

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ

INGENIERÍA BIOQUÍMICA

Residencia profesional

"EVALUACION DE LA PRODUCCION DE L-CANAVANINA DE CANAVALIA ENSIFORMIS"

PRESENTA:

Antonio Nuñez Cigarroa

ASESOR:

DR. JOAQUIN ADOLFO MONTES MOLINA

TUXTLA GUTIERREZ, CHIAPAS.

JULIO 2016

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
II. JUSTIFICACIÓN	3
III. OBJETIVOS	4
3.1. OBJETIVO GENERAL	4
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
IV. CARACTERÍSTICAS DEL ÁREA EN QUE PARTICIPÓ	4
V. FUNDAMENTO TEÓRICO	4
5.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES.	4
5.1.1. DESCRIPCIÓN DE CANAVALIA ENSIFORMIS	4
5.1.2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE CANAVALIA	6
5.1.3. FENOLOGÍA DEL CULTIVO	6
5.1.4. MORFOLOGÍA	8
5.1.5. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL FOLLAJE DE CANAVALIA	10
5.1.6. TOXICIDAD	11
5.2. MÉTODO CROMATOGRÁFICO PARA LA DETERMINACIÓN METABOLITOS	
5.2.1. PRINCIPIOS DE LA CROMATOGRAFÍA	13
5.2.2. CLASIFICACIÓN DE LOS MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS	14
5.3. CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)	15
5.3.1. TIPOS DE CROMATOGRAFÍA EN HPLC	15
5.3.2. INSTRUMENTACIÓN	16
5.3.3. CROMATOGRAFÍA EN FASE REVERSA	19
5.3.4. CROMATOGRAFÍA DE FASE INVERSA	19
5.4. DERIVATIZACIÓN DE AMINOÁCIDOS	20
5.4.1. DERIVATIZACIÓN POST-COLUMNA	21
5.4.2. DERIVATIZACIÓN PRE-COLUMNA	21

VI. MATERIALES Y MÉTODOS	22
6.1. MATERIAL VEGETAL Y SIEMBRA DE CANAVALIA ENSIFORMIS	22
6.2. MEDICIÓN DE VARIABLES	22
6.3. COLECTA DE MATERIAL VEGETAL	23
6.4. EXTRACCIÓN DE CANAVANINA	24
6.5. DERIVATIZACIÓN DE LA MUESTRA	25
6.5.1. MÉTODO DE CONCEPCIÓN ET AL.(1999)	25
6.5.2. MÉTODO DE CHANG ET AL. (1981)	25
6.6. ANÁLISIS POR HPLC	26
6.6.1. INSTRUMENTACIÓN	26
6.6.2. CONDICIONES DE CORRIDA	26
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
VIII. CONCLUSIONES	36
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

I. INTRODUCCIÓN.

La L-canavanina (ácido 2-amino-4-(guanidinooxy) butanoico), es un aminoácido no proteico que actúa como antimetabolito antagonista de la L-arginina. La enzima arginasa acepta la L-canavanina como sustrato. En el metabolismo celular normal la arginina se metaboliza por la enzima arginasa y se transforma en ornitina que por medio de la ornitin-descarboxilasa dependiente del fosfato de piridoxal se transforma en poliaminas, que tienen un papel muy importante en los procesos de crecimiento, multiplicación y diferenciación celular. La L-canavanina bloquea las funciones y efectos de la arginina a través de su potente metabolito, la L-canalina que inactiva al fosfato de piridoxal e inhibe el crecimiento celular y funciona como un antagonista de la ornitina (López Martínez, 2015).

Sus propiedades tóxicas se deben a esta similaridad estructural, ya que interfiere con el metabolismo de la arginina, inhibe la síntesis de ARN y ADN, afecta el sistema inmune y es un potente antimitótico (anti metabolito) que resulta tóxico a diferentes tipos de organismos (Concepción *et al.*, 1999).

A pesar del efecto tóxico de la L-canavanina contenida en la Canavalia, este frijol es una fuente potencial de proteínas y energía para los animales, por lo que se ha intentado eliminar o reducir la cantidad de este componente por medio de tratamientos tanto físicos como químicos, a niveles que permitan su inclusión en dietas comerciales (Concepción *et al.*, 1999).

El método más común de análisis de la L-canavanina está basado en la formación de un compuesto cromóforo por reacción con pentacianoaminoferrato y su posterior detección por espectrofotometría. Sin embargo este método ha sido

criticado por carecer de una especificidad absoluta; como alternativa a los métodos colorimétricos, se ha recurrido a técnicas más precisas y costosas, como la cromatografía liquida de alta resolución (HPLC) buscando aumentar la confiabilidad en la determinación de la Canavalia (Concepción *et al.*, 1999).

Los métodos por HPLC para la determinación de aminoácidos y compuestos aminados se han vuelto de uso rutinario en los laboratorios de nutrición animal y con esto algunos métodos para la determinación de L-canavanina han sido desarrollados, utilizando derivatización pre-columna con reactivos como Cloruro de Dansilo, realizando la separación de los compuestos en una columna de fase reversa para su posterior detección fluorimétrica (Concepción *et al.*, 1999). Sin embargo a pesar de ser un método comúnmente empleado para compuestos aminados, no se dispone de mucha literatura donde se reporte el uso de

derivatización pre-columna utilizando DABS-CI para la determinación de L-

canavanina (Concepción et al., 1999).

II. JUSTIFICACIÓN.

En la actualidad, el cultivo de *Canavalia ensiformis* se ha utilizado como una leguminosa forrajera debido a su gran importancia a nivel nutritivo.

La importancia de la Canavalia como alimentos para animales está relacionada directamente con la riqueza proteica de su forraje, ya que la cantidad de proteínas que se obtienes de ella supera ampliamente la de otras plantas forrajeras utilizadas normalmente en programas de alimentación animal.

Sin embargo, la cantidad de aminoácidos no proteicos es alto, por lo que provoca gran toxicidad en los animales al consumir esta leguminosa en grandes cantidades. Por lo tanto, en éste trabajo se pretende identificar en qué edad de la planta las concentraciones de canavanina son menores y así pudieran resultar menos tóxicas.

III. OBJETIVOS.

3.1. OBJETIVO GENERAL:

Cuantificación de la L-canavanina en hojas de Canavalia ensiformis

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Evaluar las fases de crecimiento de Canavalia ensiformis. L.
- Determinación de L-canavanina por medio de HPLC.
- Determinar la concentración de L-canavanina en hojas de plantas de Canavalia ensiformis en diferentes etapas de desarrollo.

IV. CARACTERISTICAS DEL ÁREA EN QUE PARTICIPÓ

El proyecto se llevó a cabo en el invernadero, en el laboratorio de biotecnología vegetal y el laboratorio de química analítica del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, ubicado en carretera Panamericana km 1080.

V. FUNDAMENTO TEORICO

5.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES.

5.1.1. DESCRIPCIÓN DE CANAVALIA ENSIFORMIS.

Perteneciente a la familia de las Papilionáceas y originaria del nuevo mundo, antiguamente se cultivaba en América Tropical y formaba parte de la dieta de las personas, pero posteriormente se redujo su cultivo, a pesar de las potencialidades que ofrece su utilización en los países tropicales (Cáceres, 1995).

Esta leguminosa posee una alta capacidad de adaptación a las condiciones climáticas, prospera en un rango de temperatura de 14 hasta 27°C, y abarca desde las áreas calientes de zonas templadas hasta las tropicales de alta pluviosidad. Se

desarrolla bien en el rango de precipitaciones de 700 a 4 200 mm y es capaz de sobrevivir durante prolongados periodos secos, regulando el potencial hídrico mediante la reducción del área foliar y un gran control de la apertura y el cierre de los estomas (Marín, 1983).

Su posible uso es amplio: puede servir para la alimentación de los rumiantes (planta entera, frutos, residuos de la cosecha, granos y vainas vacías), las aves, los cerdos y los humanos (granos), como cultivo de cobertura y abono verde, en la protección de los suelos y para la producción de ureasa (Cáceres, 1995).

En Veracruz ha mostrado posibilidades de servir como planta forrajera. También se encuentra en Chiapas y es una especie secundaria en las regiones tropicales del país. Presenta un buen desarrollo en clima templado, aunque no se adapta al Valle de México y el Valle de Toluca. En la región del bajío tiene una adaptación regular. *C. ensiformis* es una de las especies que ha mostrado una buena adaptación a las condiciones de tabasco y que tiene más posibilidad de utilizarse como planta forrajera para corte (Mendel, 2013).

La Canavalia ensiformis es una planta con buena cantidad nutricional, sin embargo, su utilización como comestible depende del grado de madurez. Cuando las semillas están inmaduras pueden ser consumidas sin riesgos, tanto por las personas como por los animales, pero cuando las semillas maduran, estas se endurecen, son poco apetecibles y son tóxicas, ya que contienen una lectina, la "Canavanina", de alta toxicidad, la cual produce deshidratación, enteritis, nefritis y enfisema pulmonar, las cuales son causa de muerte en los ganados vacunos (Mendel, 2013).

Bogdan (1977) señala que la Canavalia es una leguminosa que en pastoreo presenta una baja palatibilidad, la cual se mejora cuando se asocia a una gramínea y es mejor como forraje seco. Las harinas de la vaina y de semillas deben limitarse como máximo, en un 30% de la ración total para los bovinos (Mendel, 2013).

5.1.2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE CANAVALIA.

La Canavalia pertenece a la familia fabácea, teniendo como característica de esta familia la presencia de las semillas cubiertas por un vaina. A continuación se presenta la clasificación taxonómica de esta planta:

Tabla 1. Clasificación taxonómica (Canavalia ensiformis)

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Fabales
Familia	Fabaceae
Genero	Canavalia
Especie	Canavalia ensiformis

5.1.3. FENOLOGÍA DEL CULTIVO

Es una planta anual o bianual, herbácea, de alrededor de un metro de altura y muy ramificada. Florea durante todo el año, de enero a diciembre (Beyra, A. 2004). La aleloquímica de la semilla como defensa química contra los herbívoros, ha sido

descrita por (Johns 1994), quién señaló la presencia de canavanina, lectinas (con canavalina A), inhibidores de proteasa factor de flatulencia, alcaloides, saponinas, y polifenoles. (Beyra, A. 2004)

El desarrollo de una planta de *Canavalia* comprende de manera general dos fases sucesivas: la vegetativa y la productiva.

La fase vegetativa se inicia en el momento en que la semilla dispone de condiciones favorables para germinar (Fig. 1), y termina cuando aparecen los primeros botones florales; en esta fase se forma la mayor parte de la estructura vegetativa que la planta necesita para iniciar su reproducción.

Fig. 1. Germinación de Canavalia ensiformis.



La fase reproductiva se inicia con la aparición de los primeros botones o racimos florales y termina cuando el grano alcanza el grado de madurez necesario para la cosecha; a pesar de ser esta fase eminentemente reproductiva, durante las variables indeterminadas continúan, aunque con menor intensidad, produciendo estructuras vegetativas.

A lo largo de la fase vegetativa y reproductiva se ha identificado 10 etapas (tabla 2)bien definidas de desarrollo, cada una de estas etapas corresponde a un estado específico de desarrollo fisiológico y ésta determinada por un evento inicial y otro final que a su vez determina el comienzo de la siguiente etapa.

Tabla 2. Etapa de desarrollo de *Canavalia*

Etapa	Evento con que se inicia cada etapa	
Germinación	La semilla está en condiciones favorables para iniciar la germinación.	
Emergencia	Los cotiledones del 50% de la planta aparecen al nivel del suelo.	
Hojas primarias	Las hojas primarias del 50% de la planta están desplegadas.	
Primera hoja trifoliada	La primera hoja trifoliada del 50% de la planta está desplegada.	
Tercera hoja trifoliada	La tercera hoja trifoliada del 50% de la planta está desplegada.	
Prefloración	Los primeros botones o racimos han aparecido en el 50% de las plantas	
Floración	Se ha abierto la primera flor en el 50% de las plantas.	
Formación de las vainas	Al marchitar la corola, en el 50% de las plantas aparece por lo menos una vaina.	
Llenado de vainas	Llenado de semillas en la primera vaina en el 50% de las plantas.	
Maduración	Cambio de color en por lo menos una vaina en el 50% de las plantas (del verde al amarillo uniformemente o pigmentado).	

5.1.4. MORFOLOGÍA

Presenta tallos rastreros o trepadores, robustos, mayormente pubescentes. Hojas alternas pecioladas (Fig. 2), folíolos de 7-30 x 5-20 cm; lámina entera, cartácea o coriácea, completamente glabra en unas pocas especies, pero generalmente con pelos aplicados o ascendentes sobre ambas superficies foliares,

más esparcidos sobre el ápice que sobre la porción basal, con lámina comúnmente ovada y acuminada, pero además elíptica, folíolos laterales a menudo ligeramente asimétricos; pecíolos más cortos o de igual longitud que el folíolo terminal; estípulas pequeñas, estipelas pequeñas, peciólulos de 5-7 mm de longitud, muy raramente glabros, generalmente con pelos ascendentes. (Beyra, A. 2004).

Fig. 2. Canavalia ensiformis



Inflorescencias axilares, racimosos, o flores en pares o en pequeños grupos a lo largo del raquis, el cual está engrosado en los puntos de inserción, portando 2 a 6 flores pediceladas, cada una con dos bractéolas deciduas en la base del cáliz; flores comúnmente resupinadas, mayormente grandes, a menudo más bien de textura gruesa con pétalos de 1.5-6.0 cm de longitud, vistosos, púrpura-violeta, a rosados o blancuzcos. Cáliz de 8-25 mm, tubular en la base, bilabiado, verde generalmente con manchas purpúreas, con escasos a densos pelos aplicados o ascendentes; labio inferior con tres lóbulos grandes unidos a lo largo del borde superior, a veces brevemente rostrado. (Beyra, A. 2004).

Legumbre de 10-40 cm de longitud y 1.5-5 cm de ancho, linear a oblonga, los costados paralelos o ligeramente a fuertemente incurvas, aplanadas o infladas, indehiscente o dehiscente, a veces con dehiscencia explosiva, 2-valvar, las valvas coriáceas, longitudinalmente acostillada a lo largo de ambas suturas y con costillas adicionales próxima a la costilla ventral, en la mayor parte de las especies (1-3 costillas extras situadas a 3-6 mm de la sutura ventral). (Beyra, A. 2004).

Semillas de 7-35 mm de longitud, en número de 4-15, enclavadas en un endocarpo papiráceo, forma de la semilla ovoide, elipsoidal o reniforme, comprimida, hilo linear de 4-35 mm de longitud, gris o negro, generalmente rodeado por un reborde pardo, con un apéndice funicular pequeño, papiráceo, persistente, testa de color blanco, pardo, (variegado con blanco), rojo, negro o verde (Beyra, A., 2004).

Sus frutos miden aproximadamente 30 cm de largo y 3,5 cm de ancho y los granos son generalmente de color blanco, con un peso superior a un gramo cada uno. Se conoce como frijol machete, haba de burro, nescafé, poroto gigante, Jack bean, Pois sabre y otros (Cáceres, 1995).

5.1.5. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL FOLLAJE DE CANAVALIA

Según Ulrike B. (1997), la canavalia aporta grandes cantidades de nitrógeno, potasio y carbono al suelo, más que los otros elementos presentes. Por lo tanto la canavalia es una planta que aporta de 131–525 libras/ha/año de nitrógeno al suelo,

además tiene un alto rango de control de la erosión, así como también un alto a moderado rango para controlar las hierbas invasoras.

5.1.6. 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 mono gástricos, por lo que se considera como una planta tóxica (Cáceres, 1995).

Entre los compuestos químicos identificados que pueden actuar como factores anti nutricionales se encuentran: la canavanina, canavalina A, canalina y la ureasa.

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 inhibidor 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 (Cáceres, 1995).

5.2. METODO CROMATOGRÁFICO PARA LA DETERMINACIÓN DE METABOLITOS.

La palabra cromatografía fue usada por primera vez en 1906, por el botánico ruso Mikhail Tswett (del griego chroma que significa color, y graphein que significa escribir). Mikhail Tswett es recordado como el padre de la cromatografía.

Keulemans ha definido la cromatografía como un método físico de separación en el cual los componentes a separar se distribuyen entre dos fases, una de las cuales constituye la fase estacionaria, de gran área superficial, y la otra es un fluido (fase móvil) que pasa a través o a lo largo de la fase estacionaria. La fase estacionaria puede ser un sólido o un líquido dispuesto sobre un sólido que actúa como soporte, de gran área superficial (Grajales, 2007).

Otra definición, dice que es una técnica de separación basada en las diferentes velocidades con que se mueven los analitos a través de un medio estacionario y/o mediante el flujo de la fase móvil (Grajales, 2007).

También se define a la cromatografía como la separación de una mezcla de moléculas por distribución entre dos o más fases, una de las fases es esencialmente bidimensional (una superficie) y la fase restante, normalmente la principal, está en contacto con ella moviéndose a contracorriente. Son posibles varios tipos de cromatografía, dependiendo del estado físico de las fases involucradas (Pasto & Johnson, 1981).

5.2.1. PRINCIPIOS DE LA CROMATOGRAFÍA

La cromatografía es una técnica analítica que ha alcanzado un alto grado de desarrollo y modalidades en los laboratorios de química y bioquímica. En sus diversas aplicaciones, la cromatografía sirve para separar compuestos químicos diferentes a partir de mezclas multicomponentes, las cuales pueden contener varios centenares de sustancias diferentes (Grajales, 2007).

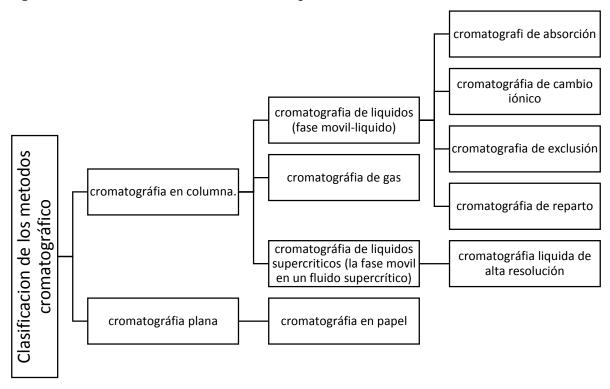
En sentido amplio se considera a la cromatografía como un método físico de separación de una mezcla. Una fase es el lecho estacionario de extensa superficie que se encuentra empacado apretadamente dentro de una columna, o distribuido sobre una superficie plana; esta fase en conocida como fase estacionaria y puede ser un sólido, o una película liquida delgada que se encuentra recubriendo al sólido. La otra fase consiste en un gas, un líquido o un fluido supercrítico que pasa a través de la fase estacionaria que es inmiscible y se conoce como fase móvil. Las dos fases se eligen de tal forma, que los componentes de la muestra se distribuyen de modo distinto entre la fase móvil y la fase estacionaria. Aquellos componentes que son fuertemente retenidos por la fase estacionaria se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil; por lo contrario, los componentes que se unen débilmente a la fase estacionaria se mueven con rapidez como consecuencia de la distinta movilidad. Los componentes de la muestra se separan en bandas o zonas discretas que pueden analizarse cualitativa y/o cuantitativa (Grajales, 2007).

5.2.2. CLASIFICACIÓN DE LOS MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

La cromatografía ha sufrido muchas variantes a lo largo de su historia; las cuales recibe nombres distintos según la técnica que se utilice para efectuar la separación. Las primeras divisiones se hacen con base a la fase móvil, y así, se habla entonces de cromatografía de líquidos (Chan, 1991). Para clasificar globalmente los procesos cromatográficos es necesario atender la forma de realizar el proceso cromatográficos, es decir, los que constituyen las distintas técnicas cromatográficas (Grajales, 2007).

Así, de acuerdo a la naturaleza de las fases involucradas, y los mecanismos de separación, la cromatografía se puede clasificar de la siguiente manera (Fig. 3) (Gómez, 2000).

Fig. 3. Clasificación de los métodos cromatográfico. Gómez, 2000



5.3. CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

La cromatografía es un método físico de separación, basado en la distribución de los componentes de una mezcla entre dos fases inmiscibles, una estacionaria y otra móvil. En cromatografía líquida, la fase móvil es un líquido que fluye a través de una columna que contiene a la fase estacionaria. La cromatografía líquida se lleva a cabo en una columna de vidrio. Después se coloca la muestra por la parte superior y se hace fluir la fase móvil a través de la columna por efecto de la gravedad. Para aumentar la eficiencia en las separaciones, en la cromatografía de alta resolución; el tamaño de las partículas de fase fija se disminuye hasta los micrones, usando altas presiones para lograr que la fase móvil pueda fluir (Loro, 2001).

5.3.1. TIPOS DE CROMATOGRAFÍA EN HPLC.

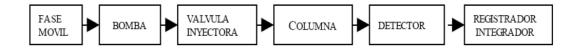
La Cromatografía de líquidos, es una técnica de análisis químico ampliamente utilizada, la cual permite separar físicamente y cuantitativamente los distintos componentes de una solución por la absorción selectiva de los constituyentes de una mezcla, consta de dos fases, una fija que suele llamarse fase estacionaria, y una móvil (fase móvil) que fluye permanente durante el análisis, y que en este caso es un líquido. La figura 4 nos muestra los tipos de cromatografía líquida que existen así como su separación cromatográfica (Loro, 2001).

Fig. 4. Clasificación de las separaciones cromatográficas. Loro 2001.

Nombre	Tipo de fase móvil	Tipo de fase estacionaria	Método de fijación de la fase estacionaria	
Partición	Líquido	Líquido	Adsorbida en un sólido poroso sostenido en una columna tubular	
Adsorción	Líquido	Sólido	Sostenida en una columna tubular	
Papel	Líquido	Líquido	Sostenida en los poros de un papel grueso	
Capa delgada	Líquido	Líquido o sólido	Sólido finamente dividido sostenido sobre una placa de vidrio: el líquido puede absorberse sobre las partículas	
Gel	Líquido	Líquido	Sostenido en los intersticios de un polímero sólido	
Intercambio iónico	Líquido	Sólido	Resina de intercambio iónico finamente dividida en una columna tubular	

5.3.2. INSTRUMENTACIÓN.

Un equipo para HPLC puede ser representado por la figura 5.



La fase móvil puede ser un disolvente puro o una mezcla de disolventes; algo importantes es que deben ser grado HPLC, esto implica un 99% o más de pureza para evitar contaminantes que puedan interferir en la elución de la muestra o bien que contengan algunas pequeñas partículas que puedan tapar la columna; por lo que es necesario filtrarlos antes de que entren a la columna (ROUESSAC, 2003).

Dependiendo del equipo, cuando se trata de una mezcla de disolventes; se puede o no programar la bomba para que dosifique las cantidades adecuadas de cada disolvente o bien, algunas otras bombas (las más antiguas) no tienen la

capacidad de realizar esta mezcla y por lo tanto esta se tiene que preparar por nosotros. Cuando durante toda la separación se usa el mismo disolvente, se denomina *isocrática* (ROUESSAC, 2003).

La bomba envía el disolvente hacia la válvula inyectora que es una válvula de seis vías que permite introducir al disolvente, la muestra contenida en el *loop* de volumen calibrado. Luego de que se produzca la separación en la columna, los componentes de la mezcla pasan al detector. El cual da una señal eléctrica proporcional a la cantidad de materia; esta señal es enviada al registrador que a su vez da un cromatográma de intensidad en función del tiempo (Fig. 6); en el cual, lo ideal es obtener picos gaussianos los cuales corresponden cada uno a un componente diferente de la muestra (ROUESSAC, 2003).

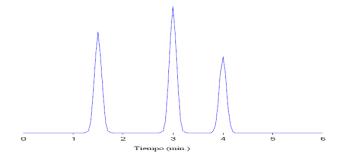


Fig. 6. Cromatográma típico obtenido por un HPLC

El integrador calcula el área de cada pico, la cual se puede relacionar con la concentración del componente si se tiene una curva patrón; si no se cuenta con ella, sólo sería cualitativa (ROUESSAC, 2003).

Los componentes básicos de un sistema para HPLC son:

- A) Depósitos para la fase móvil (disolventes)
- B) Sistema de bombeo para proporcionar presión a la fase móvil
- C) Sistema de inyección de muestras
- D) Columna cromatográfica
- E) Termostatos para las columnas
- F) Detectores
- G) Sistema para el tratamiento de datos y registrador

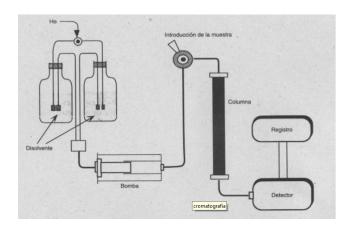


Fig. 7. Componentes básicos de un sistema para HPLC. Hernández, 2002.

Como algunas de las fases móviles usadas en HPLC pueden ser químicamente activas como ácidos, bases o líquidos corrosivos, es esencial que los componentes del sistema estén fabricados con materiales resistentes, por lo que la mayoría de las partes en contacto con la fase móvil suelen estar fabricadas con acero inoxidable (Hernández L. 2002).

Los disolventes más usados en HPLC son agua, disoluciones tampón acuosas y disolventes orgánicos como el metanol. Deben ser espectroscópicamente puros, exentos de partículas sólidas y desgasificados, esto se lleva a cabo con un gas inerte muy poco soluble como el helio.

Como fase estacionaria lo más común es usar partículas microporosas esféricas de sílice muy puro, que son permeables al disolvente (Harris, D. 2001).

5.3.3. 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; mas del 70 % de todas las separaciones por HPLC son llevadas a cabo por este método (Snyder, 1992).

5.3.4. 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 (Willard, 1991).

5.4. DERIVATIZACIÓN DE AMINOACIDOS

La derivatización es una técnica que implica una reacción química entre el analito y un reactivo para cambiar las propiedades químicas y físicas del mismo. Los usos principales de la derivatización en HPLC están sujetos a una mejor detección, cambios en la estructura molecular o polaridad del analito para mejorar la separación y la estabilización de analitos lábiles. La reacción utilizada para la derivatización debe ser rápida, cuantitativa y que produzca un mínimo de subproductos. El exceso de reactivo no debe interferir con el análisis o debe ser fácilmente extraíble de la matriz de reacción. En la figura 8 se reportan algunos de los agentes derivatizantes más utilizados en HPLC.

Fig. 8. Agentes derivatizantes utilizados para derivatización de glifosato

•	•	•
Derivatización	Reactivo	Referencia
	4-cloro-7-nitrobenzofurano (NBC-CI)	Meras I.D, 2005
	2,2-dihidroxi-1,3-indanodiona (ninhidrina)	Sundaram K.M.S, 1997;
		Bhaskara B.L, 2006
Post-Columna	4-cloro-3,5-dinitrobenzotrifluoruro (CNBF)	Qian K, 2009
	o-ftalaldehído -mercaptoetanol	Sundaram K.M.S, 1997;
	(OPA-MER)	EPA method 547, 1990;
		Span K.P, 1994; Tuinstra
		L.G.M.Th, 1987
	1-fluoro-2,4-dinitrobenceno (DNP)	Lundgren L.N, 1986
	Cloruro p-toluenosulfonilo (TsCl)	Khrolenko M.V, 2005
Pre-Columna	4-metoxibencenosulfonil fluoruro (MOBS-F)	Sun Y, 2010
	9-fluorenilmetilcloroformiato	Miles C.J, 1986; Miles C.J,
	(FMOC-CI)	1988; Pablo J.P; 2008

En CG la derivatización se utiliza para mejorar la volatilidad o para cambiar la polaridad de los analitos. En HPLC la derivatización se utiliza para la introducción de un compuesto cromóforo. Existen dos procedimientos de derivatización para la detección de glifosato en diferentes matrices por HPLC la post-columna y precolumna (Islas Guerrero, 2013).

5.4.1. DERIVATIZACIÓN POST-COLUMNA

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.

El método propuesto por la EPA para la determinación de glifosato en agua se fundamenta en la derivatización post-columna con OPA, posterior a la separación de una columna de intercambio catiónico (Islas Guerrero, 2013).

5.4.2. DERIVATIZACIÓN PRE-COLUMNA

La derivatización pre-columna no necesita de equipos complicados y tienen menos restricciones, se puede utilizar de forma manual o automatizada. Las principales ventajas que presentan son una velocidad de tratamiento rápida, simplicidad y alta sensibilidad.

La separación de los derivados formados se lleva a cabo, generalmente, mediante una columna de intercambio aniónico débil (tipo amino) aunque también se ha utilizado fase reversa C18 (Islas Guerrero, 2013).

Recientemente se ha descrito a la 1,2-naftoquinona-4-sulfonato (NQS) como un reactivo químico que produce derivados estables con amino compuestos en soluciones alcalinas (Figura 7). Las principales ventajas que presenta el uso de este reactivo es que los procesos de derivatización se realizan en medio acuoso, reacciona con aminas primarias y secundarias, forma compuestos estables y presenta una elevada absortividad molar y fluorescencia nativa (Islas Guerrero, 2013)

VI. MATERIALES Y METODOS

6.1. MATERIAL VEGETAL Y SIEMBRA DE Canavalia ensiformis

Se utilizaron semillas de *Canavalia ensiformis* proporcionadas por el Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez. La siembra se realizó en el mes de noviembre de 2015, para ello se utilizaron recipientes de PVC con un diámetro de 30 cm y altura de 40 cm, con un contenido aproximado de suelo de 29 Kg. Se sembraron en 12 recipientes semillas de Canavalia y estas fueron sembradas por triplicado (Fig. 9). Para el riego se aplicó un litro de agua cada tercer día.

Fig. 9. Siembra por triplicado



6.2. MEDICIÓN DE VARIABLES.

Las variables evaluadas fueron: número de hojas, flores, vainas y nódulos; porcentaje de clorofila (utilizando un clorofilometro SPAD-502 de la marca KONICA MINOLTA); longitud de la parte aérea y del sistema radicular (se midió con un flexómetro PRETUL de 3 m); diámetro del tallo y de los nódulos (se midieron con un Bernier digital SURTEK inoxidable). Cada variable fue medida mensualmente (Fig. 10).

Fig. 10. Medición de variables



6.3. COLECTA DEL MATERIAL VEGETAL

La colecta de las muestras, se realizó cada 30 días después de la germinación, cada planta fue extraída cuidadosamente para no dañar la raíz y los nódulos (Fig. 11). Posteriormente se separó en sus órganos principales (hoja, tallo y raíz), los cuales se llevaron a sequedad en una estufa COLE-PARMER a una temperatura no mayor a 50°C durante cuatro días hasta peso constante (Fig. 12).

Fig. 11. Colecta de material vegetal.



Fig. 12. Secado de material vegetal



6.4. EXTRACCIÓN DE CANAVANINA.

Los extractos fueron obtenidos a partir de hojas previamente secadas y finamente molidas; (molino MR.COFFEE). Se pesó 1 g de la muestra y se le agrego 10 ml de agua destilada, se agito durante 10 minutos, al cabo de esto se centrifugo 10 min a 2000 rpm en una centrifugadora SOLBAT J-600. El sobrenadante fue extraído con un volumen igual de cloroformo y centrifugado por 10 min a 2000 rpm. La extracción con cloroformo fue extraída dos veces más, recuperando la fase acuosa en todos los casos (Concepción *et al.*, 1999).

6.5. DERIVATIZACIÓN DE LA MUESTRA.

Para poder cuantificar a la canavanina fue necesario probar y estandarizar dos protocolos de derivatización diferentes.

6.5.1. MÉTODO DE CONCEPCIÓN et al. (1999)

Se tomaron alícuotas de 200 μl de cada extracto de hoja de Canavalia se colocaron en viales de 10 mL, perfectamente limpios y secos, se llevó a una estufa a 50°C hasta sequedad y después se le agrego 400 μL de bicarbonato de sodio a 500 mM a un pH 8.1 y 400 μL de DABS-CL 4 nmol/ μL., se colocó en estufa a 70°C por 30 min, posteriormente se aforo a un volumen de2 mL con buffer de fosfatos/etanol 1:1 a pH 7.0. De esta solución 20 μL fueron inyectados en cromatografía liquida de alta resolución (HPLC) (Concepción *et al.*, 1999).

6.5.2. MÉTODO CHANG et al. (1981)

Se agregó 1 mL de extracto de hoja en 100 μL de bicarbonato de sodio 0.2 M con pH 9.0, se agregó 100 μL de Cloruro de Dabsylo 2 nmol/μL (disuelto en acetona), se colocó en estufa a 70°C hasta sequedad, posteriormente se disolvió en 2 mL de etanol al 70%.

6.6. ANÁLISIS POR HPLC

6.6.1. INSTRUMENTACIÓN.

Para la determinación de canavanina se utilizó cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y consistió en un equipo marca PERKIN ELMER Serie 200 con bomba cuaternaria, inyector automático, desgasificador on-line Serie 200 y detector de arreglo de diodos. , Las lecturas se realizaron a una longitud de 436 nm. La columna utilizada fue SUPELCO 18-5 de fase reversa de 15 cm x 4,6 mm, con un tamaño de partícula de 5μm.

6.6.2. CONDICIONES DE CORRIDA

Se utilizó un gradiente en donde la fase móvil A fue acetato de sodio 25 mM (pH 6.5) con 4% de dimetilformamida y la fase móvil B acetonitrilo 100% (grado HPLC). El gradiente utilizado fue: 80% de A y 20 % de B, 1 min; y 75% de A y 25% de B, 25 min; con un flujo de 1 mL/min y un volumen de inyección de 20 μL (Modificado de Concepción *et al.*, 1999.)

VII.RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

VARIABLES DE CRECIMIENTO DE CANAVALIA ENSIFORMIS

A continuación se muestra el análisis estadístico (programa estadístico, STATGRAPHICS Centurion, 2010) a las plantas de *Canavalia ensiformis* con diferentes edades respecto a las variables de crecimiento de las plantas, (Tukey 95% de confianza). * Letras iguales no existe diferencia mínima significativa, letras diferentes indica que existen diferencias significativas entre los tratamientos.

A continuación se muestra en la fig. 13 los resultados obtenidos del análisis estadístico para la variable de crecimiento longitud de la planta (Lpla) expresada en centímetros (cm), en las plantas de *Canavalia ensiformis* durante los 180 dias después de la emergencia (dde).

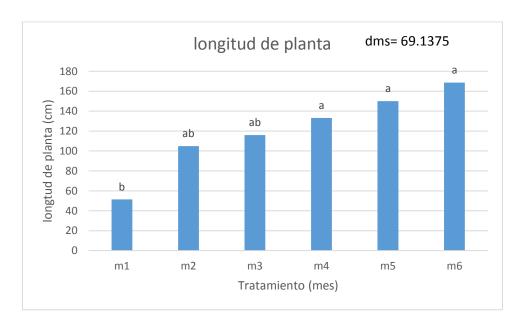


Fig. 13.- Resultados del análisis estadístico en plantas de *Canavalia ensiformis*, para la variable longitud de planta (Lpla) por cada mes; durante 180 dde.

La longitud de la planta (Lplan) de *Canavalia ensiformis*, mostraron diferencia significativa el mes 6, mes 5 y mes 4 con respecto al mes 1.

Beyra (2004) señala que la *Canavalia ensiformis* es un planta de alrededor de un metro de altura y muy ramificada.

Cruz (2012) informó que la planta de *Canavalia ensiformis* tiene su máximo desarrollo a los 133 dde comparado esto resultados con Gouveia (1999),

Gloria et al (2014) en la elaboración de un diseño experimental utilizando un testigo sin fertilizante, estiércol vacuno, inoculación micorrízica y la combinación de estiércol e inoculación de micorríza, señalan que el empleo combinado de estiércol vacuno más la inoculación micorrízica, presentó los mayores valores de altura con respecto a los demás tratamientos.

En nuestro experimento realizado se mostró que las plantas de *Canavalia* ensiformis sin ningún tratamiento de fertilización presentan los mayores valores de altura a los 6 meses después de la emergencia con una altura aproximada de 170 cm, esto puede deberse al tipo de suelo o a la altura sobre el nivel de mar, que se encuentra nuestras plantas.

En la siguiente figura (Fig 14) se muestran los resultados obtenidos del análisis estadístico para la variable de crecimiento longitud del follaje (Lfoll), expresada en centímetros (cm), en las plantas de *Canavalia ensiformis* durante los 180 dias después de la emergencia (dde).

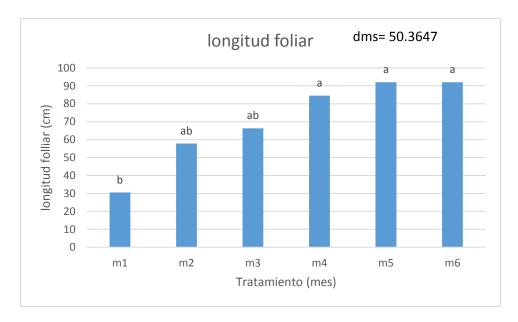


Fig. 14.- Resultados del análisis estadístico en plantas de *Canavalia ensiformis*, para la variable longitud de planta (Lpla) por cada mes; durante 180 dde.

La longitud del follaje (Lfoll) de *Canavalia ensiformis*, mostraron diferencia significativa el mes 6, mes 5 y mes 4 con respecto al mes 1.

Gloria et al (2014) señalan que la utilización de fertilizante combinando estiércol vacuno e inoculación micorrízica, presentan los mayores valores de altura en la parte aérea que al no utilizar ningún fertilizante con una diferencia de altura de 12 cm.

En nuestro experimento realizado sin fertilizantes demostramos que a los seis meses tenemos nuestros mayores valores de altura en la parte aérea de la

planta de *Canavalia ensiformis*, valores que concuerdan con los datos experimentales de Gloria et al (2014). Sin embargo este crecimiento pudo ser afectado por la adquisición de plagas debido a que las plantas de canavalia no fueron fumigadas con algún pesticida las protegiera.

En la siguiente figura (Fig. 15) se muestran los resultados obtenidos del análisis estadístico para la variable de crecimiento peso de planta (Ppla), expresada en centímetros (gr), en las plantas de *Canavalia ensiformis* durante los 180 dias después de la emergencia (dde).

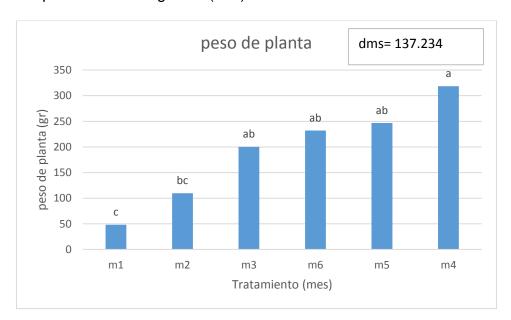


Fig. 15.- Resultados del análisis estadístico en plantas de *Canavalia ensiformis*, para la variable peso de planta (Ppla) por cada mes; durante 180 dde.

El peso de planta (Ppla) de las plantas de *Canavalia ensiformis* del mes 4, mostraron diferencia significativa con el mes 1 y mes 2.

Guerra (2012) informa que el peso fresco de follaje de canavalia, muestra un promedio de 4.16 lbs por plantas utilizando fertilizantes químicos.

En el experimento realizado se mostró que a los 120 dde la Canavalia se encuentra en su mayor peso freso, esto se debe a la cantidad de flores y vainas que se encuentra desarrollándose en la planta, sin embargo estos estos resultados son menores a los citados por Guerra (2012), debido a que no se utilizó ningún tipo de fertilizante que pudiera a ayudar al desarrollo de la canavalia.

A continuación se muestra en la fig. 16 los resultados obtenidos del análisis estadístico para la variable de crecimiento peso de follaje (Pfoll) expresada en centímetros (gr), en las plantas de *Canavalia ensiformis* durante los 180 días después de la emergencia (dde).

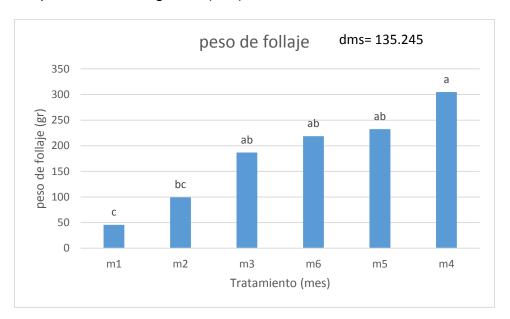


Fig. 16.- Resultados del análisis estadístico en plantas de *Canavalia ensiformis*, para la variable peso del follaje (Pfoll) por cada mes; durante 180 dde.

El peso de planta (Ppla) de las plantas de *Canavalia ensiformis* del mes 4, mostraron diferencia significativa con el mes 1 y mes 2.

Guerra (2012) informa en sus resultados obtenidos en la variable de peso fresco de follaje de canavalia, muestra un promedio de 4.16 lbs por plantas, lo que equivale a 1.88 kg / planta; rendimiento que supero los resultados obtenidos por Ulrike (1997).

De acuerdo a nuestros datos obtenidos en la variable peso de follaje de canavalia, muestran un peso máximo de 0.662 lbs por plantas, equivalente a 0.3 kg / planta, un valor mucho menor a lo citado por Guerra (2012), esto pudo ser afectado por la falta de nutrientes y fertilizantes que provocaron la ausencia de masa foliar en las plantas de canavalia.

En la Fig. 17 se muestran los resultados obtenidos del análisis estadístico para la variable de rendimiento número de hojas (Nhoj), en las plantas de *Canavalia* ensiformis durante los 180 dias después de la emergencia (dde).

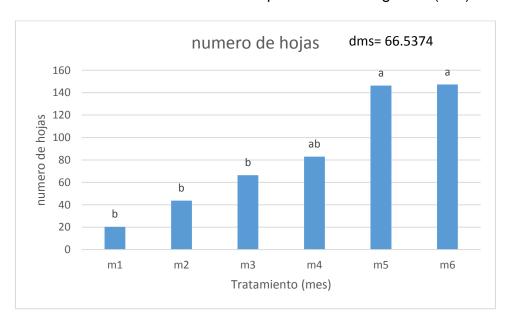


Fig. 17.- Resultados del análisis estadístico en plantas de *Canavalia ensiformis*, para la variable número de hojas (Nhoj) por cada mes; durante 180 dde.

El número de hojas (Nhoj) de las plantas de *Canavalia ensiformis* del mes 5 y mes 6, mostraron diferencia significativa con respecto al mes 1, mes 2 y mes 3.

Díaz (2003) señala una disminución en el rendimiento de hojas debido a la inducción del potencial reproductivo y al acortamiento de la longitud del día a 11 hrs luz, que ocurre en Cuba.

Según los datos obtenidos en el experimento, el rendimiento de hoja disminuyo a los cuatro meses, etapa en la cual la canavalia se encuentra en su proceso reproductivo, concordando con los datos citados por Díaz (2003), sin embargo esto también pudo deberse a la falta de nutrientes y a un posible estrés hídrico debido a que el riego no fuera suficiente para el sistema radicular con el que cuenta dicha planta.

A continuación se muestra en la fig. 18 los resultados obtenidos del análisis estadístico para la variable de rendimiento número de flores (Nflo), en las plantas de *Canavalia ensiformis* durante los 180 dias después de la emergencia (dde).

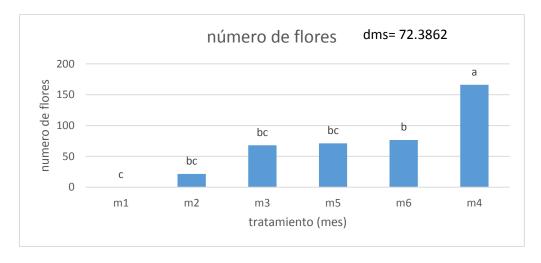


Fig. 18.- Resultados del análisis estadístico en plantas de *Canavalia ensiformis*, para la variable número de flores (Nflo) por cada mes; durante 180 dde.

El número de flores (Nflo) de las plantas de *Canavalia ensiformis* del mes 4, mostraron diferencia significativa con respecto a los demás meses.

De acuerdo a los resultados obtenidos, el mayor número de flor en canavalia se presentó a los cuatro meses después de la emergencia, sin embargo no todas estas flores fueron fecundadas.

A continuación se muestra en la fig. 19 los resultados obtenidos del análisis estadístico para la variable de rendimiento número de vainas (Nvai), en las plantas de *Canavalia ensiformis* durante los 180 dias después de la emergencia (dde).

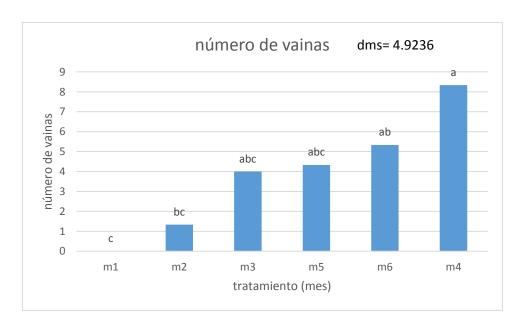


Fig. 18.- Resultados del análisis estadístico en plantas de *Canavalia ensiformis*, para la variable número de vainas (Nvai) por cada mes; durante 180 dde.

El número de vainas (Nvai) de las plantas de *Canavalia ensiformis* del mes 4, mostraron diferencia significativa con respecto al mes 1 y mes 2.

Guerra (2012) informó que al disminuir el porcentaje de fertilizante químico en la canavalia pudo obtener un promedio de 9 vainas / planta de canavalia, comparando resultados con Skerman (1991) quien obtuvo de 7 – 12 vainas por plantas de canavalia.

Según los resultados obtenidos en la variable número de vainas por planta de canavalia, muestra un promedio de 7 vainas / plantas de canavalia sin utilización de ningún fertilizante químico. Se demostró mediante la prueba de Tukey que el número de vainas obtenidas es similar a los datos presentados por Guerra (2012). Sin embargo esta falta de vainas pudo deberse por la poca fecundación de las flores, debido a la ausencia de insectos polinizadores, o por estrés hídrico que pudo ocasionar la caída de flores.

ANALISIS POR HPLC.

Con respecto a los análisis por HPLC, aún se está estandarizando el método correcto para su identificación de L-canavanina.

VII. CONCLUSIÓN.

Con los resultados de la investigación estadística presentada, es posible concluir:

- 1.- la longitud de canavalia ensiformis no disminuye su crecimiento a los180 dde, a pesar de la floración y frutación.
- 2.- la longitud del follaje de canavalia ensiformis crece de manera contante durante 180 dde, disminuyendo su velocidad de crecimiento en la etapa reproductiva.
 - 3.- El peso de la planta de canavalia es mayor a los 120 dde.
- 4.- El número de hojas en canavalia ensiformis aumenta con respecto a los días después de la emergencia.
- 5.- El número de vainas no corresponde a la cantidad de flores producidas, esto puede deberse a la ausencia de insectos polinizadores y al estrés hídrico.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Abbott, D, y Andrews, R, S. (1973). *Introduccion a la Cromatografía*. Tercera edición, España. Editorial alambra.

Browning, D, R. (1971) *Cromatografía*, Primera edición. España, editorial Mc Graw-Hill.

Beyra, AG; Reyes, L. 2004. Revisión taxonómica del género *Canavalia* DL (Leguminosae-Papilionoideae) en Cuba (en línea). Cuba, Academia Colombiana de Ciencias Exactas Físicas y Naturales. Consultado 2 oct 2008. Disponible en http://www.accefyn.org.co/PubliAcad/Periodicos/volumen28/107/157-175.pdf

Chan Pavón, M, V. (1991). *Manual practica de cromatografía*. Universidad autónoma de Yucatán. Merida Yucatán

Concepción M.(1999) Determinacion de L-canavanica por cromatografía liquida de alta resolución en fase reversa y por colorimetría. Rev. Biomed; 10:17-22.

Caceres O, Gonzáles E, Delgado R. (1995). *Canavalia ensiformis:*leguminosa forrajera promisora para agricultura tropical. Pastos y forrajes. Vol. 18,

No 2.

CRUZ CHANQUIN, B. A. (2012), DIAGNÓSTICO, INVESTIGACIÓN Y SERVICIOS, DIRIGIDO A LA CARACTERIZACIÓN DE LAS ESPECIES DE Crotalaria juncea y Canavalia ensiformis EN EL APORTE DE NITRÓGENO EN CONDICIONES DE CULTIVO INTERCALADO EN CINCO Y SEIS DENSIDADES DE SIEMBRA EN CAÑA DE AZÚCAR Saccharum spp. REALIZADO EN LA FINCA LA HABANA, LA GOMERA, ESCUINTLA, PROPIEDAD DE CORPORACIÓN PANTALEÓN CONCEPCIÓN, S.A., UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS GUATEMALA,

Díaz, María F. (2003). Comportamiento de la producción de forraje y granos de *Canavalia ensiformis, Lablab purpureus y Stizolobium niveum* en siembras de septiembre. Revista Cubana de Ciencia Agrícola, Tomo 37, No. 1

Edwards, D. I (1975). *Cromatografía, Principios y técnicas*. Primera edición, México, Editorial el manual moderno.

Ettre, L, S. (1980). *High – Performance liquid Chomatography*, New York. Editorial Horvat Academia Press.

Guerra Castillo, O. N. (2012). Evaluación agro – financiera de tres sistemas de maíz + leguminosas y lombriabono; y su efecto en la recuperación del suelo en la estación experimental y de prácticas de la universidad de el salvador. San Salvador

Gomez Rosa, K, V. (2000). Obtención de una suspensión celular de agave fourcloydes para la obtención de saponinas. Tuxtla gutierrez, Chiapas

Grajales Posada (2007). Aplicación de la cromatografía como técnica en nuevos descubrimientos de investigación. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.

HARRIS, D. C. (2001) "Análisis químico cuantitativo". Ed. Reverte, S. A. Barcelona.

HERNÁNDEZ, L. y GONZÁLEZ, C. (2002) "Introducción al análisis instrumental". Ed. Arial Ciencia.

Islas Guerrero G. (2013). Determinación de Glifosato y ácido aminometilfosfonico en suelos mediante HPLC con derivatización pre-columna. Pachuca de Soto, Hidalgo.

LORO, J. F. (2001) "Manual de cromatografía". Colección Textos Universitarios.

L. R. Snyder. (1992). *Chromatography, Part A: fundamentals and techniques*. 5th edition. Editado por E.Haftman Del Journal of Chromatography Library, p. A25-A26.

López Martínez B, Gutierrez Romero M, Ruiz Bedolla E. (2015). *Evaluación* del aminiacido L-canavanina como tratamiento coadyuvante en leucemias agudas linfoblásticas. Rev Hematol Mex; 16:3-8

MARIN, D. 1983. Efecto de diferentes densidades y arreglos espaciales sobre el rendimiento y otras variables en Canavalia ensiformis (L.) D.C. IPA. Informe anual'82.

Mendel Contreras Carlos I.(2013). Efecto entre la distancia entre plantas y surcos sobre el rendimiento y calidad de semilla Clitoria ternatea CV TEHUANA y Canavalia ensiformis. Montecillo, Estado de Mexico.

MORA, M.; DIXON, R.; PARRA, R. & ESCOBAR, A. (1983). Caracterización de la fermentación ruminal y degradación de partes de la planta de Canavalia ensiformis. IPA. Informe anual'81.

Martín A., G. M.; Gonzales C., P. J. (2014), "efecto de la aplicación de estiércol vacuno e inoculación micorrízica sobre el crecimiento y producción de semillas de *Canavalia ensiformis* en suelos ferralíticos rojos lixiviados." Cultivos Tropicales, vol. 35, no. 1, p. 86-91

ROUESSAC, F. y ROUESSAC, A. (2003) "Análisis químico: Métodos y técnicas instrumentales modernas". Ed. Mc Graw Hill.

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