

BÚSQUEDA DE BIOMARCADORES PARA LA DISCRIMINACIÓN DE LAS VARIEDADES DE KAÑIWA (*Chenopodium pallidicaule* Aellen) “CHILLIWA” Y “RAMIS” POR MEDIO DE METABOLÓMICA NON-TARGETED

Carlos Ríos^a, Fabio Espichán^a, Candy Ruiz^a, Rosario Rojas^a

RESUMEN

La “kañiwa” (*Chenopodium pallidicaule* Aellen) es un grano andino muy nutritivo caracterizado por su alto contenido de proteínas y buen perfil de aminoácidos. La diversidad de esta especie viene siendo caracterizada por estudios agro-morfológicos y genómicos, los cuales no son completamente eficientes para discriminar entre las accesiones y variedades. Actualmente se utiliza la metabolómica como una herramienta adicional para la delimitación de especies. En tal sentido, en el presente trabajo se llevó a cabo el análisis metabolómico “non-targeted” de dos variedades de kañiwa (“Ramis” y “Chilliwa”) provenientes del departamento de Puno, Perú. Para el análisis se utilizó la cromatografía líquida de ultra-alta performance acoplada a la espectrometría de masas de alta resolución con analizador Orbitrap (UHPLC-HRMS). Para la identificación de los metabolitos se utilizaron los softwares MSDIAL y MSFINDER. Los perfiles químicos obtenidos fueron resumidos en una sola tabla para su análisis estadístico con el software SIMCA P. El modelo estadístico OPLS-DA permitió la clasificación de ambas variedades de kañiwa y el gráfico S-plot puso en evidencia los principales biomarcadores putativos para la discriminación de ambas variedades. El metabolito delfinidina-*O*-(6"-*O*- α -ramnopiranosil- β -glucopiranosido) fue identificado como uno de los principales biomarcadores para la kañiwa “Ramis”.

Palabras clave: *Chenopodium pallidicaule*, kañiwa, metabolómica, UHPLC-MSMS

SEARCH FOR BIOMARKERS FOR THE DISCRIMINATION OF THE “CHILLIWA” AND “RAMIS” VARIETIES OF KAÑIWA THROUGH NON-TARGETED METABOLOMICS

ABSTRACT

“Kañiwa” (*Chenopodium pallidicaule* Aellen) is a very nutritious Andean grain characterized by its high protein content and good amino acid profile. The diversity of this species has been characterized by agro-morphological and genomic studies, which are not completely

^a Unidad de Investigación en Productos Naturales, Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Av. Honorio Delgado 430, Lima 31, Perú, e-mail: rosario.rojas@upch.pe

efficient to discriminate between accessions and varieties. Metabolomics is currently used as an additional tool for species delimitation. In this sense, in the present work a non-targeted metabolomic analysis of two varieties of kañiwa (“Ramis” and “Chilliwa”) from the department of Puno, Peru was carried out. For the analysis, ultra-high performance liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry with Orbitrap analyzer (UHPLC-HRMS) was used. The MSDIAL and MSFINDER software were used to identify the metabolites. The chemical profiles obtained were summarized in a single table for statistical analysis with the SIMCA P software. The OPLS-DA statistical model allowed the classification of both varieties of kañiwa and the S-plot graph showed the main putative biomarkers for discrimination of both varieties. The metabolite delfinidine-O-(6"-O- α -ramnopyranosyl- β -glucopyranoside) was identified as one of the main biomarkers for kañiwa “Ramis”.

Key words: *Chenopodium pallidicaule*, kañiwa, metabolomics, UHPLC-MSMS

INTRODUCCIÓN

La “kañiwa” (*Chenopodium pallidicaule* Aellen, Chenopodiaceae) es una planta herbácea anual cuyo grano se considera muy nutritivo por su alto contenido de proteínas y buen perfil de aminoácidos. Crece principalmente en los altiplanos de Perú y Bolivia entre los 3600 a 4400 m.s.n.m. en ambientes extremos donde la temperatura promedio anual es menor a 10 °C. Debido a su resistencia al frío extremo, alto contenido proteico y a la facilidad con que es cultivada, la kañiwa es considerada un componente importante para la seguridad alimentaria¹. La kañiwa, al igual que su pariente cercano la quinua (*Chenopodium quinoa*), no contiene gluten, por lo que ambos granos andinos son de gran interés para personas con enfermedad celiaca. A diferencia de la quinua, la kañiwa tiene la ventaja de tener bajo contenido de saponinas, por lo que no es necesario hacer lavados con abundante agua para retirar del grano estos compuestos de sabor amargo².

Las variedades de kañiwa se diferencian en base a la forma de crecimiento de la planta, que puede ser erguida o muy ramificada; así como en los diferentes colores que presentan el tallo, follaje, vesículas y semillas³.

La Estación Experimental Zonal “Illpa” (Puno) del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) conserva alrededor de 430 accesiones de kañiwa. Entre las variedades más conocidas están por ejemplo la Ramis, Chilliwa, Cupi, Akallpi, entre otras. Debido a su gran diversidad morfológica, la discriminación de las accesiones de kañiwa por taxonomía clásica es complicada, por lo que se ha empezado a usar herramientas moleculares como el AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)⁴.

La discriminación de especies puede llevarse a cabo mediante estudios genómicos, y complementariamente por estudios proteómicos y metabolómicos. La metabolómica es el estudio integral del metaboloma, el cual se define como el conjunto completo de las

moléculas de bajo peso molecular (metabolitos) que son químicamente transformadas por el metabolismo de un sistema biológico. La metabolómica de tipo “non-targeted” realiza un análisis exhaustivo de todos los analitos medibles en una muestra⁵. Los perfiles químicos detallados pueden ser adquiridos por diferentes técnicas analíticas, siendo una de las más utilizadas la cromatografía líquida de ultra-alta performance acoplada a la espectrometría de masas de alta resolución (UHPLC-HRMS). Los datos obtenidos son sometidos a análisis estadísticos multivariados como el PCA (Análisis de componentes principales) con el objetivo de hallar similitudes y diferencias químicas entre las muestras (variedades, especies, accesiones) y el OPLS-DA (Análisis discriminante de proyecciones ortogonales de estructuras latentes) para postular biomarcadores que permitan su diferenciación. Utilizando esta estrategia Wang *et al.*⁶ encontraron los biomarcadores que permiten discriminar la especie *Hedyotis diffusa* de *Hedyotis corymbosa*. Otro ejemplo es el trabajo de Luo *et al.*⁷ quienes utilizaron la metabolómica non-targeted para detectar los metabolitos que diferencian dos variedades de *Citrus reticulata*.

El objetivo del presente estudio fue utilizar el enfoque metabolómico non-targeted para encontrar potenciales biomarcadores que permitan discriminar dos variedades de kañiwa (*Chenopodium pallidicaule* Aellen), plomo claro (“Chilliwa”) y roja (“Ramis”) provenientes del departamento de Puno.

PARTE EXPERIMENTAL

Material vegetal y tratamiento de muestras

Las variedades de kañiwa estudiadas fueron la kañiwa plomo claro (“Chilliwa”) y la kañiwa roja (“Ramis”). Las muestras procedieron del distrito de Ayaviri, provincia de Melgar, departamento de Puno y fueron identificadas por el Dr. Mario Tapia Núñez, de la Universidad Global del Cusco. Las semillas de kañiwa fueron molidas hasta la obtención de un polvo fino. Para cada variedad de kañiwa se procedió con la extracción de los metabolitos a partir de 100 mg de muestra que fueron colocados en 3 microviales de 1,7 mL. La extracción fue llevada a cabo a temperatura ambiente con 800 µL de metanol al 80% (Metanol LCMS y agua tipo 1, 18 MΩ.cm) bajo condiciones de agitación con vortex por 1 minuto y ultrasonido por 10 minutos. Luego, los microviales fueron sometidos a centrifugación por 10 minutos (10000 rpm, 4 °C); a partir de cada sobrenadante se tomó 600 µL que fueron trasladados a tres nuevos microviales. Se repitió el mismo procedimiento de extracción por segunda vez con el marco inicial para obtener 3 microviales con 1200 µL de extracto de cada variedad de kañiwa. Asimismo, se preparó un microvial de control de calidad (QC) mezclando 100 µL de cada microvial de los seis extractos (3 extractos por cada variedad de kañiwa) hasta obtener un volumen final de 600 µL. El QC proporciona una medida de la repetibilidad y robustez, a su vez permite monitorear el sistema y la estabilidad de las muestras en el transcurso del análisis. Finalmente, se preparó una muestra de Blanco que consistió de un volumen de 600 µL del solvente de extracción (metanol 80%) bajo las mismas condiciones de extracción de las muestras, pero en ausencia de muestra.

Perfil químico de extractos por UHPLC-HRMS

Para la separación de los metabolitos se utilizó un cromatógrafo líquido UHPLC Dionex Ultimate 3000 Thermo Scientific equipado con un detector de arreglo de diodos y columna cromatográfica Phenomenex Luna® Omega C18 100 Å (150 mm x 2,1 mm x 1,6 µm). La fase móvil consistió de ácido fórmico al 0,1% en agua tipo I (Solvente A) y ácido fórmico LCMS al 0,1% en acetonitrilo LCMS (Solvente B). Los compuestos fueron eluidos de la columna utilizando el siguiente sistema de gradiente: 5% B de 0-5 min, 5-95% B 5-12 min. La velocidad de flujo fue 0,3 µL/min, el volumen de inyección fue 5 µL y la temperatura del horno de la columna fue 30 oC.

El Espectrómetro de masas fue un equipo de Thermo Scientific™ Q Exactive™ híbrido Cuadrupolo-Orbitrap. La detección de masa fue llevada a cabo utilizando una fuente de electrospray HESI en modos de ionización positiva y negativa a 70000 de poder de resolución utilizando el modo Full MS/ddMS2 (Top N) sin fragmentación HCD. Para la ionización MS2 se utilizó el modo dd-MS2/dd-SIM FT con resolución 17500. El tipo de data de espectro fue profile. El rango de masa fue de 140-2000 Da y la temperatura del capilar fue 300 °C con voltaje de ionización spray a 4.0 kV (modo positivo) y 4,2 kV (modo negativo). El tiempo de adquisición fue de 15 min.

Análisis de datos

Luego de la adquisición de cromatogramas por UHPLC-HRMS, la data fue convertida de formato *.RAW (Thermo) a formato *.ABF utilizando el software ABF convert descargable online⁸. Posteriormente, la data fue importada al software MS-DIAL⁹ para su alineación, deconvolución, identificación y normalización. Para la identificación automatizada de las características o entidades con MS DIAL, se utilizaron las bases de datos públicas (MS/MS Public (+, -)), bases de datos de MS-FINDER y la base de datos del Diccionario de Productos Naturales (DNP) 26.2. Los análisis multivariados, tales como el Análisis de Componentes Principales (PCA), Proyecciones ortogonales a estructuras latentes-Análisis discriminante (OPLS-DA), así como el S-plot para la identificación de las variables que influyen en el modelo OPLS-DA (biomarcadores), fueron realizados con el software estadístico SIMCA P 15.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Luego del análisis cromatográfico por UHPLC-HRMS de los extractos metanólicos de las muestras de semillas de kañiwa, se obtuvieron los perfiles metabolómicos de cada variedad. Mediante el software MS-DIAL se encontraron 2189 señales cromatográficas (“características”) en el modo ESI positivo y 2779 en el modo ESI negativo. Estas señales corresponden a los metabolitos extraídos de las variedades de kañiwa, pero también incluyen las señales cromatográficas del solvente de extracción, compuestos aductos, dímeros, entre otros. La data del proceso MSDIAL fue exportada en formato *.CSV para su tratamiento con el software Excel. Se realizó un primer filtrado de características, para ello se omitieron los datos cuya relación del promedio de áreas relativas del blanco y del QC sea mayor a 1,5; cuyo

valor p sea mayor a 0,05 en la prueba t de Student y cuya desviación estándar relativa (RSD) de las áreas del QC sea mayor a 30 %. Posteriormente, se utilizó el Package MSCombine del software estadístico R10. MSCombine permite el análisis estadístico de un único conjunto de datos, por lo que evita la necesidad del análisis en paralelo (uno por cada polaridad). También posibilita filtrar características o entidades, tales como los compuestos aductos más comunes encontrados en los dos modos de ionización. De esta forma, se aseguró que el análisis por PCA no contenga información irrelevante. El PCA es un análisis multivariado no supervisado que permite reducir la dimensionalidad de la data, por lo cual es considerado un método que permite observar visualmente la estructura interna de la data tal cual, sin asignación de variables categóricas.

La figura 1 muestra el PCA de la tabla resultante del análisis por MSCombine. La varianza explicada es 80 % (PC1 y el PC2 explican el 53 % y el 27 % de la varianza, respectivamente), mientras que el valor de ajuste y predicción R^2X y Q^2 fueron 0,793 y 0,616, respectivamente. El R^2X proporciona la calidad de ajuste del modelo. El parámetro R^2X describe la fracción de los datos originales explicados por el modelo (si $R^2 = 1,0$ significa que el modelo explica el 100 % de los datos). Mientras que Q^2 describe la capacidad predictiva del modelo y es la fracción de los datos originales explicada por el modelo de validación cruzada que mide la capacidad del modelo para predecir un nuevo conjunto de datos¹¹. Para un modelo biológico se considera un valor de R^2X y $Q^2 > 0,7$. Del PCA se observa un buen agrupamiento de las muestras (clusters) por cada variedad y una buena separación de clases (variedades) de kañiwa. Se observa que las muestras QC están cerca del centro del diagrama y juntas, lo que certifica la robustez del análisis. También se muestra la elipse de confianza, o Hotelling T^2 , que es una versión t -Student para análisis multivariado y permite observar valores atípicos (valores fuera de la elipse se consideran valores atípicos) bajo un nivel de significancia de $p = 0,05$.

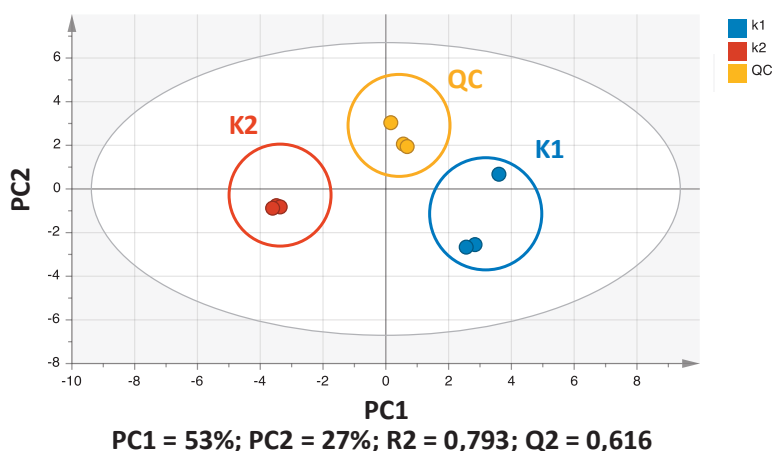


Figura 1. PCA de las dos variedades de kañiwa (K1: variedad “Chilliwa”; K2: variedad “Ramis”); QC (muestra de control de calidad, utilizada para monitorear el sistema y la estabilidad de las muestras en el transcurso del análisis).

Del PCA se pueden excluir las muestras QC para realizar un análisis OPLS-DA. La figura 2 muestra el análisis supervisado OPLS-DA que, a diferencia del PCA, permite asignar categorías para el análisis discriminante (ceros y unos, 0 y 1). El OPLS-DA, realizado con escalado Pareto, permite forzar la separación de las clases categóricas al proyectarlas sobre el eje Y del diagrama. El software SIMCA P analiza los datos con la correspondiente clasificación de las variables. Se observa una clara separación de las variedades que son estadísticamente significativas con valores de R^2Y y Q^2 igual a 1 y 0,994, respectivamente. El modelo OPLS-DA fue validado internamente por CV-ANOVA ($p < 0,05$).

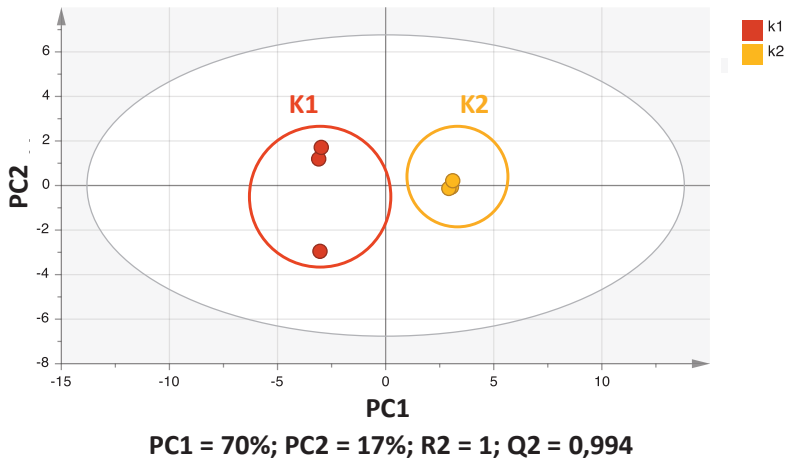


Figura 2. OPLS-DA (K1: variedad “Chilliwa”; K2: variedad “Ramis”).

Del OPLS-DA para dos categorías se puede realizar un análisis S-Plot. En la figura 3 se muestra el diagrama S-Plot realizado en base al análisis OPLS-DA. En el diagrama S-plot, los puntos agrupados en el centro representan las variables correlacionadas (metabolitos o señales cercanas a la línea base del cromatograma, p [corr]), mientras que los puntos extremos representan las variables con máxima covarianza (loadings, $p[1]$) que influyen en el modelo discriminante OPLS-DA (al extremo derecho los posibles biomarcadores de la kañiwa roja “Ramis”; mientras que al extremo izquierdo los posibles biomarcadores de la kañiwa plomo claro “Chilliwa”). El S-Plot permitió entonces encontrar biomarcadores potenciales para la diferenciación de las dos variedades de kañiwa en estudio.

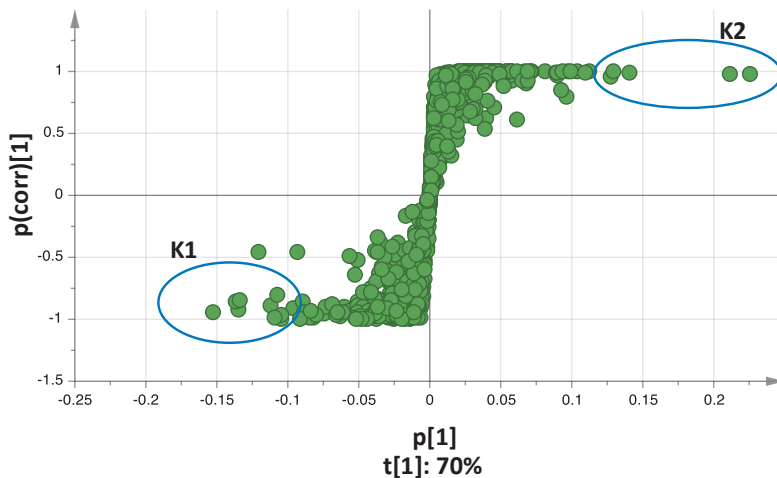


Figura 3. S-Plot del modelo OPLS-DA (K1: variedad “Chilliwa”; K2: variedad “Ramis”)

Del diagrama S-plot, se puede exportar la tabla de resultados de todos los puntos (tabla 1). La tabla 1 muestra algunos de los potenciales biomarcadores encontrados para ambas variedades de kañiwa. El rango de pesos de dichos biomarcadores varía de 153 hasta 885 uma. Cinco de estos metabolitos tienen un tiempo de retención alrededor del minuto 1, mientras que los demás se encuentran posteriores al minuto 10.

Tabla 1. Biomarcadores potenciales para la diferenciación entre las variedades “Chilliwa” (K1) y “Ramis” (K2)

Biomarcador químico	Modo de Ionización	Peso molecular	t _R (min)	K1	K2
N-acetil triptófano	Negativo	245,091	11,14		✓
Delfinidina- <i>O</i> -(6"- <i>O</i> - α -ramnopiranosil- β -glucopiranosido)	Negativo	609,144	10,80		✓
2',5'-Dihidroxi flavona 5'-acetato	Negativo	295,059	12,83		✓
<i>N-trans</i> -sinapoiltiramina	Negativo	342,133	11,94		✓
Isoramnetina-3- <i>O</i> -Glucósido	Negativo	755,201	10,45		✓
Ácido glucónico	Negativo	195,049	1,15		✓
Ácido 3-indolacetil aspártico	Positivo	291,096	11,14		✓
Annularin H	Positivo	413,143	10,97		✓
Kaempferol 4'-metil éter 3-(2Glc-glucosilrutinosido)	Negativo	769,216	10,68		✓
Isoramnetina-3- <i>O</i> -rutinosido	Negativo	623,159	11,00		✓
Crustecdisona	Negativo	525,304	10,81	✓	
Ácido vernólico	Negativo	295,226	14,15	✓	
Makisterona B	Negativo	539,320	11,02	✓	
Ácido pinélico	Negativo	329,232	12,23	✓	
2',6,7-Trihidroxiisoflavona	Negativo	283,066	1,62	✓	
Ácido floionólico	Negativo	331,247	12,19	✓	
Xantosina	Negativo	283,066	1,22	✓	
Genkwadaphnin-20-palmitato	Negativo	885,444	11,43	✓	

Dentro de los biomarcadores identificados solo en la variedad Chilliwa está el compuesto crustecdisona, una fitoecdisona aislada previamente de las semillas de kaladana (*Convolvulaceae*)¹². Otros compuestos presentes solo en la variedad Chilliwa y que están ausentes en la variedad Ramis son: ácido vernólico, makisterona B, ácido pinélico, 2',6,7-trihidroxiisoflavona, ácido floionólico, xantosina y genkwadaphnin-20-palmitato (tabla 1). Ninguno de estos compuestos ha sido encontrado previamente en Kañiwa. Por ejemplo, el ácido vernólico es un ácido graso epoxigenado que se ha reportado en semillas de *Vernonia galamensis*¹³. El ácido pinélico, un metabolito derivado del ácido linoleico, ha sido aislado de la especie *Salsola tetrandra*, un arbusto de la familia *Chenopodiaceae*¹⁴. Genkwadaphnin-20-palmitato es un diterpeno obtenido de extractos de *Daphne oleoides*¹⁵.

Para la variedad Ramis se pudieron identificar 10 biomarcadores: N-acetil triptófano, delfinidina-*O*-(6"-*O*- α -ramnopiranosil- β -glucopiranosido), 2',5'-dihidroxi flavona 5'-acetato, *N-trans*-sinapoiltiramina, isoramnetina-3-*O*-Glucósido, ácido glucónico, ácido 3-indolacetil aspártico, annularin H, kaempferol 4'-metil éter 3-(2Glc-glucosilrutinosido) e isoramnetina-3-*O*-rutinosido (tabla 1). Ninguno de estos compuestos ha sido reportado previamente para la kañiwa. Por ejemplo, *N-trans*-sinapoiltiramina ha sido aislada de las especies *Piper boechmeriaefolium*¹⁶. Annularin H es un policétido presente en el hongo *Annulatascus*

*triseptatus*¹⁷. La antocianina delfinidina-O-(6"-O- α -ramnopiranosil- β -glucopiranosido) puede encontrarse en las flores de los tulipanes¹⁸. Esta antocianina explicaría el color rojo de la kañiwa roja Ramis, metabolito no presente en la kañiwa plomo claro Chilliwa, por lo que se puede considerar como un importante biomarcador para diferenciar las dos variedades de kañiwa estudiadas. Los metabolitos N-Acetiltriptófano (presente solamente en la variedad Ramis) y la Crustecdisona (presente solamente en la variedad Chilliwa) son los que se encuentran más separados entre sí en el gráfico S-Plot, lo cual significa que son los metabolitos que mejor discriminan a ambas variedades.

Cabe resaltar que los resultados obtenidos se limitan a las muestras de las variedades de kañiwa utilizadas en el presente estudio. Para corroborar la reproducibilidad de los biomarcadores propuestos, es necesario realizar estudios metabolómicos non-targeted en las mismas variedades de kañiwa, pero de diferentes zonas de cultivo, colectados en diferentes épocas del año para ver si estas variables influyen en la expresión de los biomarcadores. En el presente estudio, la identificación de los biomarcadores fue solo de tipo putativa, no absoluta. Para la identificación certera de los biomarcadores siempre es necesario contar con los estándares analíticos, los cuales mayormente no se encuentran disponibles de manera comercial. En aquellos casos en los que no se pueda acceder a los estándares analíticos, se hace necesario aislar los compuestos de su fuente natural para luego realizar su identificación por medio de estudios de resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas de alta resolución.

CONCLUSIONES

Se obtuvieron los perfiles metabolómicos de las variedades de kañiwa plomo claro "Chilliwa" y kañiwa roja "Ramis" mediante el análisis UHPLC-HRMS. Existe diferencia entre los metabolomas de la kañiwa plomo clara "Chilliwa" y kañiwa roja "Ramis", lo cual ha sido comprobado por el PCA y el OPLS-DA. Mediante el S-plot se logró encontrar 18 biomarcadores: Crustecdisona, ácido vernólico, makisterona B, ácido pinélico, 2',6,7-trihidroxiisoflavona, ácido floionólico, xantosina y Genkwadaphnin-20-palmitato correspondientes a la kañiwa plomo clara "Chilliwa"; N-acetiltriptófano, delfinidina-O-(6"-O- α -ramnopiranosil- β -glucopiranosido), 2',5'-dihydroxiiflavona 5'-acetato, N-trans-sinapoyltiramina, isoramnetina-3-O-Glucósido, ácido glucónico, ácido 3-indolacetil aspártico, annularin H, kaempferol 4'-metil éter 3-(2Glc-glucosilrutinosido) e isoramnetina-3-O-rutinosido correspondientes a la kañiwa roja "Ramis". Los metabolitos fueron identificados en base a su similaridad de espectros de Masa MS/MS o MS2 con valores de scores o puntajes >0,7, por lo que son identificaciones putativas o hipótesis de identificación. En ese sentido, se necesitarían de compuestos estándares para elevar el nivel de certidumbre de estas identificaciones, los cuales frecuentemente son difíciles de tener a disposición.

AGRADECIMIENTOS

A FONDECYT-CONCYTEC por el financiamiento otorgado bajo el marco del convenio 134-2015-FONDECYT. Al PhD Guillaume Marti de la Universidad de Toulouse-Francia por su asesoría en el uso del software SIMCA P 15 y la base de datos del Diccionario de Productos Naturales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. National Research Council. Lost Crops of the Incas: Little-Known Plants of the Andes with Promise for Worldwide Cultivation. [Internet]. Washington, DC.: National Academies Press; 1989. [Recuperado el 24 enero 2020]. Disponible en: <https://www.nap.edu/catalog/1398/lost-crops-of-the-incas-little-known-plants-of-the>
2. Betalleluz-Pallardel I, Inga M, Mera L, Pedreschi R, Campos D, Chirinos R. Optimisation of extraction conditions and thermal properties of protein from the Andean pseudocereal cañihua (*Chenopodium pallidicaule* Aellen). *Int J Food Sci.* 2017; 52(4): 1026-1034.
3. Tapia ME, Bonifacio A, Rojas W. La Kañiwa o Kañawa (*Chenopodium pallidicaule* Aellen) grano promisorio de los Andes altos. [Internet]. [Recuperado el 25 de enero del 2020]. Disponible en: <http://www.indap.gob.cl/docs/default-source/vii-congreso-quinua/ejes-tematicos/recursos-geneticos/ka%C3%Blawa---grano-promisorio-de-los-andes-altos-per%C3%BA-y-bolivia.pdf>
4. Mamani E. Caracterización molecular de 26 accesiones de cañihua (*Chenopodium pallidicaule* Aellen) con mayor rendimiento en grano: altiplano-Puno. [Tesis doctoral]. Puno: Universidad Nacional del Altiplano; 2013.
5. Mussap M, Zaffanello M, Fanos V. Metabolomics: a challenge for detecting and monitoring inborn errors of metabolism. *Biochim Clin.* 2019; 43(1):14-23.
6. Wang Y, Wang C, Lin H, Liu Y, Li Y, Zhao Y, *et al.* Discovery of the potential biomarkers for discrimination between *Hedyotis diffusa* and *Hedyotis corymbosa* by UPLC-QTOF/MS metabolome analysis. *Molecules.* 2018; 23: 1525.
7. Luo Y, Zeng W, Huang K-E, Li D-X, Chen W, Yu X-Q, *et al.* Discrimination of *Citrus reticulata* Blanco and *Citrus reticulata* ‘Chachi’ as well as the *Citrus reticulata* ‘Chachi’ within different storage years using ultra high performance liquid chromatography quadrupole/time-of-flight mass spectrometry based metabolomics approach. *J Pharm Biomed Anal.* 2019; 171: 218-231.
8. Reifycs Abf (Analysis Base File) Download.[Internet]. [Recuperado el 21 marzo 2020]. Disponible en: <https://www.reifycs.com/AbfConverter/>
9. Lai Z, Tsugawa H, Wohlgemuth G, Mehta S, Mueller M, Zheng Y, *et al.* Identifying metabolites by integrating metabolome databases with mass spectrometry cheminformatics. *Nat Methods.* 2018; 15(1): 53-56.
10. Calderón-Santiago M, Fernández-Peralbo MA, Priego-Capote F, Luque de Castro MD. MSCombine: a tool for merging untargeted metabolomic data from high-resolution mass spectrometry in the positive and negative ionization modes. *Metabolomics.* 2016; 12: 43. doi: 10.1007/s11306-016-0970-4

11. Wheelock ÅM, Wheelock CE. Trials and tribulations of ‘omics data analysis: assessing quality of SIMCA-based multivariate models using examples from pulmonary medicine. *Mol Biosyst.* 2013; 9(11): 2589-2596.
12. Canonica L, Danieli B, Ferrari G, Krepinisky J, Weisz-Vincze I. A novel method of isolation of phytoecdysones from kaladana seeds. *Phytochem.* 1975; 14(2): 525-527.
13. Fiseha A, Tadesse M, Bekele T, Bedemo B. Phytochemical investigation of *Vernonia galamensis* seeds. *Chem Nat Comp.* 2010; 46(5): 692-695.
14. Oueslati MH, Jannet HB, Mighri Z, Chriaa J, Abreu PM. Phytochemical constituents from *Salsola tetrandra*. *J Nat Prod.* 2006; 69(9):1366–1369.
15. Riaz M, Saleem A, Siddique S, Khan BA, Nur-e-Alam M, Shahzad-ul-Hussan S, *et al.* Phytochemistry of *Daphne oleoides*. *Nat Prod Res.* 2016; 30(8): 880-97.
16. Tang G-H, Chen D-M, Qiu B-Y, Sheng L, Wang Y-H, Hu G-W, *et al.* Cytotoxic Amide Alkaloids from *Piper boehmeriaefolium*. *J Nat Prod.* 2011; 74(1): 45-49.
17. Li C, Nitka MV, Gloer JB, Campbell J, Shearer CA. Annularins A-H: New polyketide metabolites from the freshwater aquatic fungus *Annulatascus triseptatus*. *J Nat Prod.* 2003; 66(10): 1302-1306.
18. Torskangerpoll K, Nørbæk R, Nodland E, Øvstedal DO, Andersen ØM. Anthocyanin content of *Tulipa* species and cultivars and its impact on tepal colours. *Biochem System Ecol.* 2005; 33(5): 499-510.