Chiapas, aunque no se localizaron cifras oficiales para este cultivo (Benavides et al. 2010).

7.11 ASPECTO FITO-SANITARIO

Marmolejo y colaboradores (1986) señalan que, aunque las plagas no se presentan en niveles de daños, representan un potencial de daño alto. Además, es importante incrementar las poblaciones de los enemigos naturales de plagas en la biocenosis de *C. ensiformis*. Las enfermedades que parecen presentar niveles económicos de daños son virosis, antracnosis y mildew polvoso. De acuerdo con la morfología de las partículas del virus y según los virus que se han registrado como patógenos de *C. ensiformis*, aparentemente se trata de un potyvirus recientemente aislado de esta especie. Este virus sería transmitido por áfidos y por otros insectos en condiciones de campo. No se descarta además la posibilidad de que existan otros virus, especialmente isométricos, que podrían pasar desapercibidos en las observaciones al microscopio electrónico. Los autores denominan el mencionado potyvirus como

Canavalia mosaic virus (CMV), el cual se constituye a nivel mundial en el quinto virus que afecta especies de *C. ensiformis*.

7.12 TOXICIDAD

Al igual que muchas otras leguminosas forrajeras, *Canavalia ensiformis* contiene algunos componentes en los granos y los tejidos que pueden tener efecto deletéreo sobre la respuesta productiva de los animales que la consumen, en especial en los monogástricos, por lo que se considera como una planta tóxica (Roig, 1965; Legel, 1981; Escobar et al., 1984). Entre los compuestos químicos identificados que pueden actuar como factores antinutricionales se encuentran: la canavanina, la concanavalina A, la canalina y la ureasa (Mora et al., 1982; López, 1983; Escobar et al., 1984). Mora et al. (1982) informan un contenido del 4% de Canavanina en base seca que afecta la digestibilidad de la pared celular, lo cual atribuyen a un efecto inhibitorio competitivo en las reacciones en que la arginina interviene, dando lugar a un menor crecimiento de la población microbiana encargada de producir las enzimas que actúan sobre la pared celular.

Escobar et al. (1984) sugieren que el problema de la toxicidad de la Canavalia puede ser abordado por medios genéticos, seleccionando plantas con bajos contenidos de tóxicos, dadas las variaciones importantes encontradas entre variedades, lo cual ha sido confirmado por varios autores. En un ensayo para estudiar la presencia de Canavanina y Concanavalina A en 6 variedades, se encontró que existen diferencias apreciables en ambos tóxicos entre las variedades estudiadas (Vierma, et al 1984). Reina, et al (1989) hallaron que en la harina de grano de Canavalia cruda, el contenido de Canavanina varió de 2,70 a 3,00%, la ureasa de 2,43 a 2,54% y la proteína soluble de 8,00 a 9,25% en base seca, dependiendo de la variedad evaluada.

7.13 CANAVANINA

La Canavanina (ácido 2-amino-4 (guanidinooxi) butírico, es un aminoácido no proteico libre, análogo estructural de la L-arginina, es sintetizado por una gran diversidad de leguminosas incluyendo *Canavalia ensiformis*. Es un aminoácido básico, posee dos grupos amino y uno ácido, sobre una cadena lineal de carbono. Contiene dentro de la molécula el grupo guanidino.

Tiene una marcada similitud con la L-arginina. Donde el grupo metilo terminal de la L-arginina es sustituido con un oxígeno en L-canavanina. El oxígeno es más electronegativo que el carbono, por lo tanto, hace que sus electrones estén disponibles para reaccionar, lo que facilita la desprotonación y reduce el valor de la constante de disociación (pka) del grupo guanidinooxi a 7.04 menor a 12.48 pka del grupo de la arginina.

Bajo condiciones fisiológicas la L-canavanina es más aniónica que la L-arginina, esta diferencia en la carga del grupo R de la Canavanina comparado con la arginina, puede interrumpir las interacciones críticas con el grupo R dentro de una determinada proteína y efectuar adversamente la forma en la que la proteína se pliega en su conformación tridimensional; lo que alteraría la función de la proteína (Boyar y Marsh, 1982; Rosenthal, 2001; Andriole et al., 2006).

La Canavanina manifiesta efectos antimetabólicos en plantas y animales mediante su inserción en el núcleo de la célula y otras proteínas, interfiriendo con la síntesis de ADN y ARN. Es así que la mayoría de la regulación catalítica de metabolismo de la arginina, para su captación y formación de componentes estructurales y otros procesos celulares son imitados. Además, induce la formación de proteínas no funcionales en una variedad de organismos (inhibe el procesamiento proteolítico de varias proteínas), lo que afecta a la secreción de proteínas de plasma, en los macrófagos, polimorfonucleares y leucocitos, es capaz de prevenir la síntesis de L-arginina derivado del óxido nítrico (Carrillo, 2014).

La Canavanina se ha encontrado en la familia de las leguminosas. Está presente en el 60 % de las aproximadamente 540 especies examinadas y en el 35% de 150

géneros (Turner y Harborne, 1967). Se encuentra en al menos 1500 especies de lotoideae, unas de las principales subdivisiones de las leguminosas; su aparición se limita estrictamente a este grupo de las angiospermas (Rosenthal, 1990; Ekanayake y Scog, 2007).

Muchas leguminosas almacenan grandes cantidades de Canavanina y su concentración depende de la especie y del estado de desarrollo de las plantas. En plantas jóvenes la concentración oscila de 1.3 a 2.4 % de materia seca (Rosenthal y Nokomo, 2000). Algunas especies del genero canavalia poseen entre 3-5 % de Canavanina del peso seco de la semilla (Rosenthal, 2001).

7.14 DETERMINACIÓN DE AMINOÁCIDOS

Los aminoácidos, estas sustancias son componentes esenciales de un sinnúmero de preparados con fines industriales, farmacéuticos y agrícolas. Entre los diversos métodos analíticos utilizados para este tipo de compuestos, la determinación por HPLC se encuentra como uno de los más empleados. Esta determinación puede requerir derivatización o no, en dependencia del tipo de aminoácido a analizar.

El HPLC se ha convertido en un procedimiento estándar para la separación de aminoácidos, aunque la mayoría de ellos no se detectan fácilmente sin utilizar alguna modificación química. En la mayoría de las primeras separaciones de aminoácidos por cromatografía de intercambio iónico, se empleaba una reacción post-columna con ninhidrina. Actualmente, se han desarrollado sistemas en los cuales los aminoácidos se derivatizan antes de separarse en una columna de fase reversa, con la ventaja de que la derivatización pre-columna permite un análisis más rápido y con más alta sensibilidad (Godel et al., 1987).

La determinación de aminoácidos utilizada estará en dependencia del tipo a analizar. Los aminoácidos alifáticos requieren una derivatización pre-columna o postcolumna que permita la detección por UV o por fluorescencia de los mismos. Los aminoácidos aromáticos como la histidina, triptófano y tirosina, pueden determinarse por UV sin derivatización a una baja longitud de onda (Papadoyannis

et al., 1991). Las ventajas relativas de la derivatización antes o después del HPLC, están determinadas por los requerimientos de la aplicación específica. Factores como la sensibilidad requerida en la detección, cantidad de muestra disponible, tipo de muestra y procedencia de la misma, velocidad de análisis y reproducibilidad, e incluso consideraciones económicas influirán en la elección entre la derivatización pre- o post-columna en la cuantificación analítica de aminoácidos.

7.15 CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN

La cromatografía de líquidos de alta eficacia es la técnica analítica de separación más ampliamente utilizada. Las razones son la sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, es ideal para la separación de especies no volátiles o termolábiles y por su gran aplicabilidad a sustancias que son de interés en la industria. Algunos ejemplos son: aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarburos, carbohidratos, fármacos, terpenoides, plaguicidas, antibióticos, esteroides, especies organometálicas y gran variedad de sustancias inorgánicas. La fase móvil es un líquido y la fase estacionaria es una columna que puede ser de acero inoxidable.

7.16 CROMATOGRAFÍA EN FASE REVERSA

En esta técnica una mezcla de agua/solvente orgánico es comúnmente usada como fase móvil, y un sólido de área de superficie altamente no polar es empleado como fase estacionaria. La última es usualmente un empaque de alcanos adheridas a sílice, por ejemplo, con grupos alquilo de 8 o 18 carbonos cubriendo la superficie de sílice. RPC (reverse phase chromatography) es actualmente el método más popular de cromatografía en líquidos; más del 70 % de todas las separaciones por HPLC son llevadas a cabo por este método.

La cromatografía de fase inversa Utiliza un empaque enlazado hidrofóbico, usualmente con un grupo funcional octadecilo (C-18) u octilo(C-8) y una fase móvil polar, frecuentemente una fase móvil parcial o totalmente acuosa. Conforme

aumenta el carácter hidrofóbico de los solutos, la retención aumenta. El agua es el eluyente más débil. El metanol y el acetonitrilo son disolventes populares porque tienen baja viscosidad y son fáciles de conseguir con excelente pureza.

En cromatografía de fase inversa la fuerza de la retención no es la interacción favorable del soluto con la fase estacionaria, sino el efecto del disolvente de la fase móvil para forzar al soluto hacia dentro de la capa hidrocarbonada enlazada (Técnicas cromatográficas, 2007).

7.17 APLICACIONES DE CROMATOGRAFÍA DE FASE INVERSA

La técnica de fase inversa en sus varias formas es el modo más ampliamente utilizado en HPLC e incluye cerca de la mitad de los métodos de cromatografía líquida. Esta técnica es la que probablemente proporcionará retención y selectividad óptimas cuando los compuestos no tienen grupos para enlaces de hidrógeno o no tienen un carácter predominantemente alifático o aromático. El método es muy apropiado para separar solutos con base en el tamaño y estructura de los grupos alquilo. En química clínica cada vez se realiza con más frecuencia el análisis cuantitativo de las drogas de abuso por medio de esta técnica. Los productos farmacéuticos que se analizan en forma rutinaria incluyen a los barbitúricos, drogas antiepilépticas, analgésicas y sedantes. Aplicaciones adicionales de los métodos de fase inversa son los preservativos alimentarios, herbicidas y azúcares.

En el campo farmacéutico ha venido en aumento el uso de esta técnica a costa de la cromatografía de adsorción. Un amplio espectro de biomoléculas, lipofílicas o iónicas, pequeñas o grandes, pueden ser cromatografiadas debido a que el contenido de agua en la fase móvil puede variar desde el 100% hasta porcentajes muy bajos o ninguno en absoluto. Los compuestos lipofílicos, tal como los triglicéridos, que tienen una solubilidad muy pobre en los disolventes acuosos de la fase inversa, con frecuencia pueden separarse con una fase inversa no acuosa utilizando una columna empacada con octadecilo y disolventes orgánicos polares como el acetonitrilo o el tetrahidrofurano (Willard.(1991).

7.18 DERIVATIZACIÓN

Los aminoácidos pueden ser detectados directamente en el ultravioleta, ya que absorben a una longitud de onda entre 190-210 nm. Sin embargo, en esta región del espectro también absorben la mayoría de los disolventes y otros componentes de las muestras, por lo que normalmente se recurre a la formación de derivados detectables a otras longitudes de onda o fluorescentes (Cáceres et al., 1986).

La derivatización puede llevarse a cabo antes de la separación cromatográfica (precolumna), inmediatamente después de la elución (postcolumna) o, menos frecuente, en la misma columna. Cada forma de obtener el derivado presenta ventajas e inconvenientes.

En la derivatización postcolumna la separación de aminoácidos no derivatizados se lleva a cabo con una resina de intercambio catiónico con un gradiente de tampones ácidos. Después de la separación se convierten en derivados de ninhidrina coloreados para la detección colorimétrica, o en derivados de ortoftaldehído para la detección por fluorescencia.

7.19 DERIVATIZACIÓN PRE-COLUMNA

La derivatización pre-columna no necesita de equipos complicados y tienen menos restricciones, se puede utilizar de forma manual o automatizada. Esta acoplada con cromatografía de fase reversa en lugar de cromatografía de intercambio catiónico, fue originalmente introducida como respuesta al incremento en la demanda de mayor sensibilidad y mayor velocidad de análisis, las ventajas de la metodología de la derivatización pre-columna incluyen simplicidad, velocidad y alta sensibilidad. Por ello si se requiere máxima sensibilidad de detección, un reactivo fluorescente combinado con la derivatización pre-columna es el método más indicado.

Como desventaja esta la necesidad de garantizarse la completa reacción del reactivo derivatizante y la posibilidad de interferencia con la separación por exceso de reactivo, el medio de reacción o la producción de diferentes derivados de un componente. Además, la estabilidad del derivado puede ser un importante factor

durante la derivatización pre-columna, la demora entre la derivatización y la inyección llega a ser fundamental para los resultados obtenidos, (AEEIQ, 2001).

De los cuatro procedimientos principales de derivatización pre-columna conocidos, que utilizan el isotiocianato de fenilo (PITC) (Imakyure et al., 1993), el cloruro de 4-(4-dimetilaminoazofenil) sulfonilbenceno (cloruro de Dabsilo) (Yang y Smetena., 1993), el o-ftalaldehído (OPA) (Dorresteyn et al., 1996; Fermo et al., 1990; Jacobs, 1986; Jorgensen & Jensen, 1997; Baffi, 1990) y el cloruro de 9-fluoroenilmetil cloroformato (FMOC-Cl) (Guo, Y. et al., 1989), ninguno ofrece la solución ideal.

7.20 DERIVATIZACIÓN POST-COLUMNNA

La derivatización siguiendo a una cromatografía de intercambio catiónico de aminoácidos libres tiene distintas ventajas, con tal de que la instrumentación produzca velocidades y temperaturas de reacción reproducibles. Además para la derivatización no es necesario proceder al completo, y los problemas de estabilidad del derivado son insignificantes. Otras ventajas son que la automatización es fácil y que el tiempo consumido y la pérdida a causa de la preparación de la muestra son innecesarias, (AEEIQ, 2001).

La derivatización post-columna se lleva a cabo después de la separación cromatográfica, pero antes de la detección, la principal ventaja que presenta es que la cromatografía de los analitos no se ve afectada por la derivatización, (Islas G., 2013).

Una desventaja con un sistema HPLC convencional es que son necesarios instrumentos más complejos que para el método pre-columna. La derivatización post-columna requiere la adición de una o más bombas para los disolventes y reactivos derivatizantes. También se requiere la adición de un reactor post-columna, el cual llevara a un ensanchamiento de banda adicional, y por esto, un decrecimiento en la sensibilidad de detención. La columna de elución es continuamente diluida por el reactivo derivatizante, provocando un descenso en la

sensibilidad de detección. Así, la máxima sensibilidad alcanzable por derivatización post-columna será menor que en el caso de la pre-columna, (AEEIQ, 2001).

7.21 AGENTES DERIVATIZANTES

Los agentes derivatizantes más utilizados en el análisis de aminoácidos son:

7.21.1 Ninhidrina

La ninhidrina se utiliza para la determinación de los aminoácidos tras su separación en su forma natural por cromatografía de intercambio iónico. Por tanto, la derivatización con ninhidrina es exclusivamente postcolumna (White y Hart, 1992a).

7.21.2 Cloruro de dansilo

El cloruro de dansilo (DNS-Cl) es un reactivo fluorogénico de derivatización precolumna que permite la determinación de aminas primarias y secundarias. La dansilación se ha usado como un método para la determinación de aminoácidos libres, tanto los procedentes de la hidrólisis de proteínas como los aminoácidos terminales de proteínas y péptidos. Los derivados son detectables por fluorescencia (λ_{ex} 360 nm; λ_{em} 470) o por ultravioleta (254 nm) y los niveles de detección están en el orden de picomoles o femtomoles dependiendo de la sensibilidad del detector (White y Hart, 1992a).

7.21.3 Cloruro de dabsilo

Los derivados obtenidos con el cloruro de dabsilo tienen una absorción máxima a 420 nm (región visible), son altamente estables y son rápidamente separados y detectados a niveles de picomoles. Los derivados se mantienen perfectamente estables durante cuatro semanas a temperatura ambiente. Reacciona con aminoácidos primarios y secundarios para producir derivados que tienen una gran absorbancia en el rango del visible. La reacción se realiza a unos 70°C y un pH de 8 a 8,5, produciendo derivados altamente estables en 10 o 12 minutos. Se forman mono y bis-derivados de lisina, tirosina e histidina.

7.21.4 Dinitrofluorobenceno

El dinitrofluorobenceno (DNFB) es un agente de derivatización precolumna que se utiliza para la caracterización de aminoácidos terminales de cadenas peptídicas (Cáceres et al., 1986).

7.21.5 Fenilisotiocianato

El agente derivatizante fenilisotiocianato se ha utilizado durante más de 30 años en el método de la degradación de Edman para secuenciar proteínas y péptidos. Este agente reacciona con los aminoácidos libres produciendo feniltiocarbamil aminoácidos (Cáceres et al., 1986).

7.21.6 Ortoftaldehido

El ortoftaldehido (OPA), fue introducido en 1971 y es el agente de derivatización más comúnmente usado en cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa para la determinación de aminoácidos. Se ha aplicado a vinos (Pozo-Bayón et al., 2005; Soufleros et al., 2003) y vinagres (Kutlán y MolnárPerl, 2003). Otra de las aplicaciones de este reactivo ha sido la determinación de aminoácidos enantiómeros en alimentos y bebidas (Brüeckner et al., 1995).

7.21.7 Fluorenilmetil cloroformato

Se ha demostrado que el 9-fluorenilmetil cloroformato (FMOC-CL) es adecuado para la detección por fluorescencia de aminoácidos primarios y secundarios. Este reactivo da lugar a derivados estables y altamente fluorescentes (Bauza et al., 1995).

7.21.8 Etoximetilenmalonato de dietilo

El etoximetilenmalonato de dietilo (EMMDE), es otro agente de derivatización precolumna capaz de reaccionar con aminoácidos primarios y secundarios dando lugar a derivados detectables en la región UV-visible. Este agente se ha aplicado para determinar el contenido de aminoácidos en muestras de vino (Chichón et al., 2001)

7.21.9 Aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato

El 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato (AQC) es un agente para la derivatización de grupos aminos, específicamente diseñado para el análisis de aminoácidos, con la idea de simplificar la reacción de derivatización, aumentar los rendimientos de la reacción e incrementar la sensibilidad y selectividad de los derivados formados cuando se trabaja con detección por fluorescencia (Cohen y Michaud, 1993; Cohen y Antonis, 1994; Wandelen y Cohen, 1997).

7.22 LOS METABOLITOS SECUNDARIOS DESEMPEÑAN MÚLTIPLES PAPELES.

Mientras numerosos productos secundarios cumplen funciones de protección, otros son esencialmente atractivos para los polinizadores y dispersantes de las semillas. La canavanina es un aminoácido que no se encuentra en las proteínas, pero que es muy similar al aminoácido arginina, presente en casi todas las proteínas. La canavanina desempeña dos funciones importantes en las plantas que la producen en cantidades significativas. La primera es como compuesto que almacena nitrógeno en las semillas. La segunda es de defensa y se basa en la similitud de la canavanina con la arginina: muchas larvas de insectos que consumen tejidos de las plantas que contienen canavanina se envenenan. La canavanina es incorporada en las proteínas del insecto en algunos lugares donde el ADN ha codificado para la arginina debido a que la enzima que carga los ARNt específicos para la arginina no puede discriminar con precisión entre los dos aminoácidos. Las proteínas resultantes terminan con una estructura terciaria modificada y por ende, con una actividad biológica reducida. Estos defectos en la estructura de las proteínas conducen a anomalías en el desarrollo que matan al insecto. Algunas larvas de insectos pueden comer tejidos de plantas que contienen canavanina y desarrollarse normalmente. En estas larvas, la enzima que carga el ARNt específico para la arginina discrimina con precisión entre arginina y canavanina. Por lo tanto, la canavanina que ingieren no es incorporada en las proteínas que forman y la larva no resulta afectada (De Moraes *et al.*, 1998).

7.23 CLASES PRINCIPALES DE METABOLITOS SECUNDARIOS

7.23.1 Terpenos

Los terpenos, o terpenoides, constituyen el grupo más numeroso de metabolitos secundarios (más de 40.000 moléculas diferentes). La ruta biosintética de estos compuestos da lugar tanto a metabolitos primarios como secundarios de gran importancia para el crecimiento y supervivencia de las plantas. Entre los metabolitos primarios se encuentran hormonas (giberelinas, ácido abscísico y citoquininas), carotenoides, clorofilas y plastoquinonas (fotosíntesis), ubiquinonas (respiración) y esteroides (de gran importancia en la estructura de membranas).

Suelen ser insolubles en agua y derivan todos ellos de la unión de unidades de isopreno (5 átomos de C). De esta forma, los terpenos se clasifican por el número de unidades de isopreno (C5) que contienen: los terpenos de 10 C contienen dos unidades C5 y se llaman monoterpenos; los de 15 C tienen tres unidades de isopreno y se denominan sesquiterpenos, y los de 20 C tienen cuatro unidades C5 y son los diterpenos. Los triterpenos tienen 30 C, los tetraterpenos tienen 40 C y se habla de politerpenos cuando contienen más de 8 unidades de isopreno.

Se sintetizan a partir de metabolitos primarios por dos rutas: la del ácido mevalónico, activa en el citosol, en la que tres moléculas de acetil-CoA se condensan para formar ácido mevalónico que reacciona hasta formar isopentenil difosfato (IPP), o bien la ruta del metileritritol fosfato (MEP) que funciona en cloroplastos y genera también IPP.

El isopentenil bifosfato y su isómero dimetilalil difosfato (DMAPP) son los precursores activados en la biosíntesis de terpenos en reacciones de condensación catalizadas por prenil transferasas para dar lugar a prenil bifosfatos como geranildifosfato (GPP), precursor de monoterpenos, farnesil difosfato (FPP) precursor de sesquiterpenos y geranilgeranil difosfato (GGPP) precursor de diterpenos.

El grupo de los terpenos, como antes se menciona, incluye hormonas (giberelinas y ácido abscísico), pigmentos carotenoides (carotenos y xantofilas), esteroides (ergosterol, sitosterol, colesterol), derivados de los esteroides (glicósidos cardiacos), latex y aceites esenciales (proporcionan el olor y el sabor característico de las plantas). Aunque las citoquininas y las clorofilas no son terpenos, contienen en su estructura una cadena lateral que es un terpeno. A la vista de esta variedad de compuestos, es evidente que muchos terpenos tienen un importante valor fisiológico y comercial.

Muchos terpenoides son comercialmente interesantes por su uso como aromas y fragancias en alimentación y cosmética, o por su importancia en la calidad de productos agrícolas. Otros compuestos terpenoides tienen importancia medicinal por sus propiedades anticarcinogénicas, antiulcerosas, antimalaricales, antimicrobianas, etc.

7.23.2 Compuestos fenólicos

En el contexto del metabolismo, los aminoácidos aromáticos se pueden dirigir tanto al metabolismo primario como al metabolismo secundario. Las plantas sintetizan una gran variedad de productos secundarios que contienen un grupo fenol. Estas sustancias reciben el nombre de compuestos fenólicos, polifenoles o fenilpropanoides y derivan todas ellas del fenol, un anillo aromático con un grupo hidroxilo.

Desde el punto de vista de la estructura química, son un grupo muy diverso que comprende desde moléculas sencillas como los ácidos fenólicos hasta polímeros complejos como los taninos y la lignina. En el grupo también se encuentran pigmentos flavonoides. Muchos de estos productos están implicados en las interacciones planta-herbívoro. Existen dos rutas básicas implicadas en la biosíntesis de compuestos fenólicos: la ruta del ácido Shiquímico y la ruta del ácido malónico.

Los ácidos cinámico y cumárico, así como sus derivados, son compuestos fenólicos simples llamados fenilpropanoides por contener un anillo de benceno y una cadena lateral de tres carbonos.

Las cumarinas son una amplia familia de lactonas, más de 1500 identificadas en más de 800 especies de plantas, que actúan como agentes antimicrobianos y como inhibidores de germinación.

Entre los compuestos fenólicos también se encuentran los derivados del ácido benzoico que tienen un esqueleto formado por fenilpropanoides que han perdido un fragmento de dos carbonos de la cadena lateral.

Entre los compuestos fenólicos también se encuentran los flavonoides. Su esqueleto carbonado contiene 15 carbonos ordenados en dos anillos aromáticos unidos por un puente de tres carbonos. Se clasifican en función del grado de oxidación del puente de tres carbonos, siendo las principales antocianinas (pigmentos), flavonas, flavonoles e isoflavonas. Entre sus funciones se encuentra la defensa y la pigmentación.

Los taninos son compuestos fenólicos poliméricos que se unen a proteínas desnaturalizándolas.

7.23.3 Glicósidos

Los glicósidos son metabolitos vegetales de gran importancia. Su nombre hace referencia al enlace glicosídico que se forma cuando una molécula de azúcar se condensa con otra que contiene un grupo hidroxilo. Existen tres grupos de glicósidos de particular interés: saponinas, glicósidos cardíacos y glicósidos cianogénicos. Una cuarta familia, los glucosinolatos, se incluyen en este grupo debido a su estructura similar a los glicósidos.

Las saponinas se encuentran como glicósidos esteroideos, glicósidos esteroideos alcaloides o bien glicósidos triterpenos. Son por tanto triterpenoides o esteroides que contienen una o más moléculas de azúcar en su estructura. Se pueden

presentar como agliconas, es decir, sin el azúcar (el terpeno sin el azúcar, por ejemplo), en cuyo caso se denominan saponinas. La adición de un grupo hidrofílico (azúcar) a un terpenoide hidrofóbico da lugar a las propiedades surfactantes o detergentes similares al jabón que presentan las saponinas.

Los glicósidos cardiacos o cardenólidos son semejantes a las saponinas esteroideas, tienen también propiedades detergentes, pero su estructura contiene una lactona

Los glicósidos cianogénicos son compuestos nitrogenados, que no son tóxicos por sí mismos, pero se degradan cuando la planta es aplastada liberando sustancias volátiles tóxicas como cianuro de hidrógeno (HCN).

7.23.4 Alcaloides

Los alcaloides son una gran familia de más de 15.000 metabolitos secundarios que tienen en común tres características: son solubles en agua, contienen al menos un átomo de nitrógeno en la molécula, y exhiben actividad biológica. La mayoría son heterocíclicos, aunque algunos son compuestos nitrogenados alifáticos (no cíclicos) como la mescalina o la colchicina, por ejemplo. Se encuentran en el 20% aproximadamente de las plantas vasculares, la mayoría dicotiledóneas herbáceas.

A los valores normales de pH del citosol y de la vacuola (7,2 y 5-6, respectivamente), el nitrógeno está protonado lo cual confiere el carácter básico o alcalino de estos compuestos en solución. En humanos, los alcaloides generan respuestas fisiológicas y psicológicas la mayoría de ellas consecuencia de su interacción con neurotransmisores. A dosis altas, casi todos los alcaloides son muy tóxicos. Sin embargo, a dosis bajas tienen un alto valor terapéutico como relajante muscular, tranquilizante, antitusivos o analgésicos.

Se sintetizan normalmente a partir de lisina, tirosina y triptófano, aunque algunos como la nicotina y compuestos relacionados derivan de la ornitina (Ávalos & Pérez, 2009)

VIII. PROCEDIMIENTO Y DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS

8.1 OBTENCION DE LA MATERIA PRIMA

Las semillas de *canavalia* fueron proporcionadas por el instituto tecnológico de Tuxtla Gutiérrez y plantadas el 2 de noviembre de 2015 en recipientes resistentes y con buen drenaje, con una medida de 40 x 30 cm. y con capacidad de 20 kilos de suelo sin ningún tratamiento de fertilización. Se colocaron en cada recipiente aproximadamente cuatro semillas para su germinación por 12 días, regándolas cada dos días. Se dejó desarrollar solo dos plantas por cada recipiente. Se sembraron plantas para un periodo de muestreo de 12 meses. La siembra fue por triplicado, por lo tanto, Se desarrollaron en total 72 plantas en 36 recipientes con su correspondiente etiqueta.

8.2 COLECTA DE MATERIAL VEGETAL

La recolección de las plantas se llevó a cabo de forma manualmente seleccionado aquéllas con mejores características. El muestreo por triplicado se tomó cada mes por un periodo de seis meses, empezando a contar el tiempo desde la fecha de siembra, extrayendo una planta por cada recipiente para la medición de sus variables. Este procedimiento se realizó en el periodo comprendido de noviembre a mayo de 2016.

8.3 MEDICION DE VARIABLES

Para la medición de variables de las muestras se tomaron las plantas completas (de raíz a flor). Todas las plantas se limpiaron en forma manual, eliminando material ajeno al estudio.

8.3.1 MEDICION DE LONGITUDES

Para la medición de las longitudes se utilizó un flexómetro convencional pequeño. En el tallo se midió desde la base del tallo hasta la yema apical y Para la medición de la raíz principal se midió desde el cuello hasta la parte terminal de esta. Con los datos anteriores se obtuvo la longitud total de la planta.

8.3.2 MEDICION DE MASA (PESO)

Utilizando una balanza analítica se pesó la planta completa (de raíz a flor) y por separado las siguientes partes de la planta: tallo, raíz, nódulos, hojas y vainas.

8.3.3 MEDICION DE DIAMETROS

Para medir el diámetro se utilizó un vernier Surtek 0-6" (0-150 mm). se midió el tallo en tres diferentes puntos de esta para obtener un promedio (base del tallo, parte media y alta). Para la medición de los nódulos se eligieron tres por cada raíz para obtener un promedio.

8.3.4 MEDICION DE CLOROFILA

Para la medición de clorofila se utilizó un clorofilo-metro digital Minolta-SPAD 502. Se tomaron datos de tres hojas en diferentes puntos de la parte área de cada planta.

8.4 PROCESAMIENTO DE LA MATERIA PRIMA

Se separó la raíz de la planta cortándola desde la base del tallo y se sometió a calor para su deshidratación en un horno Cole-Parmer Stabletemp a 50°C por un tiempo de 5 días. El material obtenido se sometió a procesamiento físico para el molido y homogenización de las muestras. El molido se realizó con molino Mr. Coffee, IDS77.

Comenzando con la opción gruesa hasta la mas fina. Las muestras ya molidas se colocaron en bolsas de papel y se guardaron en un desecador.

8.5 EXTRACCION DE L-CANAVANINA DE RAIZ

El método de extracción fue realizado de acuerdo al descrito por Oropeza y col. (1988). Se pesó 1 g de muestra molida finamente y se le agregó 10 ml de agua destilada, se agitó durante 10 min y posteriormente se centrifugo en una centrifuga Sol-bat J-600 por 10 min a 2000 *g*. El sobrenadante fue extraído y se agregó un volumen igual de cloroformo para volver a centrifugar por 10 min a 2000 *g*. La extracción con cloroformo fue repetida 2 veces más recuperando la fase acuosa en todos los casos.

8.6 PROCESO DE DERIVATIZACION

Se transfirió 1 ml de la muestra a un vial, luego se le adicionó 100 µl de tampón de bicarbonato de sodio 0.2 M, pH 9.0. Después se añadió 100 µl de cloruro de dabsilo (20 nmol/mL disuelto en acetona), se llevó hasta sequedad en una estufa Cole-Parmer Stabletemp a 70°C. Luego se disolvió en 2 mL de etanol al 70% (v/v) (Chang, *et al.* (1981).

8.7 IDENTIFICACION DE CANAVANINA

Para la estandarización de la técnica para cuantificar *L-Canavanina* se está utilizando un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de bomba cuaternaria marca Perkin Elmer Series 200 con detector de arrellos de diodos y una columna cromatográfica de fase reversa marca Supelco LICHROSORB RP18-5 15cm x 4.6mm, 5µm. Las lecturas para la detección del aminoácido se realizaron a 436nm.

IX. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados del análisis estadístico de diferencia mínima significativa de las variables de crecimiento del sistema radicular de la planta en estudio, *Canavalia ensiformis*, fue evaluado por el programa estadístico STATGRAPHICS Centurion, el análisis de varianza se realizó por ANOVA simple y la prueba de rangos múltiples, fue por el método Tukey HSD con un nivel de confianza del 95% de probabilidad. No existen diferencias estadísticamente significativas entre letras iguales.

Se determinó las diferencias significativas del sistema radicular de *C. ensiformis* en términos de longitud raíz, peso de raíz, número de nódulos, peso de nódulos y diámetro de nódulos. En análisis estadístico de la variable de crecimiento sobre longitud de raíz se muestra en la figura 2.

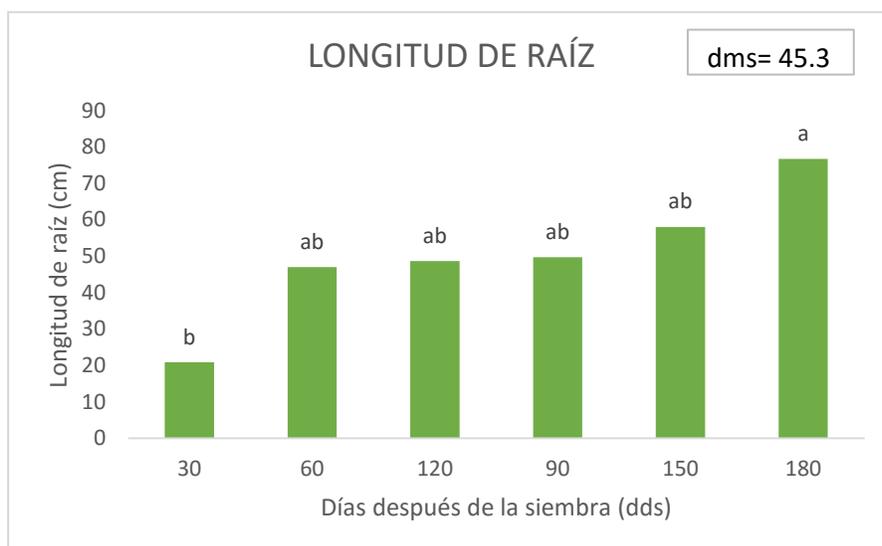


Figura 2. Análisis estadístico de la variable longitud de raíz de *Canavalia ensiformis* desde el día de la siembra hasta los 180 dde.

Según la comparación de medias de la variable longitud de raíz de *Canavalia ensiformis*, mostraron diferencia significativa en los 180 dds con respecto a los 30 dds. Indiscutiblemente esta diferencia es debido a que la planta durante los 30 dds paso por sus diferentes etapas de desarrollo, la más importante en este caso, es la

fase vegetativa, la cual dio inicio en el momento en que la semilla dispone de condiciones favorables para su germinación; emergiendo de ella en primer lugar la radícula, la cual se alarga para convertirse en raíz primaria; sobre ella, cerca de la superficie del suelo aparecen luego raíces secundarias y terciarias. Y en cambio, a los 180 dss se habla de una raíz que ya completo todas fases de crecimiento como son la longitudinal, lateral y tiene bien marcados su destinos celulares, por lo tanto su tamaño es mayor que a los 30 dde.

Quiroga et al., en el 2006 informaron que, la raíz de la *Canavalia* es pivotante y muy ramificada, con un radio de ramificación de hasta 1.5 metros. Estas características pudieron ser visualizadas, pero a una escala menor a la que informa Quiroga et al.; pues a los 180 dds apenas alcanzo de longitud de raíz 76.6 cm y el radio de ramificación observada era de menos de 30 cm.

Martín, 2009 en sus resultados demuestran la capacidad simbiótica de la *canavalia* con bacterias fijadoras de nitrógeno y hongos micorrízico arbusculares, mostraron un significativo incremento en la longitud de las raicillas y en los indicadores de la simbiosis micorrízica; lo cual corrobora las múltiples valoraciones realizadas sobre el HMA y el *Rhizobium*, como ejemplos de microorganismos simbióticos mutualistas.

En la figura 3. se analizó estadísticamente la variable peso de raíz de *Canavalia ensiformis* desde el día de la siembra hasta los 180 dds.

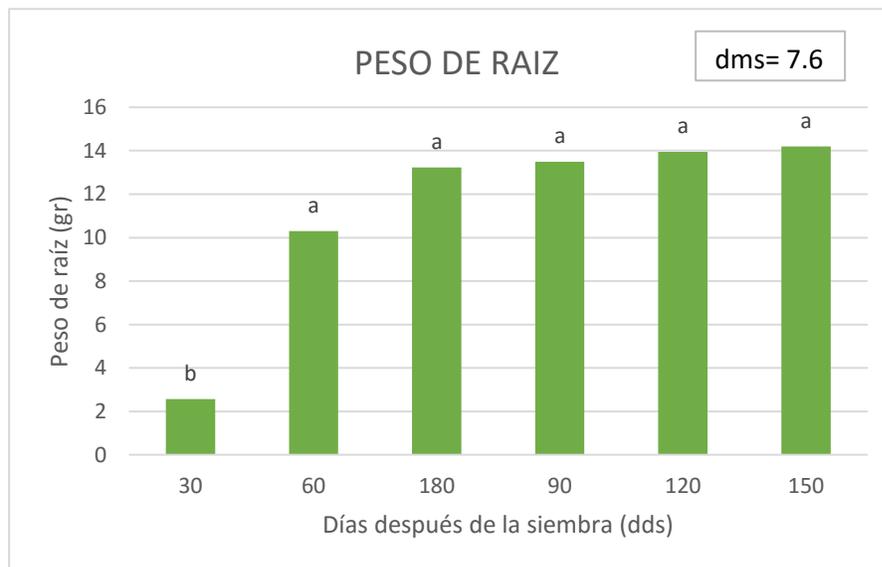


Figura 3. Análisis estadístico de la variable peso de raíz de *Canavalia ensiformis* desde el día de la siembra hasta los 180 dds.

Para la variable peso de raíz de la planta de *C. ensiformis* el análisis estadístico mostro, diferencia significativa a los 180 dds, con respecto al tratamiento de tiempo de crecimiento de 30 dds.

Natacha y Sierra (2007), publicó que la biomasa de nódulos a los 109 DDP ($1.03 \pm 0.33 \text{ g.planta}^{-1}$) representó el 22 % del peso total de las raíces ($4.51 \pm 0.16 \text{ g.planta}^{-1}$).

La observación visual de las raíces de *Canavalia* en las tres repeticiones que se tuvieron, las raíces en los primeros 30 dds fueron cortas y con gran número de nódulos pero de tamaño muy pequeño, las cuales no podían ser comparadas con la raíces obtenidas a partir de los 90 dds en donde la nodulación fue aumentando conforme al tiempo de crecimiento de la planta.

La *Canavalia* prospera y se desarrolla bien en un amplio rango de condiciones agrometeorológicas, presenta un rápido y fácil establecimiento. Es una especie que nodula con cepas nativas de *Rhizobium* (CIDICCO, 2004; Embrapa, Agrobiología, 2007).

Martín, 2009 ha demostrado que la canavalia, que posee un alto potencial de colonización por hongos micorrízico arbusculares (HMA) nativo del suelo, y es capaz de propiciar la colonización de cultivos asociados ó en sucesión.

Veresoglou et al., 2012 indica que los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) constituyen una asociación simbiótica que existe entre ciertos hongos del suelo y las raíces de las plantas superiores. En ella, ambos simbioses se benefician mutuamente. Las micorrizas reciben fuentes carbonadas provenientes de la planta, mientras que a través de las estructuras fúngicas se incrementa en las plantas, la capacidad de exploración del suelo, la absorción de nutrientes y el crecimiento y desarrollo.

Por esta importante asociación simbiótica, se analizaron las variables relacionadas con los nódulos de la raíz de *Canavalia ensiformis*, uno de ellos es el análisis estadístico de la variable número de nódulos en la raíz desde el día de la siembra hasta los 180 dds, se muestra en la figura 4.

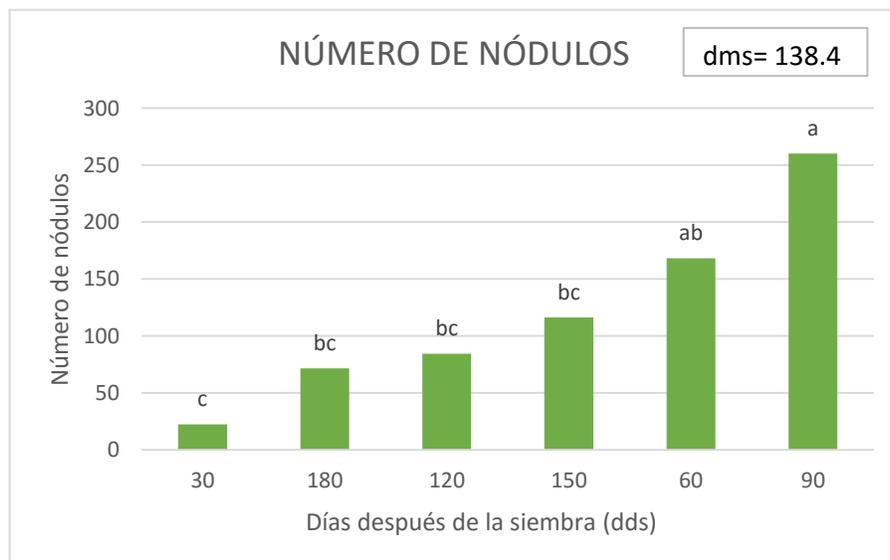


Figura 4. Análisis estadístico de la variable número de nódulos en la raíz de *Canavalia ensiformis* desde el día de la siembra hasta los 180 dds.

El análisis estadístico para la variable de número de nódulos indicó diferencia significativa en los 90 dds con respecto a tiempo de crecimiento de 150, 120, 180 y 30 dds.

Marmolejo et al., (1986) informa que *C. ensiformis* presenta buena nodulación y distribución uniforme, es decir corresponde a la categoría 3C. El número aproximado de nódulos fue 50-100 por planta. O sea que la nodulación se puede clasificar como "abundante".

Cada 30 días, el número de nódulos iba en aumento, coincidiendo con lo reportado por Marmolejo et al., (1986), obteniendo de 70 hasta 200 nódulos por planta conforme iba el crecimiento de esta.

La figura 5 muestra el análisis estadístico de la variable peso de nódulos encontrados en raíz de *Canavalia ensiformis*.

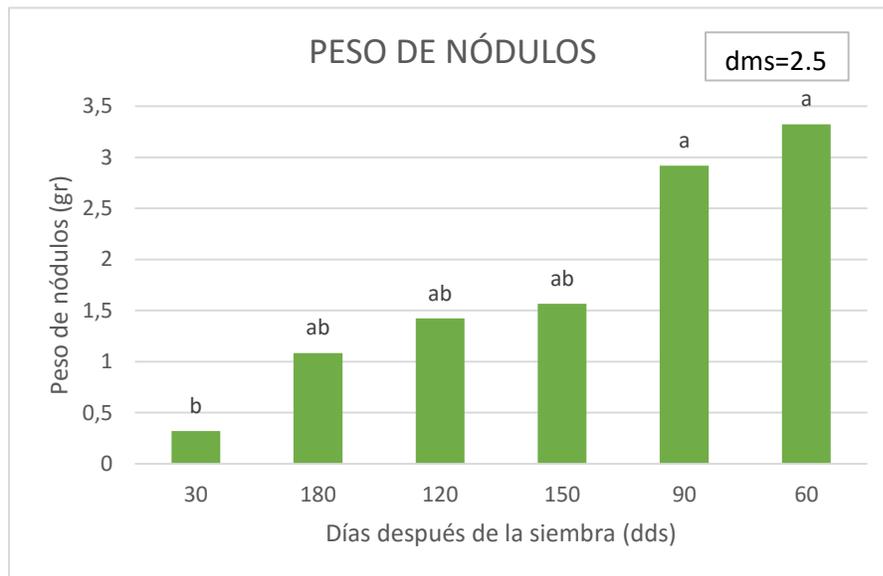


Figura 5. Análisis estadístico de la variable peso de nódulos en la raíz de *Canavalia ensiformis* desde el día de la siembra hasta los 180 dds.

El análisis estadístico para la variable peso de nódulos, mostraron diferencia significativa a los tiempos de 90 dds y 60 dds con respecto a los 30 dds.

El peso de los nódulos a los 30 días fue muy poco comparado con el peso a los 60 días después de la siembra, pero este factor no es completamente independiente de los números de nódulos, ya que cuando la planta tiene pocos nódulos, estos son generalmente mayores que cuando la planta tiene nódulos más abundantes (Neyra, 1995).

El análisis estadístico para la variable diámetro de nódulos encontrados en la raíz de *Canavalia ensiformis* se muestra en la figura 6.

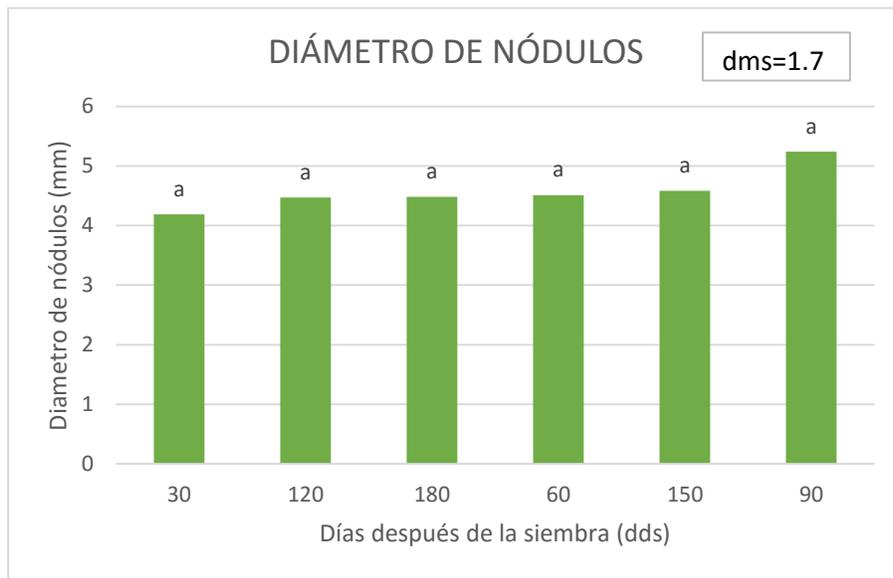


Figura 6. Análisis estadístico de la variable diámetro de nódulos en la raíz de *Canavalia ensiformis* desde el día de la siembra hasta los 180 dds.

Con respecto al análisis de la variable diámetro de nódulos de *Canavalia ensiformis*, no mostraron diferencia significativa durante todo el tiempo monitoreado en el estudio.

La observación visual de las raíces de canavalia mostro que los nódulos fueron muy abundantes desde los 30 días después de la siembra, principalmente en la parte superior de la raíz, de un diámetro aproximado de 4-5 mm, con una forma redonda o ligeramente ovalados y con un color purpura a rosado en su interior. Las

características anteriores concuerdan con los resultados de Marmolejo et al., (1986) indicando que la mayoría de los nódulos son efectivos.

El conjunto de resultados y observaciones visuales indico que *Canavalia* tuvo una fuerte capacidad de fijación simbiótica en las condiciones de estudio que fueron sin ningún tratamiento previo al suelo.

Posteriormente se midió la producción de clorofila de las plantas de *Canavalia ensiformis* cada 30 dde durante 180 días. El resultado se expresó en unidades SPAD, y los resultados se muestran en la figura 7.

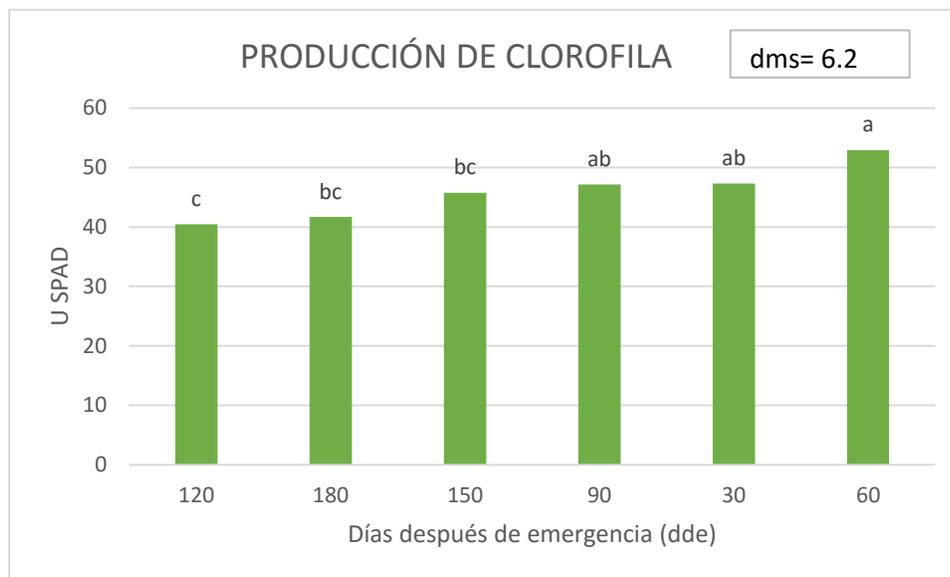


Figura 7. Producción de clorofila en plantas de *C. ensiformis* desde la emergencia hasta los 180 dde.

Para el análisis estadístico de la producción de clorofila durante 180 dde de la planta de *Canavalia ensiformis*, se observa diferencia significativa a los 60 dde con respecto al tiempo de 120 dde.

En nuestras plantas estudiadas se observó la máxima producción de clorofila a los 60 dde, siendo esta la medición más alta en todo el estudio. El tiempo donde se observó la menor producción de clorofila fue a los 120 dde, tiempo en el que había mayor floración, producción de vainas y formación de nuevas hojas.

Un elemento fundamental en el proceso de la fotosíntesis es el magnesio, elemento básico en la producción de clorofila, ya que el Mg es móvil, la planta lo moviliza hacia el tejido nuevo. Es por ello que a los 120 días bajo la clorofila, debido a que la mayor parte de las hojas se encontraban en etapas adultas o basales, cayéndose estas y formándose nuevas hojas. La producción de clorofila fue variando ya que de manera constante las plantas mudaban hojas, flores y frutos.

X. CONCLUSIÓN

El crecimiento longitudinal de la raíz depende principalmente a la simbiosis de bacterias fijadoras de nitrógeno y la planta, debido a que estos microorganismos reciben fuentes carbonadas provenientes de la planta, mientras que a través de las estructuras fúngicas se incrementa en las plantas, la capacidad de exploración del suelo, la absorción de nutrientes y el crecimiento y desarrollo de la planta.

El número de nódulos, el diámetro y peso de estos, juegan un papel importante en la expresión del peso del sistema radicular.

Hubo una alta capacidad de fijación simbiótica en las condiciones de este estudio, indicativo de numerosos rizobios y hongos micorrizos arbusculares además de condiciones físicas favorables en el suelo.

El número de nódulos producidos depende de la raza o cepa de rizobio y de las características genéticas de la planta.

El diámetro de los nódulos concuerda con lo citado por otros autores siendo el promedio de estos 4-5 mm.

La adaptación del sistema radicular al sustrato es determinante para la adquisición eficiente de nutrientes y refleja esa plasticidad del desarrollo que la raíz tiene.

La producción de clorofila es mayor en hojas nuevas que en la que están en estado de latencia, cuando se pierden las hojas, se detiene el envío de nutrientes a ella, y comienza la recuperación de algunas de las moléculas útiles en la hoja, para ser almacenados o usados en una nueva.

X. BIBLIOGRAFÍAS

Andriole, E., Colyer, K., Cornell, E. & Poutsma, J. (2006). Proton Affinity of Canavanine and Canaline, Oxyanalogues of Arginine and Ornithine from the Extended Kinetic Method. *Journal of Physical Chemistry A*, 110, pp. 11501-11508.

Asociación Escuela de Estudiantes de Ingeniería Química (AEEIQ) (2001). Análisis del contenido aminoacídico de los alimentos con fines nutricionales. *Revisiones de la ciencia*, volumen 1, número 1, p 3-19.

Ávalos, A. & Pérez, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca*, 2(3), pp. 119-145.

Aymard, G.A., & Cuello, N. (1991). Catalogo y adiciones a las especies neotropicales del genero *Canavalia* (*Leguminosae-Papilionoideae-Phaseoleae-Diocleinae*). Seminario-Taller del trabajo internacional sobre *Canavalia*. Universidad Central, Caracas Venezuela. Maracay- Venezuela. Mimeografiado

Baffi, F. (1990). HPLC determination of alphaamino-acids in phyto-planktonic marine cells. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 41(3- 4): p. 173-176.

Baker, E.G. 1926. *Leguminosae of Tropical África. Part. 1.* Pp. 383-385. London.

Bauza, T.; Blaise, A.; Daumas, F.; Cabanis, J.C. (1995). Determination of biogenic amines and their precursor amino acids in wines of the Vallee du Rhone by highperformance liquid chromatography with precolumn derivatization and fluorimetric detection. *Journal of Chromatography A* 707, 373-9.

Benavides, A., Hernández, R., Ramírez, H. & Sandoval, A. (2010, enero) *Tratado de botánica económica moderna*. Buenavista, Saltillo, Coah., México. UAAAN.

Bernal, H.Y. & Correa, J.E. (1992). *Especies vegetales promisorias de los países del Convenio Andrés Bello* tomo VIII. Colombia: SECAB Ciencia y Tecnología.

Bernal, Y.H. & Jiménez, L.C. (1990). Haba criolla: *Canavalia ensiformis* (L.) DC. (*fabaceae-faboideae*). Bogotá Guadalupe: Secab. Ciencia y tecnología.

Beyra, A., Reyes, G. Hernández, L., & Herrera P. (2004, junio). *Revisión Taxonomica del Genero Canavalia DC. (Leguminosae-Papilionoideae) en Cuba.* REV. ACAD. COLOMB. CIENC, 28, pp. 157-175.

Boyar, A. & Marsh, E.R. (1982). L- Canavanine, a Paradigm for the Structures of Substituted Guanidines. *Journal American Chemical Society*, 104 (7), pp. 1995-1998.

Brüeckner, H.; Langer, M.; Luepke, M.; Westhauser, T.; Godel, H. (1995). Liquid chromatographic determination of amino acid enantiomers by derivatization with o-phthaldialdehyde and chiral thiols. Applications with reference to food science. *Journal of Chromatography A* 697, 229-46.

Cáceres, I.; Barahona, F.; Polo, C. (1986). El análisis íntegro de los vinos. *Cromatografía de líquidos de alta eficacia. Alimentación, Equipos y Tecnología*, 141-152.

Carrillo, E.D. (2014). Efecto de la extrusión y fermentación sólida en la concentración de Canavanina en las semillas de *Canavalia*. Tesis para obtener el grado de maestro en ciencias. Colegio de postgraduados. Tabasco.

Centro Internacional de Información Sobre Cultivos de Cobertura (CIDICCO) (2004). *Canavalia (Canavalia ensiformis)*. (En línea). Consultado 10 dic. 2005. Disponible en www.cidicco.hn/especies_av_cc.htm

Chang, J-Y., *et al.* (1981). Amino acid analysis at the picomole level. *Biochem. J.* 199:547-55.

Chichón, R.; Hermosín, I.; Cabezudo, M.D. (2001). Método de análisis de los aminoácidos libres y del ión amonio en vinos y mostos, por HPLC tras derivatización con etoximetilénmalonato de dietilo (EMMDE). *Tecnología del Vino* 1, 95-100.

Cohen, S.A. & De Antonis, K.M. (1994). Applications of amino acid derivatization with 6- aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate. Analysis of graims intravenous solutions and glycoproteins. *Journal of Chromatography A* 666, 25.

Cohen, S.A. & Michaud, D.P. (1993). Síntesis of a fluorescent derivatizing reagent, 6- Aminoquinolyl-N-Hydroxysuccimi, idyl Carbamate, and its application for the analysys of hydrolysate amino acids via High-Performance Liquid Chromatography. *Analytical Biochemistry* 211, 279-287.

De Moraes, C.M., Lewis, W.J., Paré, P.W., Alborn, H.T., & Tumlinson, J.H. (1998). Herbivore infested plants selectively attract parasitoids. *Nature*, 393, 570-573.

Degener, O., & Degener, I. (1969). *Flora Hawaiiensis (Leguminosae)* Book. 7.

Díaz, M.F., Gonzáles, A., Padilla, C., & Curbelo, F. (2002). Caracterización bromatológica de granos y forrajes de las leguminosas temporales *Canavalia ensiformis*, *Lablab purpureus* y *Stizolobium niveum* sembradas a finales de la estación lluviosa. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 36, pp. 409-416.

Dorresteyn, R. C.; Berwald, L. G.; Zomer, G.; de-Gooijer, C. D.; Wieten G. and Beuvery, E. C. (1996). Determination of aminoacids using phthalaldehyde-2-mercaptoethanol derivatization. Effect of reaction conditions. J. Chromatogr. A. 724 (1- 2):p. 159-167

Ekanayake. S.K., Skog, N.G. (2007). Canavanine content in sword beans (*Canavalia gladiata*): analysis and effect of processing. Food and chemical toxicology, 45, pp. 797-803.

Embrapa, Agrobiologia. 2007. Base de datos. Leguminosas. http://intranet2.cnpab.embrapa.br/leguminosas/detalhes_busca.asp?cod_id=12&tema=resumo.

Escobar, A.; Viera, J.; Dixon, R.; Mora, M. y Parra, R. (1984). *Canavalia ensiformis*: Una leguminosa para la producción animal en los trópicos IPA. Informe anual'87. p 131.

Fermo, I.; De Vecchi, E.; Diomede, L. and Paroni, R. (1990). Serum amino-acid analysis with pre-column derivatization: comparison of the phthalaldehyde and NNdiethyl-5-fluoro-2,4-dinitroaniline methods. J. Chromatogr. 534: p. 23-35.

Fraile, M.E, García, M.D., Martínez, A., & Slomianski, R. (2007). Nutritivas y apetecibles: conozca de leguminosas comestibles. Parte I. Hojas, vainas y semillas. Departamento de biología. UAM-I. pp. 27-35.

Ganem, F.A., & Martín, O. (2000, junio 27). Lectina concanavalina A: obtención y purificación. Laboratorios Beterá, 1, pp. 24-28.

García, A. & Pérez, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. Reduca (Biología). 2(3). PP. 119-145. Recuperado de: <http://www.revistareduca.es/index.php/biologia/article/viewFile/798/814>

Gillet, J.B., Polhill, R.M. & Verdcourt, B. (1971). *Leguminosae Papilionoideae*. Flora of Tropical East Africa, 4, pp. 571-577.

Godel, H.; Seitz, P. and Verhoef, M. (1987). Automated Amino Acid Analysis Using Combined OPA and FMOC-CI Precolumn Derivatization. LC-GC INTL. 5 (2): p. 44-49.

Gómez A. (1990). Efectos de tratamientos físicos y químicos sobre factores antinutricionales presentes en las semillas de *Canavalia ensiformis*. Digestibilidad in vivo e in vitro. Tesis de postgrado en botánica. Universidad central de Venezuela. Caracas.

Guo, Y.; Huang, Y. and Yao, Z. (1989). Analysis of total amino-acids by pre-column derivatization with FMOC [fluorenyl-methyl chloroformate]. Sepu. 7(4): p. 219-221.

Imakyure, O.; Kai, M.; Mitsui, T.; Nohta, H. and Ohkura, Y. (1993). Fluorogenic reagents for aminoacids in high-performance liquid chromatography, phenanthro-oxazolyphenylisothiocyanates. *Anal. Sci.* 9 (5): p. 647-652.

Islas G. (2013). Determinación de glifosato y ácido aminometilfosfónico en suelos mediante HPLC con derivatización pre-columna. Pachuca de Soto Hgo: universidad autónoma del estado de Hidalgo.

Jacobs, W. (1986). Phthalaldehyde derivatization of amino-acids and peptides for LCEC [HPLC-electrochemical detection]. *Curr. Sep.* 7 (2): p. 39-42.

Johns, T. (1994). Defense of nitrogen-rich seeds constrains selection for reduced toxicity during the domestication of the grain legumes. En *Advances in Legume Systematics. part 5: The Nitrogen Factor* (pp. 151-167). Royal Botanic Gardens kew: J.I. Sprent & D. McKey

Jorgensen, N. and Jensen, R.E. (1997). Determination of dissolved combined amino-acids using microwave-assisted hydrolysis and HPLC pre-column derivatization for labelling of primary and secondary amines. *Mar. Chem.* 57 (3- 4): p 287-297.

Kutlán, D.; Mólnar-Perl, I. (2003). New aspects of the simultaneous analysis of amino acids and amines as their o-phthaldialdehyde derivatives by high-performance liquid chromatography. *Analysis of wine, beer and vinegar. Journal of Chromatography A* 987(1-2), 311-322.

Lackey, J.A. (1981). *Phaseoleae*. In *Advances in Legume Systematic: part. 1*. Kew Royal Botanic Gardens: R.M. Polhill and P.H. Raven.

Legel, S. (1981). Tablas de los valores alimenticios de forrajes tropicales. *Inst. Trop. Agric. Karl Marx University. Leipzig, Alemania.* 287 p.

León, M.V., Rueda, E.E., Castañeda, M.V., Méndez, A., & Michelangeli, C.C. (2007). Efecto de la concanavalina A sobre la actividad de las enzimas α -amilasa pancreática y tripsina en pollos de engorde. *Revista científica, FCV-LUZ*, 17, 83-88.

López, S. (1983). *Canavalia ensiformis* como un recurso alimenticio. IPA. Informe anual'81. p. 20

Marmolejo, J., Ruiz C., & Castellar N. (1986). Observaciones preliminares del comportamiento agronómico de *Canavalia ensiformis* (L) en condiciones del valle del cauca. *Acta Agron.*, 36, pp. 52-62.

Martín, G.M. 2009. Manejo de la inoculación micorrízica arbuscular, a *Canavalia ensiformis* y la fertilización nitrogenada en plantas de maíz (*Zea mays*) cultivadas sobre suelos Ferralíticos Rojos de La Habana. Tesis en opción al Grado Científico

de Doctor en Ciencias Agrícolas. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. UNAH. La Habana, Cuba, P. 131.

Michelangeli, C. & Vargas R.E. (1994). *L-canavanine influences feed intake, basic plasma amino acids and kidney arginase activity in chicks. J Nutrition. (124). Pp. 1084-1087.*

Mora, M.; Escobar, A., Parra, R. y Parra, Ornella De. (1982). Comportamiento granero de *Canavalia ensiformis* en Rio Negro, Estado Miranda (Venezuela». IPA. Informe anual'80. p. 29

NAS. (1979) Tropical Legumes, Resources for the future. National Academy of Sciences. Washinton, DC. P.660.

Natacha, R. & Sierra, J. (2007). Evaluación del método de la abundancia natural ^{15}N en la estimación del efecto de la transferencia de nitrógeno de la leguminosa *Canavalia ensiformis* (canavalia) sobre la nutrición nitrogenada de la planta asociada *musa acuminata* (plátano). Cultivos Tropicales, 28, pp. 77-83

Nelson, C. (2003). Efecto de la extrusión sobre la actividad de factores antinutricionales y digestibilidad in vitro de proteínas y almidón en harinas de *Canavalia ensiformis*. julio 07, 2016, de sociedad latinoamericana de nutrición Sitio web:http://www.scielo.org/ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222003000300012

Neyra, M. (1995). Manual técnico de la fijación simbiótica del nitrógeno: leguminosa/*rhizobium*. Roma: Food & Agriculture Org.

Papadoyannis, I.; Samanidou, V.; and Theodoridis, G. (1991). Quick and simple simultaneous determination for some amino-acids by reversed-phase HPLC with UV detection. J.Liq.Chromatogr. 14 (7): p. 1409-1416.

Pozo-Bayón, M. A.; G.-Alegria, E.; Polo, M. C.; Tenorio, C.; Martin Álvarez, P. J.; Calvo de la Banda, M. T.; Ruiz-Larrea, F.; Moreno Arribas, M. V. (2005). Wine Volatile and Amino Acid Composition after Malolactic Fermentation: Effect of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum* Starter Cultures. J. Agric. Food. Chem. 53(22), 8729-8735.

Quiroga, R.R., Ponce, P., Pinto, R., Alonso, R., Velasco, M.E., Zuart, J.L., Camas, R., Soto, M.L., & Leon, N.S. (2006). La asociación de cultivos maíz-canavalia: ventajas agroecológicas y económicas. Fundación PRODUCE Chiapas, a.c., 1, pp. 1-36.

Reina, Yurima; Leon, Tibusay; Montilla, J.; Vierma, Coromoto; Viera, J. y Vargas, R. (1989). Cuantificación de factores antinutricionales en cuatro cultivares de *Canavalia ensiformis*. IPA. Informe anual'87. p. 46

Roig, J.T. (1965). Diccionario botánico de nombres vulgares cubanos. Tomo I. Editora Consejo Nacional de Universidades. La Habana p.499.

Rosenthal G.A. (1977). Preparation and colorimetric analysis of L-canavanine. Elsevier, 77, PP. 147-151

Rosenthal, G.A. & Nokomo, P. (2000). The natural abundance of L-canavanine, an active anticancer agent, in alfalfa, *Medicago sativa*. *Pharmaceutical Biology*, 38(1), pp. 1-6.

Rosenthal, G.A. (1990) Metabolism of L- canavanine and L-canaline in Leguminous Plants. *Plant Physiology*, 94, pp. 1-3.

Rosenthal, G.A. (2001). L- Canavanine: a higher plant insecticidal allelochemical *Amino Acids*. 21, pp. 319-330

Sauer, J. (1964). Revision of *Canavalia*. *Brittonia*, 16, pp. 106-181.

Sheahan, C.M. (2013, march). *Plant guide for jack bean (Canavalia ensiformis)*: USDA-Natural Resources Conservation Service. Recuperado de: https://plants.usda.gov/plantguide/pdf/pg_caen4.pdf

Soufleros, E.H.; Boulompasi, E.; Tsarchopoulos, C.; Biliaderis, C.G. (2003). Primary amino acid profiles of Greek white wines and their use in classification according to variety, origin and vintage. *Food Chemistry* 80, 261-273.

Sousa, S. M. (1986). *Fabaceae*. In: *Breedlove, D. (Ed.)*. Listados florísticos de México IV. Flora de Chiapas: 90-112. Instituto de Biología, UNAM, México.

Sousa, S. M. y A. Delgado S. 1998. Leguminosas mexicanas: Fitogeografía, endemismo y orígenes. In: Ramamoorthy, T. P., R. Bye, A. Lot y J. Fa. (Eds.) *Diversidad biológica de México: orígenes y distribución*: 449-500. Instituto de Biología, UNAM México.

Sprent, J.I. & McKey, D. (1994). Defense of nitrogen- rich seeds constrains selection for reduced toxicity during the domestication of the grain legumes. En *In Advances in Legume Systematics, part 5: The Nitrogen Factor* (pp. 151-167). Kew, England: Royal Botanic Gardens.

Técnicas cromatograficas. (2007, Diciembre).UNAM. Facultad de química.

Turner, B.L., Harbome, J.B. (1967). Distribution of canavanine in the plant Kingdom. *Phytochemistry*, 6, pp. 863-866.

Udedibie, A.B.I. (1990). Nutritional evaluation of Jackbean (*C. ensiformis*) for the Nigerian poultry industry. *Ambio*. 19. Pp. 361-365.

Valdés, R. & Balbín, M.I. (2000). Curso de fisiología y bioquímica vegetal. UNAH. La Habana, Cuba. P.89.

Van Balgooy J.N.A. (1987). Separation of canavanine by high performance liquid chromatography. *Experientia*. 43(10). pp. 34-37.

Veresoglou, S. D.; Chen, B. & Rillig, M. C. (2012). Arbuscular mycorrhiza and soil nitrogen cycling. Review. *Soil Biology & Biochemistry*, vol. 46, pp. 53-62. ISSN: 0038-0717.

Vierma, Coromoto De; Viera, J. y Montilla, J.J. (1984). Valores de Canavanina y título hemaglutinante de 6 cultivares de *Canavalia ensiformis*. IPA. Informe anual '83. p. 40.

Wandelen, C. & Cohen, S.A. (1997). Using quaternary high-performance liquid chromatography eluent systems for separating 6-Aminoquinoly-N-Hydroxysuccinimidyl Carbamate-derivatized amino acid mixtures. *Journal of Chromatography A* 763, 11-22.

White, J. A.; Hart, R. J. (1992a). Derivatization methods for liquid chromatographic separation of amino acids. En: *Analysis by HPLC*. Nollet, L.M.L. Ed. pp. 53-74. Marcel Dekker, Inc. New York.

Willard. (1991) "Métodos instrumentales de análisis" Edit. Iberoamérica S.A. de C.V. México.

Yang, S.S.; Smetena I. (1993). Determination of free amino-acids in tobacco by HPLC with fluorescence detection and pre-column derivatization. *Chromatographia* 37 (11-12): p. 593-598.