

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA  
Facultad de Ciencias y Filosofía “Alberto Cazorla Talleri”



**USO DE LA METABOLÓMICA PARA LA  
DISCRIMINACIÓN PRELIMINAR DE LAS VARIEDADES  
“CHILLIWA” Y “RAMIS” DE LAS SEMILLAS DE  
KAÑIWA (*Chenopodium pallidicaule* AELLEN)**

**Carlos Adrián Rios Lovón**

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE QUÍMICO FARMACÉUTICO

Lima-Perú

2019

**ASESORA**

Ph. D. Rosario Elena Rojas Durán

## **AGRADECIMIENTOS**

A CIENCIACTIVA-CONCYTEC por el financiamiento otorgado para el desarrollo del presente trabajo de tesis, bajo el marco del convenio 134-2015-FONDECYT (Círculo de Investigación en Biodiversidad y Gastronomía).

Al Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad (Innovate Perú) por el financiamiento del proyecto "Espectrómetro de Masas Híbrido Cuadrupolar-Orbitrap para impulsar la investigación básica y aplicada en Productos Naturales, Alimentos, Fármacos, Plaguicidas, Metabolómica y Proteómica" (Contrato 283-Innovate Perú-EC-2017) que permitió la compra, instalación y puesta en marcha del Espectrómetro de Masas Q-Orbitrap por medio del cual se realizaron los estudios metabolómicos.

A la Dra. Rosario Rojas, más que una asesora, una mentora única, cuyo apoyo, valores, consejos, conocimientos y enseñanzas se reflejaron desde el inicio hasta la conclusión del presente trabajo.

A M. Sc. Fabio Espichán, por su constante apoyo, dedicación y esfuerzo durante el desarrollo del presente trabajo.

A M. Sc. Candy Ruiz, por su amable ayuda en la realización de distintos ensayos de la presente investigación.

A mis padres, por siempre confiar y creer en mí.

<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1. Kañiwa .....	3
1.1.1. Taxonomía.....	3
1.1.2. Distribución .....	3
1.1.3. Descripción Botánica.....	3
1.1.4. Composición Nutricional.....	4
1.1.5. Usos.....	5
1.1.6. Enfermedades y Limitaciones.....	5
1.2. Metabolómica.....	5
1.2.1. Enfoques.....	6
1.2.2. Principales herramientas en metabolómica .....	7
1.2.2.1. Cromatografía Líquida.....	7
1.2.2.1.1. Cromatografía de Fase Normal .....	8
1.2.2.1.2. Cromatografía en Fase Reversa.....	9
1.2.2.2. Espectrometría de Masas .....	9
1.2.2.2.1. Fuente de iones .....	10
1.2.2.2.2. Analizador de Masas .....	11
1.2.2.2.3. Sistemas de detección de iones .....	13
1.2.2.2.4. El espectro de masas .....	13
1.3. Análisis Multivariado .....	13
1.3.1. Análisis de Componentes Principales .....	14
1.3.2. Análisis discriminante de proyecciones ortogonales a estructuras latentes .....	15
1.3.3. R2 y Q2 .....	15
1.3.4. S-Plot.....	15
1.3.5. Selección del Método .....	16
1.4. Programas en metabolómica.....	16
1.4.1. MS-DIAL .....	16
1.4.1.1. Pretratamientos .....	17
1.4.1.1.1. Deconvolución .....	17
1.4.1.1.2. Alineación.....	17
1.4.1.1.3. Normalización.....	17
1.4.2. MS-FINDER .....	18

1.4.3. SIMCA.....	18
1.5. Bases de datos .....	19
1.5.1. METLIN.....	19
1.5.2. Human Metabolome Data Base .....	19
1.5.3. NIST 14.....	20
1.5.4. Diccionario de Productos Naturales .....	20
1.6. Identificación y Validación de Metabolitos .....	21
<b>II. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN Y OBJETIVOS .....</b>	<b>22</b>
2.1. Pregunta de Investigación.....	22
2.2. Objetivos .....	22
2.2.1. General .....	22
2.2.2. Específicos .....	22
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>23</b>
3.1. Materiales.....	23
3.2. Obtención de la muestra .....	23
3.3. Preparación de las muestras.....	23
3.4. Condiciones de la cromatografía .....	24
3.5. Análisis de datos .....	25
<b>IV. RESULTADOS .....</b>	<b>26</b>
<b>V. DISCUSIÓN .....</b>	<b>34</b>
<b>VI. CONCLUSIONES .....</b>	<b>39</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>40</b>
<b>VIII. ANEXOS .....</b>	<b>49</b>

## ABREVIATURAS

**m.s.n.m:** metros sobre el nivel del mar

**mg:** miligramo

**g:** gramo

**UHPLC:** Cromatografía líquida de ultra alto rendimiento

**HRMS:** Espectrometría de masas de alta resolución

**QTOF:** Cuadrupolo de Tiempo de vuelo

**TOF:** Tiempo de vuelo

**NMR:** Resonancia magnética nuclear

**NIR:** Espectroscopía del infrarrojo cercano

**PCA:** Análisis de componentes principales

**OPLS-DA:** Análisis discriminante de proyecciones ortogonales a estructuras latentes

**%:** Porcentaje

**MOhm-cm:** MegaOhmio por centímetro

**rpm:** Revoluciones por minuto

**EIC:** Cromatograma de ion extraído

**TIC:** Cromatograma de iones totales

**ESI:** Ionización por electrospray

**μL:** Microlitro

**°C:** Grados Celsius

**QC:** Control de calidad

**uma:** Unidad de Masa atómica

**Glc:** Glucosa

**SIMCA:** “Soft Independent Modeling of Class Analogy”

## RESUMEN

La kañiwa (*Chenopodium pallidicaule* Aellen, Chenopodiaceae), un pseudocereal que crece en los altiplanos de Perú y Bolivia, cuenta con una gran biodiversidad. Gran parte de sus variedades han sido caracterizadas por medio de herramientas taxonómicas y/o agronómicas; sin embargo, aún no existe una herramienta definitiva para su diferenciación debido a las similitudes que pueden haber entre distintas variedades.

En la actualidad, las investigaciones en base a las “ómicas” han influenciado de forma importante en la comprensión de diversos sistemas biológicos. La metabolómica, una de las “ómicas”, se caracteriza por ser la más cercana al fenotipo.

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo emplear la metabolómica no dirigida (“non targeted”) como herramienta para la discriminación de dos variedades de kañiwa (plomo clara “Chilliwa” y roja “Ramis”). Ambas variedades fueron sometidas a un proceso de extracción, luego se analizaron por medio de UHPLC-HRMS y la información obtenida fue evaluada con los programas MS-DIAL, MS-FINDER, SIMCA para determinar las diferencias entre los perfiles metabolómicos.

Se logró identificar nueve biomarcadores potenciales para la kañiwa plomo clara “Chilliwa”: Crustecdisona, ácido vernólico, makisterona B, ácido pinélico, 2',6,7-trihidroxiisoflavona, ácido floionólico, oxipurinol, xantosina, genkwadaphnin-20-palmitato. En el caso de la kañiwa roja “Ramis”, los diez biomarcadores potenciales encontrados fueron: N-acetilriptófano, delfinidina-o-(6"-O-alfa-ramnopiranosil-beta-glucopiranosida), 2',5'-dihydroxiflavona 5'-acetato, n-trans-sinapoitiramina, isoramnetina-3-glucósido, gluconato, ácido L-N-(1H-Indol-3il acetil) aspártico, annularin H, kaempferol 4'-metil éter 3-(2Glc- glucosilrutinosida), isoramnetina-3-O-rutinosida.

El uso de la metabolómica no dirigida permitió postular biomarcadores potenciales para la diferenciación entre 2 variedades de kañiwa. Se sugiere validar estos biomarcadores en experimentos metabolómicos de tipo dirigido (“targeted”).

Palabras clave: Kañiwa, Metabolómica, Variedades, Discriminación

## ABSTRACT

Kañiwa (*Chenopodium pallidicaule* Aellen, Chenopodiaceae), a pseudocereal that grows in the highlands of Peru and Bolivia, has a great biodiversity. Many of their varieties have been characterized by taxonomic and/or agronomic tools; however, there is no definitive classification for their differentiation due to the similarities that may exist between different varieties.

Currently, research based on "omics" has influenced significantly in the understanding of various biological systems. Metabolomics, one of the "omics", is characterized by being the closest to the phenotype.

The present pilot research work used metabolomics as a tool for the discrimination of two varieties of kañiwa (light grey "Chilliwa" and red "Ramis"). Both varieties were subjected to an extraction process, analyzed by UHPLC-HRMS and the information obtained was evaluated with softwares such as MS-DIAL, MS-FINDER, SIMCA to determine the differences between the metabolomic profiles.

We identified nine potential biomarkers for the light grey kañiwa "Chilliwa": Crustecdysol, vernolic acid, makisterone B, pinellic acid, 2',6,7-trihydroxyisoflavone, floionolic acid, oxypurinol, xanthosine, genkwadaphnin-20-palmitate. As well as ten potential biomarkers for the red kañiwa "Ramis": N-acetyltryptophan, delphinidin-o-(6"-O-alpha-rhamnopyranosyl-beta-glucopyranoside), 2', 5'-dihydroxyflavone 5'-acetate, n-*trans*-sinapoyltyramine, isorhamnetin-3-glucoside, gluconate, L-N-(1H-indol-3-ylacetyl)aspartic acid, annularin H, kaempferol 4' - methyl ether 3-(2Glc-glucosylrutinoside), isorhamnetin-3-o-rutinoside.

Non-directed metabolomics was useful for the determination of potential biomarkers of two varieties of kañiwa. These potential biomarkers should be further validated in targeted metabolomic experiments.

Keywords: Kañiwa, Metabolomics, Varieties, Discrimination

## I. INTRODUCCIÓN

La “kañiwa” (*Chenopodium pallidicaule* Aellen, Chenopodiaceae) es una planta herbácea anual cuyo grano se considera muy nutritivo. Su origen se establece a más de 4000 m.s.n.m. en los altiplanos de Perú y Bolivia. Es también conocida como “qañawa” y, a diferencia del trigo, el centeno o el maíz, crece de forma notable en ambientes extremos donde la temperatura promedio anual es menor a 10 °C y en los cuales se producen heladas durante al menos nueve meses al año. Así, debido a su resistencia al frío extremo, alto contenido proteico y a la facilidad con que es cultivada, la kañiwa es considerada para la seguridad alimentaria cuando todos los otros cultivos fracasan (1,2). El Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) mantiene la Estación Experimental zonal “Illpa” en la región de Puno (EE Illpa), la cual cuenta con un banco de germoplasma de 430 accesiones de kañiwa, 41% de ellas provienen de la provincia de Melgar, el 21% de la provincia de Puno, el 13% de San Antonio de Putina, el 10% de la provincia de Lampa y el 6% de la provincia de Huancané. A pesar de ello, la EE Illpa considera necesario realizar más colectas de material genético para obtener genotipos con valor agronómico y fuente de germoplasma. Además, ha notado que en gran parte de las comunidades campesinas del Altiplano existe una vasta diversidad de ecotipos, también llamados variedades tradicionales, nativas o locales, de kañiwa con gran variabilidad interna (3).

En base a características taxonómicas y agronómicas, se ha logrado describir algunas variedades de kañiwa, por ejemplo: Puca, color rojo; Chilliwa, color rosado; Condorsaya, color gris; entre otras. Además, la EE Illpa ha obtenido las variedades Ramis, Cupi y Lasta por medio de métodos de mejoramiento (4).

De acuerdo al INIA, en las colecciones de ecotipos se ha encontrado que un mismo ecotipo puede recibir distintos nombres en lugares diferentes (3). Así, las características morfológicas con uso de herramientas taxonómicas o agronómicas no han sido suficientes para la discriminación entre variedades semejantes.

En la actualidad, el desarrollo de las tecnologías aplicadas a ciencias biológicas, como por ejemplo investigaciones en base a las “ómicas” tales como la genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica, ha influenciado de forma importante en la comprensión de diversos sistemas biológicos (5). La metabolómica representa la etapa final de la “cascada ómica” y se encuentra próxima al fenotipo. Sus contribuciones van

desde investigaciones sobre biomarcadores en el diagnóstico de cáncer de mama (6), el descubrimiento de nuevos antibióticos (7) o incluso el comprobar la autenticidad de diversos alimentos (8). Estos y otros estudios han sido posibles debido a que el metaboloma está caracterizado por una amplia gama de compuestos tales como lípidos, nucleótidos, aminoácidos, entre otros; cuyas propiedades físicas, químicas, así como sus concentraciones, son diferentes (9).

En metabolómica se utilizan dos enfoques denominados: Metabolómica no dirigida (“non-targeted” o “untargeted”), el cual realiza un análisis exhaustivo de todos los analitos medibles en una muestra; Metabolómica dirigida (“targeted”), que mide grupos definidos de metabolitos caracterizados química y bioquímicamente (10).

El uso de la metabolómica “non-targeted” en asociación con las herramientas de análisis multivariado ha permitido la discriminación entre variedades de diversos productos naturales. Por ejemplo, Li *et al.* lograron discriminar la corteza de “Moutan” (*Paeonia suffruticosa*) de sus productos procesados (11); Martínez *et al.* consiguieron identificar marcadores para discriminar entre cosechas orgánicas y cosechas convencionales de tomate (12). Por otro lado, Catchpole *et al.* demostraron que cultivares tradicionales de papa y cultivares genéticamente modificados son sustancialmente equivalentes (13).

La mayoría de variedades o ecotipos de kañiwa han sido caracterizadas por medio de propiedades botánicas y/o agronómicas; sin embargo, ecotipos muy semejantes no pueden ser distinguidos muy fácilmente. El presente trabajo de investigación, de tipo piloto (exploratorio), tiene como objetivo utilizar la metabolómica de tipo no dirigida para poder identificar las diferencias de dos variedades de kañiwa comerciales: kañiwa plomo clara (“Chilliwa”) y kañiwa roja (“Ramis”) procedentes del departamento de Puno.

Dada la vasta biodiversidad de la kañiwa, resulta importante su caracterización y clasificación. Los resultados obtenidos podrían ser importantes para la discriminación, selección y estudio de mejoramiento de variedades de kañiwa.

## 1.1. Kañiwa

### 1.1.1. Taxonomía

De acuerdo a la base de datos del Sistema Integrado de Información Taxonómica (ITIS), la jerarquía taxonómica de la kañiwa se divide de la siguiente manera (14).

- Reino: Plantae
- Subreino: Viridiplantae
- División: Tracheophyta
- Subdivisión: Spermatophytina
- Clase: Magnoliopsida
- Superorden: Caryophyllanae
- Orden: Caryophyllales
- Familia: Amaranthaceae
- Género: *Chenopodium*
- Especie: *Chenopodium pallidicaule* Aellen – cañihua

### 1.1.2. Distribución

El origen de la kañiwa radica en las zonas próximas al Lago Titicaca, de forma específica, entre Perú y Bolivia (con niveles de altitud entre 3000 a 4200 m.s.n.m.). En Bolivia el área de producción ocupa pequeñas parcelas cerca al Lago Titicaca, en el departamento de La Paz, el departamento de Oruro y las provincias Bolívar y Tapacari. En Perú la kañiwa se cultiva en los departamentos de Puno, Cusco y Arequipa, abarcando un área de producción de seis mil hectáreas por año (15).

### 1.1.3. Descripción Botánica

Erguida o ligeramente postrada, la kañiwa puede medir entre veinte a setenta centímetros de alto. Sus hojas alternadas tienen pecíolos delgados y cortos, con láminas gruesas en forma de rombo y tres nervaduras características en la

zona inferior, las cuales se juntan luego de la inserción del pecíolo. Además, presenta inflorescencias pequeñas de tipo axilar o tipo terminal. Los tallos, en su sección superior, así como las hojas y las inflorescencias se encuentran recubiertas por vesículas blancas o rosa pálido (2).

Sus granos tienen forma cónica, subcilíndrica, subcónica, sublenticular y subelipsoidal de 1.0 a 1.2 mm de diámetro y cuyo embrión, generalmente, se manifiesta curvado y periforme. El epispermo, bastante fino y puntiagudo, puede ser de color negro, castaño o castaño claro. Por otro lado, el fruto se cubre por el perigonio de un tono gris con pericarpio pequeño y translúcido (3).

#### 1.1.4. Composición Nutricional

Según el estudio realizado por Repo-Carrasco, *et al.* (16) en semillas de kañiwa de cuatro variedades y una muestra comercial, estas contienen alrededor de 15% de proteínas, 6.5% de lípidos, 7.9% de fibra, 3.3% de cenizas y 58.4% de carbohidratos.

Ligarda Samanez, *et al.* (17) encontraron entre 18.7 - 21.9% de fibra dietaria total en tres diferentes variedades de kañiwa, donde la fibra insoluble corresponde a la mayor parte.

Las fracciones lipídicas de la kañiwa contienen 72.9% de ácidos grasos insaturados, destacando el ácido linolénico (Omega 3) con 42.6% y ácido oleico (Omega 9) con un rango de 45 - 65%. Las semillas de kañiwa también contienen 788.4 partes por millón (ppm) de gamma tocoferol y 726 ppm de alfa tocoferol (18).

Asimismo, Repo-Carrasco, *et al.* (16) reportan la presencia de distintos ácidos fenólicos como el ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico, ácido *p*-hidroxibenzoico y ácido vainílico; así como de distintos flavonoides como miricetina, quercetina, kaempferol, isoramnetina y ramnetina.

### 1.1.5. Usos

Existen distintas formas en que la kañiwa es utilizada para su consumo. Algunos ejemplos son: i) Kañiwaco, harina de granos tostados de kañiwa; ii) Harina de kañiwa cruda; iii) Hojuelas de kañiwa, granos de kañiwa que pasaron procesos de laminado o comprensión; iv) Refrescos a base de harina precocida de kañiwa; v) Barras energéticas, mezcla de quinua, kañiwa, amaranto y miel insuflados; entre otros (3).

Los granos de kañiwa tostados pueden emplearse para controlar los síntomas de disentería en infecciones por amebas en niños. Asimismo, se recomienda su consumo para pacientes anémicos, sobre todo durante el embarazo o la lactancia, diabetes y enfermedad de altura (19).

### 1.1.6. Enfermedades y Limitaciones

La kañiwa es resistente a distintas enfermedades debido al ambiente donde se desarrolla; sin embargo, si es retirada de su hábitat, puede padecer de ciertas pestes y enfermedades, algunas semejantes a las encontradas en plantas como quinua. Además, dentro de sus principales limitaciones resalta que tiene que ser cosechada en varias ocasiones y el preparado de las semillas resulta un proceso laborioso (3).

Son escasos los estudios sobre la kañiwa, más aún son limitadas las investigaciones en referencia a los metabolitos de este pseudocereal. Es así que resulta esencial la implementación de herramientas que permitan abordar de forma integral los perfiles de metabolitos de la kañiwa. Siendo la metabolómica una adecuada alternativa.

## 1.2. Metabolómica

La metabolómica es considerada una disciplina cuyo objetivo es analizar la totalidad de los metabolitos —moléculas orgánicas implicadas en el metabolismo que pueden variar como consecuencia de perturbaciones fisiopatológicas, condiciones ambientales, entre otros— en sistemas biológicos de una manera

holística, integral y dinámica. La información obtenida es la más cercana al fenotipo y, por tanto, establece una mejor comprensión del funcionamiento de diversos sistemas biológicos (21, 22).

### 1.2.1. Enfoques

Como se mencionó en párrafos anteriores, son dos los principales enfoques que se pueden seguir en metabolómica.

#### 1.2.1.1. Metabolómica dirigida

La metabolómica dirigida o “targeted” desarrolla métodos analíticos cuantitativos para grupos de compuestos o para metabolitos implicados en una vía conocida. Como consecuencia se genera información independiente cuya interpretación se puede realizar en base a rutas bioquímicas o interacciones fisiológicas. Asimismo, este tipo de análisis puede emplearse para obtener concentraciones exactas de metabolitos previamente identificados por metabolómica no dirigida, con lo cual se proporciona su respectiva validación analítica (23).

#### 1.2.1.2. Metabolómica no dirigida

La metabolómica no dirigida o “non-targeted” se basa en comparar los patrones o “huellas dactilares” de metabolitos extraídos de una muestra y, como consecuencia, puede evidenciar perturbaciones no esperadas o innovadoras. Dentro de sus ventajas resalta el poder examinar la relación de distintos metabolitos interconectados que provienen de múltiples vías; sin embargo, aún no es posible obtener todas las clases de metabolitos al mismo tiempo, ya que existen factores que afectan la recuperación de estos y dependerá, en gran medida, de los propios grupos funcionales. Es así que la metabolómica “non-targeted”, en función de distintos parámetros como el pH, la naturaleza de la columna, la técnica de ionización, entre otros,

puede proporcionar una evaluación detallada de los metabolitos en una muestra y, finalmente, revelar una amplia gama de metabolitos (23).

### 1.2.2. Principales herramientas en metabolómica

Los enfoques mencionados (“targeted” y “non-targeted”) pueden llevarse a cabo, principalmente, mediante resonancia magnética nuclear (NMR), espectrometría de masas (MS), cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS), cromatografía líquida de alto rendimiento acoplada a espectrometría de masas-masas (HPLC-MS/MS), cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). La técnica utilizada dependerá, principalmente, de la complejidad de la muestra. MS proporciona una mejor sensibilidad y selectividad en comparación a NMR, por lo cual es ideal para la detección de metabolitos secundarios de bajas concentraciones; sin embargo, NMR es un método no destructivo, no invasivo y con alta reproducibilidad. Por otro lado, MS cuenta con diferentes técnicas de ionización, lo que conlleva a un posible incremento del número de metabolitos que pueden detectarse. Otros métodos como, por ejemplo, la espectroscopía del infrarrojo cercano (NIR) también puede ser utilizado. NIR, a pesar de no ser tan sensible como los métodos basados en MS, es robusta, reproducible, no destructiva, portátil, asequible y rápida (24,25).

#### 1.2.2.1. Cromatografía Líquida

La cromatografía es definida como un método físico de separación, en donde los componentes a separar se distribuyen entre dos fases: una de ellas denominada estacionaria (fase estacionaria), mientras que la otra (la fase móvil) se mueve en una dirección definida (26).

La cromatografía líquida (LC), originalmente, inició con el uso de un adsorbente (sílice o alúmina) empaquetado en una columna. Una mezcla es introducida en la parte superior de la columna y es lavada a través de ella mediante un líquido eluyente. Si un componente de la mezcla es adsorbido

de forma débil en la superficie de la fase estacionaria sólida, este viajará por la columna más rápido a comparación de otro componente que se adsorba con mayor fuerza (27).

Por medio de mejoras en la tecnología de las columnas y los componentes instrumentales, se desarrolló la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). Este sistema se rige por cinco componentes principales: La bomba, distribuye la fase móvil a través del sistema; el inyector, coloca la muestra en la fase móvil; la columna, contiene la fase estacionaria; el detector, proporciona las señales eléctricas relacionadas a la composición del efluente de la columna; el sistema de datos, muestra el cromatograma (28).

La cromatografía líquida de ultra alto rendimiento (UHPLC) es un método derivado de HPLC. El principio que diferencia a UHPLC de HPLC radica en la disminución del tamaño de partícula para rellenar la columna, lo que concluye en un aumento significativo en la eficacia, la resolución y la eficiencia. Además, la velocidad de análisis y la capacidad máxima (número de picos resueltos por unidad de tiempo) alcanzarán mejores valores que los que se obtienen por HPLC (29).

#### 1.2.2.1.1. Cromatografía de Fase Normal

La cromatografía líquida de fase normal se basa en las diferencias que existen entre las interacciones polares de los analitos en una mezcla con respecto a la fase estacionaria. En ese sentido, mientras mayor sea la interacción entre la fase estacionaria y el analito, mayor será la retención de este último. Las fases móviles que normalmente se usan son solventes no polares (por ejemplo: cloroformo, benceno, etc.) con una pequeña cantidad de un aditivo polar (por ejemplo: etanol, isopropanol, etc.) para permitir un mejor control de la retención del analito en la columna. Por otro lado, los materiales de empaque que comúnmente se usan son óxidos porosos como sílica ( $\text{SiO}_2$ ) o alúmina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ). Asimismo, las superficies de las fases estacionarias están cubiertas de gran

cantidad de grupos hidroxilo, con lo cual las superficies se hacen más polares (30).

#### 1.2.2.1.2. Cromatografía en Fase Reversa

A diferencia de la cromatografía de fase normal, la cromatografía de fase reversa utiliza fuerzas de tipo hidrofóbicas o interacciones de Van der Waals. La polaridad de la fase estacionaria es hidrofóbica, mientras que la polaridad de la fase móvil es polar; lo contrario a la cromatografía de fase normal. Este tipo de cromatografía es de las más utilizadas debido a su eficacia, ya que puede discriminar entre compuestos que son bastante relacionados, así como la facilidad de variar la retención y la selectividad. Los adsorbentes empleados en este tipo de cromatografía son materiales rígidos porosos con superficies hidrofóbicas. Asimismo, los materiales de empaque, por lo general, son sílica porosa que ha sido químicamente modificada (30).

#### 1.2.2.2. Espectrometría de Masas

Es una técnica analítica con un amplio uso en distintos campos de las ciencias biológicas y médicas. Su alta sensibilidad (cantidades muy bajas pueden ser detectadas), su selectividad (compuestos con estructuras similares son distinguidos), las capacidades de identificación (confirmación de la presencia de compuestos conocidos y/o la determinación de compuestos nuevos) son las características principales que han promovido el uso de la MS (31).

Los equipos de MS miden la relación masa-carga ( $m/z$ ) de moléculas que se encuentran cargadas y en fase gaseosa. Luego de la resolución del estado de carga se puede determinar las masas moleculares implicadas en los análisis (32).

Al menos tres componentes característicos son los que conforman un espectrómetro de masas: una fuente de iones capaz de convertir las moléculas en iones; un analizador de masas, para su posterior separación por medio de campos electromagnéticos; un detector, para calcular la cantidad de cada ion presente (33).

#### 1.2.2.2.1. Fuente de iones

Su principal objetivo es ionizar y, en ciertos casos, vaporizar la muestra. Los tipos de fuente más utilizados en investigación son: la ionización por impacto electrónico, la ionización química, la ionización térmica, el sistema de ionización por electrospray (ESI). Las propiedades de la muestra, el grado de ionización y la fragmentación deseada son las consideraciones que se deben evaluar para la preferencia en el uso de un tipo de fuente con respecto a otra (34).

ESI, mediante energía eléctrica, ayuda a la transferencia de iones de la solución a la fase gaseosa antes de que sean sometidos al análisis por MS (35). El mecanismo por el cual trabaja ESI se puede describir en cuatro grandes pasos: La formación de cargas que transportan pequeñas gotas desde el efluente del LC, la contundente reducción del tamaño de las gotas por medio de procesos de evaporación continua de disolventes y escisiones repetidas de las pequeñas gotas, la liberación de iones desde micro gotas altamente cargadas a la fase gaseosa y, finalmente, el transporte de iones en fase gaseosa libre hacia el analizador de masas (36).

Además, existen dos modos de ionización: el modo positivo y el modo negativo. Su principal diferencia radica en cómo dispondrán los iones al formarse las gotas. En el modo positivo, los iones positivos abarcan de forma preponderante las gotas formadas, ya que el capilar, el cual transporta la muestra, se comporta como el electrodo positivo (ánodo); la placa de

apertura, como electrodo negativo (cátodo). Por otro lado, el modo negativo presenta la situación opuesta y, por tanto, los iones negativos abarcan predominantemente las gotas formadas (37).

#### 1.2.2.2.2. Analizador de Masas

Luego de que la muestra es ionizada, el haz de iones es enfocado y dirigido a un analizador de masas, el cual separará los iones en función de la relación  $m/z$ . Algunos de los analizadores de masas más comunes son: El sector magnético, la trampa de iones, el cuadrupolo, el tiempo de vuelo (TOF), los analizadores de transformada de Fourier, entre otros (38).

El cuadrupolo es uno de los analizadores de masa más utilizados por ser robusto, económico y pequeño. Este sistema consiste en un conjunto de cuatro varillas metálicas que se mantienen a la misma distancia en forma paralela, cada par de varillas opuestas se conectan eléctricamente. Es así que un campo eléctrico formado hace que los iones se desplacen hacia adelante en la dirección  $z$  con un movimiento oscilatorio en el plano  $x-y$ . La amplitud de la oscilación se relaciona de forma única con la relación  $m/z$  y es posible controlarla mediante los cambios aplicados en los voltajes. Por tanto, los voltajes pueden disponerse de tal forma que las amplitudes de oscilación para relaciones  $m/z$  deseables sean estables con los iones que se transportan a lo largo del eje  $z$ , sin necesidad de tocar las barras, y así alcanzar el detector. Por otro lado, las amplitudes de iones que no se deseen serán más grandes e inestables, con lo cual llegarán a encontrarse con las barras de metal, se neutralizarán y no podrán alcanzar el detector (35).

Otro analizador de masa bastante empleado es la trampa de iones, el cual consta de tres electrodos hiperbólicos: el electrodo de

anillo, el electrodo de tapa de entrada y el electrodo de tapa de salida. Los electrodos mencionados son capaces de formar una cavidad en la que se puede almacenar y analizar iones. Los electrodos de tapa cuentan con un pequeño orificio en sus centros por el cual viajan los iones, mientras que el electrodo de anillo se ubica en el medio de los dos electrodos de tapa. Una vez que los iones producidos desde la fuente ingresan a la trampa por medio del cuadrupolo y el electrodo de tapa de entrada, se aplican distintos voltajes para retener y expulsar iones en base a sus relaciones  $m/z$ . Bajo esa premisa, se produce un campo tridimensional dentro de la cavidad de atrapamiento. Así, los iones quedarán atrapados mientras oscilan de forma estable, donde la trayectoria dependerá del potencial de captura y de la relación  $m/z$  de cada ion. Finalmente, el potencial del sistema de electrodos es alterado para modificar las trayectorias de los iones y, como consecuencia, despedir los iones en orden creciente de su relación  $m/z$ , luego son enfocados por la lente de salida y detectados por el sistema de detección de iones (35). Dentro de este tipo de analizadores de masa se encuentra el “Orbitrap”, el cual está constituido por dos electrodos externos y un electrodo central, lo cual permite que trabaje como analizador y detector. Los iones ingresados al “Orbitrap” son capturados por medio de “compresión electrodinámica”, luego empiezan a oscilar alrededor del electrodo central y entre los dos electrodos externos. Así, distintos iones oscilan a diferentes frecuencias y, por tanto, empiezan a separarse. Cuando se miden las frecuencias de oscilación inducidas por los iones en los electrodos externos, se adquieren los espectros de masas mediante la detección de la corriente de imagen (39).

#### 1.2.2.2.3. Sistemas de detección de iones

En un inicio, los espectrómetros de masas usaban placas fotolíticas como detectores; sin embargo, estas han sido reemplazadas por detectores electrónicos. De esta manera, los detectores más utilizados son el multiplicador de electrones y la placa de microcanal. Ambos se rigen bajo el mismo principio, en donde los iones golpean una placa de metal y, como consecuencia, generan una cascada de emisiones de electrones, la cual es medible (34).

#### 1.2.2.2.4. El espectro de masas

El espectro de masas es una forma gráfica para visualizar la cantidad relativa de señales de iones en comparación a las relaciones  $m/z$ . Es bastante frecuente que la señal más alta se considere como el 100% de abundancia, mientras que las demás señales se expresan como una fracción o porcentaje de esta. En algunos casos, como en la fragmentación de iones moleculares protonados o desprotonados obtenidos por ESI, los espectros de masas son relativamente sencillos; sin embargo, el espectro podría complicarse, por ejemplo, en la protonación de múltiples proteínas y/o péptidos producidos por ESI (35).

Los resultados obtenidos por cualquiera de las técnicas mencionadas, tales como resonancia magnética nuclear o cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, son estudiados utilizando diferentes herramientas estadísticas de análisis multivariado.

### 1.3. Análisis Multivariado

Los datos multivariados representan observaciones realizadas a distintas variables diferentes para cierta cantidad de individuos u objetos. Este tipo de datos se evalúan en todas las ramas científicas y los métodos de análisis correspondientes

establecen un área de estadística cada vez más relevante. Existe una amplia variedad de técnicas para el análisis multivariado, según el tipo de datos, el tipo de problema y los objetivos, se elegirá la técnica más adecuada. Sin embargo, el objetivo principal que persiguen es el mismo: Simplificar un gran conjunto de datos por medio de relativamente pocos parámetros (40).

### 1.3.1. Análisis de Componentes Principales

El análisis de componentes principales (PCA) es considerado una herramienta estadística donde un gran grupo de variables es convertido en un conjunto de nuevas variables de menor dimensión, las cual se denominan componentes principales. Como en cualquier conjunto de datos, es posible que la información importante se encuentre en algunas fuentes dominantes de variabilidad, mientras que otras fuentes (ejemplo: ruido durante las mediciones) no aportan información de carácter relevante. La naturaleza multidimensional es una característica de diversos sistemas y, solo en raras ocasiones, toda la información latente que exista en un conjunto de datos se encontrará contenida en una sola medición; en contraposición, esa información, en la mayoría de casos, tendrá contribuciones de distintas mediciones. Así, el objetivo del PCA es reflejar esta información latente contenida en el conjunto de datos mediante un número menor de variables y, de esta manera, cada una de estas nuevas variables llamadas componentes principales será una combinación lineal de las variables originales. El primer componente principal extraído capturará la mayor cantidad de variabilidad en el conjunto de datos y cada componente posterior que se obtenga capturará la mayor cantidad de varianza residual. De esta manera se descarta la variación irrelevante debido a la redundancia y al ruido e, incluso, se permite una mejor representación gráfica (41). Es decir, las componentes principales serán no correlacionadas y, por tanto, se mostrarán una perpendicular a la otra (42).

### 1.3.2. Análisis discriminante de proyecciones ortogonales a estructuras latentes

La regresión por mínimos cuadrados (PLS) es un método de análisis multivariado, el cual relaciona una matriz descriptiva  $X$  y una matriz de respuesta  $Y$ . Puede emplearse en análisis de discriminación (PLS-DA) de estructuras de datos cualitativos. Por otro lado, la corrección de la señal ortogonal (OSC), al momento de usar información en la matriz de respuesta  $Y$ , es capaz de identificar una variación sistemática en la matriz descriptiva  $X$ , la cual es ortogonal y no correlacionada con  $Y$ . Entonces, OPLS se presenta como una extensión del método PLS y que presenta un filtro OSC. Dicho de otro modo, OPLS usa información en la matriz  $Y$  para descomponer la matriz  $X$  en bloques de variación estructurada correlacionados y ortogonales a  $Y$ , respectivamente. OPLS, de forma análoga a PLS-DA, puede utilizarse para la discriminación (OPLS-DA) (43).

### 1.3.3. $R^2$ y $Q^2$

PCA, PLS, OPLS-DA muestran valores que indican la calidad de los modelos realizados, conocidos como  $R^2$  y  $Q^2$ . El  $R^2$  puede interpretarse como el porcentaje de varianza en una variable dependiente que es explicada o predicha por todas las variables predictivas en una regresión múltiple, por lo que representa una medida del ajuste del modelo a los datos originales. Asimismo, el  $Q^2$  se reporta como resultado de una validación cruzada y es una medida de tipo cualitativa sobre la coherencia entre los datos predichos y los originales. Si bien no existen estándares de valores exactos de  $R^2$  o  $Q^2$ , de forma empírica, valores mayor a 0.5 o cercanos a 1 demuestran que el modelo estadístico aplicado es correcto (44).

### 1.3.4. S-Plot

El S-plot es una herramienta que permite una mejor visualización e interpretación de modelos multivariados, como en el caso del OPLS-DA, donde se pueden tener dos a más clases. La gráfica en forma de “S” exhibe la

covarianza y la correlación entre los metabolitos, así como la designación de las clases modeladas. Por tanto, la gráfica “S” contribuye a la identificación de metabolitos estadísticamente significativos en función de las contribuciones al modelo y su confiabilidad (45).

#### 1.3.5. Selección del Método

En experimentos de tipo “non-targeted”, la elección del método se basa en los datos y los objetivos experimentales. En ese sentido, la aplicación de un PCA, en un inicio, supone una primera observación que proporciona información sobre la estructura del conjunto de datos y las relaciones entre grupos. Esto último es aconsejable durante estudios exploratorios en los cuales las diferencias metabolómicas entre grupos pueden ser desconocidas o, simplemente, impredecibles. Sin embargo, aun cuando la estructura del conjunto de datos puede ser predecible, una primera aproximación con un PCA proporciona una confirmación adicional antes del análisis por métodos supervisados. Un análisis PLS u OPLS guiado por puntajes de PCA correctamente separado tiene mayor probabilidad de producir resultados relevantes (44).

Actualmente, para llevar a cabo los métodos de análisis multivariado, tales como PCA, OPLS-DA, S-Plot, se pueden utilizar distintos programas de análisis estadístico.

#### 1.4. Programas en metabolómica

##### 1.4.1. MS-DIAL

Este programa es de libre acceso y está dirigido para trabajos de metabolómica “non-targeted”. GC-MS, LC-MS son algunos de los instrumentos con los que puede trabajar. Puede emplearse para realizar el pretratamiento de los datos como la deconvolución, alineación y normalización. Finalmente, cuenta con

una base de datos propia para la identificación de señales cromatográficas. (46).

#### 1.4.1.1. Pretratamientos

##### 1.4.1.1.1. Deconvolución

El procedimiento de deconvolución se refiere a separar, con uso de softwares computacionales, componentes que pueden coeluir. En ese sentido, se crean espectros independientes para cada componente. Así, la deconvolución estima cuánto contribuye cada componente al cromatograma de ion extraído (EIC), cuando este es formado por dos o más componentes (47).

##### 1.4.1.1.2. Alineación

Las variaciones en el tiempo de retención y en la  $m/z$  pueden ser ocasionadas por distintos factores, los cuales pueden ser la temperatura del ambiente, la humedad, fluctuaciones del pH de la fase móvil, cambios en la presión, etc. Es así que el proceso de alineación debe ser ejecutado antes de algún tratamiento estadístico, en especial porque los tiempos de retención son diferentes para cada muestra (48).

##### 1.4.1.1.3. Normalización

Las variaciones sistemáticas entre perfiles metabolómicos de distintas muestras pueden darse por factores que sean independientes con respecto a los procesos biológicos, tales como cambios en la sensibilidad del detector del equipo o diluciones de la muestra. En ese sentido, con el objetivo de asegurar que los espectros puedan ser comparables entre cada corrida —y en especial si se trata de muestras relacionadas—, el proceso de

normalización se emplea para la identificación y la exclusión de las posibles fuentes de variación mencionadas (49).

La interpolación cúbica y la regresión local (LOESS) son tipos de normalización utilizados por MS-DIAL. La interpolación cúbica es una función cúbica por partes que interpola un conjunto de puntos de datos y asegura la suavidad de los puntos. Por su parte, LOESS es una técnica no paramétrica para describir relaciones bivariadas donde la fórmula funcional no se conoce previamente (50,51).

#### 1.4.2. MS-FINDER

Este es un programa universal cuyo objetivo es el establecer una mejor predicción en las fórmulas químicas de los metabolitos, así como la elucidación de las estructuras correspondientes. Asimismo, el programa puede comparar los datos espectrales desconocidos con bases de datos públicas (52).

#### 1.4.3. SIMCA

Este programa faculta una sencilla interpretación y análisis de gran cantidad de datos, es utilizado comúnmente para realizar PCA, PLS, OPLS-DA, etc. Una de sus más notables ventajas es su sensibilidad a la calidad de los datos para generar modelos de componentes principales. Los diagnósticos para evaluar la calidad de los datos son el poder de modelado, qué tan bien una variable favorece a las componentes principales a modelar la variación; el poder discriminatorio, qué tan bien la variable refuerza a los componentes principales a clasificar las muestras en el conjunto de datos. Aquellas variables con bajo poder de modelado y discriminatorio, por lo general, se eliminan para disminuir el ruido de los componentes principales (53).

Algunos de estos programas usan sus propias bases de datos, otros toman bases de datos públicas en línea o tienen la posibilidad de importar librerías de compuestos adquiridas de forma independiente.

### 1.5. Bases de datos

La identificación de metabolitos en experimentos de metabolómica es comúnmente realizada mediante la comparación de la información espectroscópica con librerías o bases de datos de metabolitos conocidos. Este proceso puede ser realizado manualmente; sin embargo, para perfiles de metabolómica no dirigida el trabajo se complica por la gran cantidad de información obtenida. Existen diversas herramientas computacionales que pueden ser utilizadas para llevar a cabo la identificación estructural. A continuación se presentarán algunas bases de datos que son empleadas con frecuencia en experimentos metabolómicos no dirigidos (54).

#### 1.5.1. METLIN

Esta librería de metabolitos es presentada como una página web de libre acceso. Cuenta con más de 240 000 compuestos dentro de los cuales se incluyen metabolitos endógenos de distintos organismos (bacterias, humanos, plantas, etc.) y metabolitos exógenos como fármacos u otras sustancias sintéticas. Además, METLIN ha obtenido datos de MS/MS de alta resolución de más de 13 000 estándares químicos distintos con energías de colisión diferentes y en los modos positivo y negativo. Esta plataforma también ofrece la posibilidad de subir los datos de MS/MS obtenidos de forma experimental para poder compararlos automáticamente con los propios datos de METLIN (55).

#### 1.5.2. Human Metabolome Data Base

Es una base de datos electrónica bastante completa que alberga información detallada sobre metabolitos encontrados en el cuerpo humano, sus roles

biológicos, rutas metabólicas, cantidades fisiológicas y espectros correspondientes. También conocida como HMDB desde 2007, es considerada la herramienta de preferencia en estudios metabolómicos humanos, ya que también contiene datos cuantitativos físicos, químicos, biológicos y clínicos sobre los metabolitos adquiridos de forma experimental (56).

#### 1.5.3. NIST 14

Esta base de datos espectral creada por el Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología contiene más de 200 000 espectros ESI MS/MS de moléculas pequeñas, con lo cual se incluye lípidos, péptidos biológicamente activos, dipéptidos y tripéptidos. Estos datos fueron adquiridos gracias a instrumentos de alta y baja resolución, con uso de trampa de iones, en modos positivo y negativo. Asimismo, el programa “NIST MS Search” se emplea para la identificación de compuestos en donde se comparan los espectros de masas experimentales con los de la librería (55).

#### 1.5.4. Diccionario de Productos Naturales

El diccionario de productos naturales (DNP) es una base de datos elaborada a partir de la base de datos química de Chapman & Hall. Incluye información sobre las propiedades físicas, químicas y biológicas de diversos compuestos; así como distintas nomenclaturas y estructuras correspondientes. El DNP es considerado una base de datos singular y completa sobre productos naturales. Aquellos productos naturales que estén estrechamente relacionados se organizan en una misma entrada, con lo cual las búsquedas se simplifican y son más eficaces. Cada producto natural conocido es documentado de forma virtual y se dispone de forma organizada. Asimismo, se tienen productos naturales de estructura no conocida cuya cobertura de investigación está progresando por medio de búsquedas retrospectivas (57).

Gracias a la implementación de estas y otras bases de datos, las investigaciones en metabolómica pueden identificar, de forma putativa, metabolitos que pueden ser utilizados como marcadores.

#### 1.6. Identificación y Validación de Metabolitos

Uno de los objetivos más relevantes en metabolómica ha sido el descubrimiento de biomarcadores y, en especial, de aquellos que se puedan relacionar con diversas características fenotípicas. Existen dos grandes obstáculos en la investigación metabolómica; la identificación de metabolitos y la validación de biomarcadores. En cualquier experimento metabolómico “non-targeted” solo es posible identificar un subconjunto de todos los metabolitos presentes en la muestra. Esto ha ido mejorando con el uso de herramientas “in silico”, el desarrollo de bases de datos de metabolitos y la síntesis de compuestos estándar para la confirmación de la identidad de los metabolitos (23).

## II. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN Y OBJETIVOS

### 2.1. Pregunta de Investigación

- ¿Es posible diferenciar las variedades plomo clara (“Chilliwa”) y roja (“Ramis”) de kañiwa (*Chenopodium pallidicaule* Aellen) empleando técnicas de metabolómica?
- ¿Existen diferencias significativas entre los perfiles metabolómicos de las dos variedades de kañiwa?

### 2.2. Objetivos

#### 2.2.1. General

- Discriminar dos variedades de kañiwa (*Chenopodium pallidicaule* Aellen), plomo clara (“Chilliwa”) y roja (“Ramis”) provenientes del departamento de Puno, por medio de estudios metabolómicos.

#### 2.2.2. Específicos

- Determinar los perfiles metabolómicos de las variedades de kañiwa “Chilliwa” y “Ramis” por medio de cromatografía líquida de ultra alto rendimiento acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (UHPLC-HRMS).
- Elucidar los compuestos químicos que sean potenciales marcadores en la diferenciación de las dos variedades de estudio.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Materiales

- Balanza analítica Adventurer® OHAUS – Modelo AX224
- UHPLC Dionex Ultimate 3000 Thermo Scientific
- Columna Phenomenex, Luna ® Omega C18 100 Å; tamaño de partícula de 1.6 µm, dimensiones de 150 x 2.1 mm.
- Espectrómetro de masas Thermo Scientific™ Q Exactive™ híbrido Cuadrupolo-Orbitrap.
- Centrifuga Hettich Universal 320 R
- Vortex Mixer Corning LSE 6776
- Molinillo de granos secos BOSCH – Modelo MKM6003
- Metanol LC-MS
- Acetonitrilo LC-MS
- Ácido Fórmico LC-MS
- Agua tipo I (Resistividad 18 MOhm-cm)

#### 3.2. Obtención de la muestra

Las variedades de kañiwa estudiadas fueron la kañiwa plomo clara (“Chilliwa”) y kañiwa roja (“Ramis”). Las muestras corresponden a las semillas de la kañiwa, las mismas que fueron compradas al Dr. Mario Tapia Núñez, quien es un productor de kañiwa del distrito de Ayaviri, provincia de Melgar, departamento de Puno. (Anexo 1)

#### 3.3. Preparación de las muestras

El protocolo de extracción se generó en base al estudio metabolómico de Bijttebier *et al.* (58) y puede visualizarse en el Anexo 2.

Una vez realizada la molienda de las semillas con uso del molinillo, se pesó 100 mg de muestra por triplicado y se colocaron en tres microviales de centrifuga

Eppendorf® de 1.7 mL. A cada microvial se le añadió 800 µL de metanol al 80% en agua tipo I, se colocaron por un minuto en vórtex, 10 minutos por ultrasonido y un minuto por vórtex nuevamente. Posteriormente, se centrifugó a 10 000 revoluciones por minuto (rpm) por 10 minutos a una temperatura de 4°C.

Luego de esta primera ronda de extracción se recolectó 400 µL de los sobrenadantes de cada microvial y se traspasaron a otros tres nuevos microviales. Seguidamente, se realizó una segunda ronda de extracción con los sedimentos restantes de la primera ronda. Esta segunda ronda fue realizada de la misma forma que la primera; sin embargo, al final se recolectó 800 µL de sobrenadantes en lugar de 400 µL, los cuales fueron traspasados a los tres nuevos microviales mencionados anteriormente. Así, se obtuvo tres microviales cada uno con 1200 µL de sobrenadante.

El mismo procedimiento fue efectuado para tratar la segunda variedad de kañiwa. Finalmente, se prepararon muestras para el blanco y el control de calidad (QC). El QC consistió en la mezcla de 100 µL de los seis extractos (ambas variedades de kañiwa) realizados, con lo cual el QC contó con 600 µL. Este control se realiza debido a la variabilidad en los tiempos de retención que pueden aparecer entre cada corrida. Mientras que el blanco será el mismo solvente utilizado para la extracción (metanol 80%).

#### 3.4. Condiciones de la cromatografía

Se elaboraron dos sistemas para la separación por UHPLC. El sistema A consistió en agua tipo I con ácido fórmico (FA) al 0.1% y el sistema B, Acetonitrilo (ACN) con FA al 0.1% (58).

La tabla 1 muestra los porcentajes utilizados de cada sistema durante la cromatografía.

Tabla 1: Sistema de gradientes para la corrida cromatográfica

Tiempo	Sistema A	Sistema B
0 a 5 minutos	95%	5%
5 a 10 minutos	5%	95%
10 a 12 minutos	5%	95%
12 a 12.2 minutos	95%	5%
12.2 a 15 minutos	95%	5%

### 3.5. Análisis de datos

La información obtenida por medio de UHPLC-HRMS fue importada, deconvolucionada, alineada y normalizada con uso del programa gratuito MS-DIAL. La identificación de los metabolitos se realizó con los programas MS-DIAL, MS-FINDER y la base de datos del “Dictionary of Natural Products” (DNP) 26.2. Finalmente, para el análisis multivariado (Análisis de componentes principales (PCA), Proyecciones ortogonales a estructuras latentes-Análisis discriminante (OPLS-DA) y S-plot) y la identificación de biomarcadores se utilizó el software SIMCA.

#### IV. RESULTADOS

Realizado el protocolo de extracción y análisis cromatográfico por medio de UHPLC-HRMS, se obtuvieron los siguientes perfiles metabolómicos.

En la figura 2 se observa el Cromatograma de iones totales (TIC) de la variedad plomo clara “Chilliwa” en modo positivo y modo negativo. Se evidencia que las señales cromatográficas tienen mayor intensidad en el modo negativo.

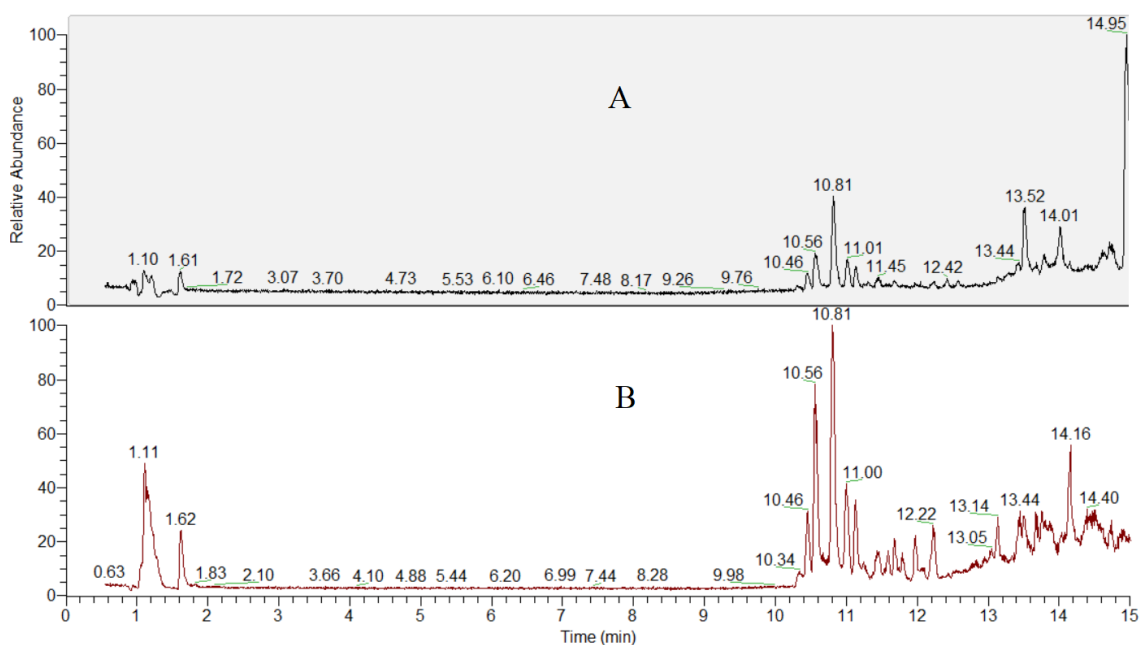


Figura 2: TIC de *Chenopodium pallidicaule* en extracto metanólico de semillas de Kañiwa plomo clara “Chilliwa”, analizado por UHPLC-HRMS en modo positivo (A) y modo negativo (B)

En la figura 3 se muestra el TIC de la variedad roja “Ramis” en modo positivo y negativo. Se evidencia que las señales cromatográficas tienen mayor intensidad en el modo negativo.

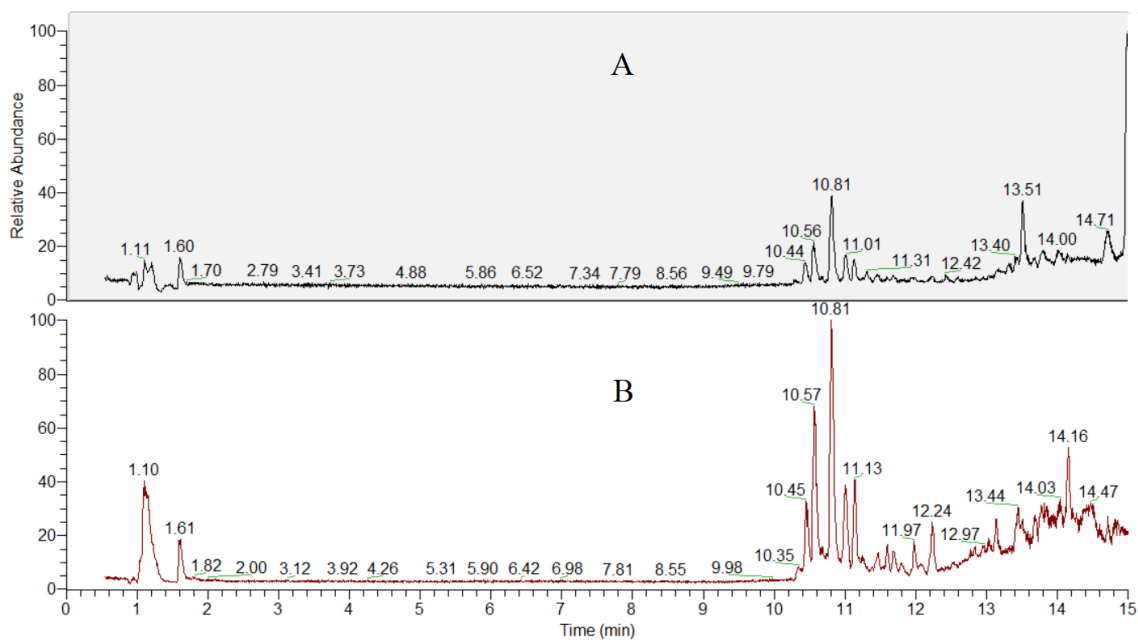


Figura 3: TIC de *Chenopodium pallidicaule* en extracto metanólico de semillas de Kañiwa roja “Ramis”, analizado por UHPLC-HRMS en modo positivo (A) y modo negativo (B)

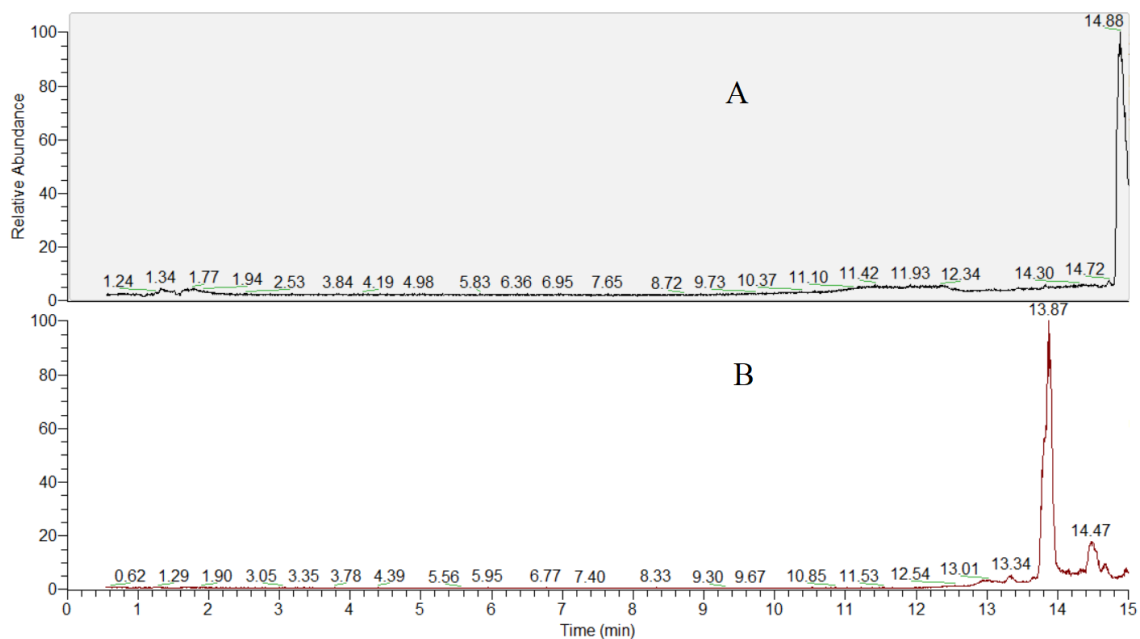


Figura 4: TIC de Metanol al 80% (Blanco) obtenido por UHPLC-HRMS en modo positivo (A) y modo negativo (B)

Entre las figuras 2 y 3 se observa que las señales cromatográficas relevantes aparecen al inicio (entre el minuto 1 al minuto 2) y al final (entre el minuto 10 al minuto 15). Asimismo, se observa similitud entre ambas, pero no son completamente iguales. Para analizar con mayor detalle es necesario observar las señales del solvente utilizado (Figura 4). La señal más intensa se observa en los minutos 14.88 y 13.87 en los modos positivo y negativo, respectivamente y su abundancia relativa fue de 466.53.

La figura 5 muestra el TIC del QC, el cual es la mezcla de 300  $\mu$ L de cada muestra Mix.

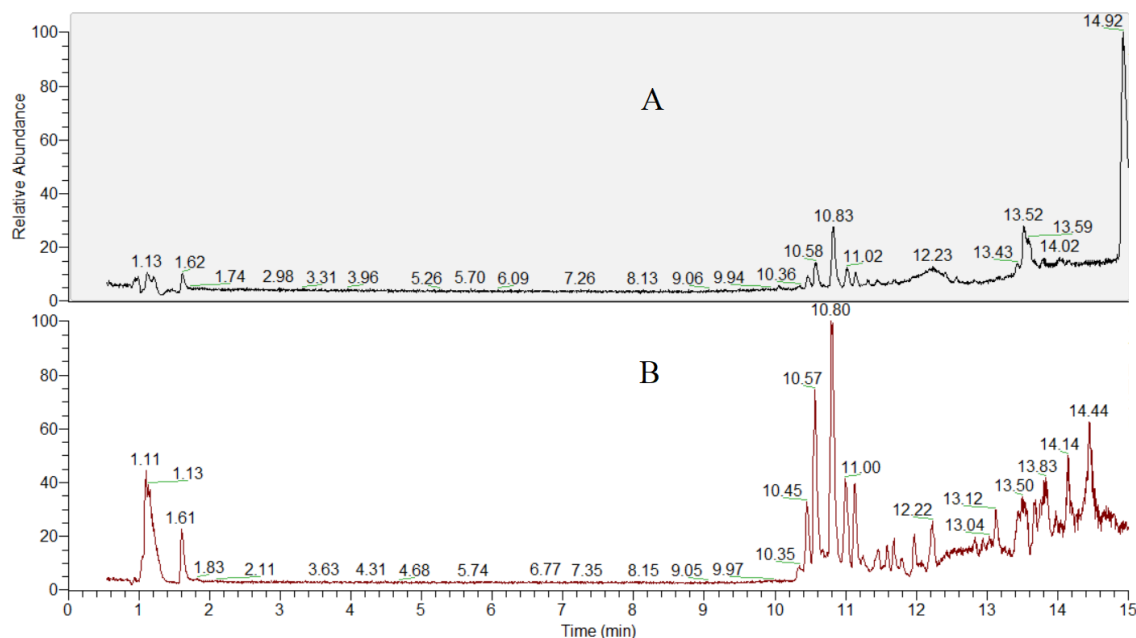


Figura 5: TIC del QC obtenido por UHPLC-HRMS en modo positivo (A) y modo negativo (B)

Mediante el software MS-DIAL se encontraron 2189 señales cromatográficas (“features”) en el modo positivo y 2779 en el modo negativo, las cuales, además de las señales de los metabolitos extraídos de las variedades de kañiwa, incluyen también las señales cromatográficas de los posibles contaminantes presentes en los solventes, material de plástico, contaminantes del sistema UHPLC, posibles formaciones de aductos, entre otras señales.

El proceso de deconvolución, alineamiento y normalización se efectuó usando el mismo programa mencionado. Luego, estos datos fueron exportados al software SIMCA para realizar el PCA.

Bajo esa premisa, se excluyeron aquellos datos cuya relación entre el promedio del área 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 cuyo error relativo (RSD) de las áreas de las muestras de control sea mayor a 30%. De esta forma se asegura que el PCA realizado contenga la información más relevante.

En las figuras 6 y 7 se muestran los PCA realizados de los TIC en modo positivo y modo negativo, respectivamente. Se puede observar que las muestras para una misma variedad de kañiwa están agrupadas; asimismo, existe una clara separación entre las dos variedades de kañiwa. Los puntos correspondientes al QC siempre se mantienen en el medio entre ambos grupos de variedades.

Por otro lado, el primer componente (PC1) y el segundo componente (PC2) de los PCA explican el 50% y el 32% de la varianza, respectivamente para el modo positivo; el 70% y el 11% de la varianza, respectivamente para el modo negativo.

Los  $R^2$  y  $Q^2$  de los PCA son de 0.81 y 0.639, respectivamente para el modo positivo; 0.815 y 0.591, respectivamente para el modo negativo.

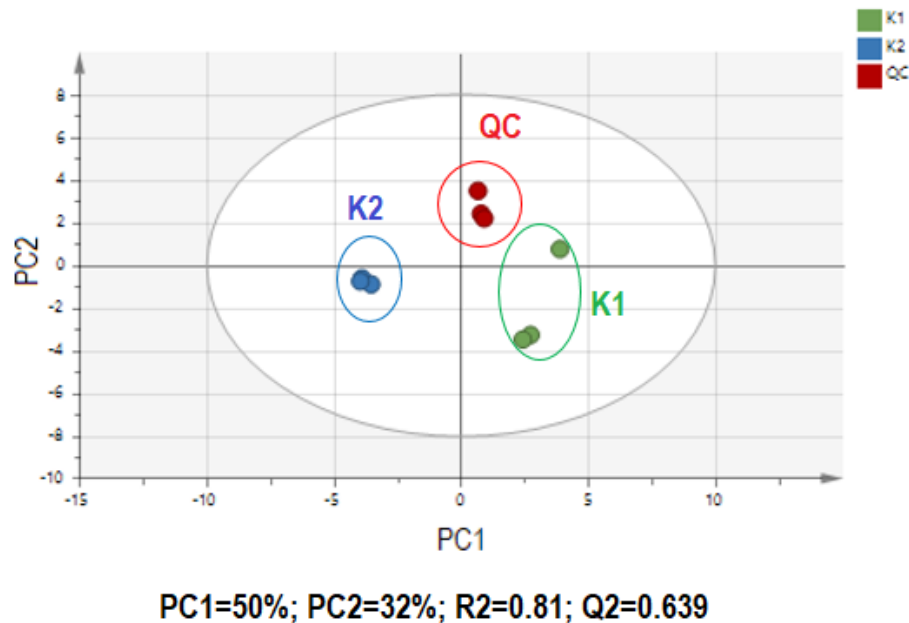
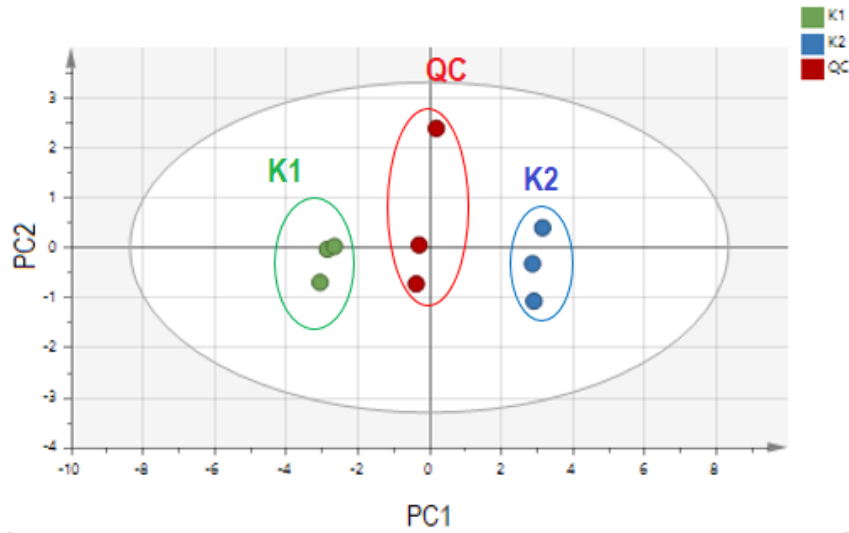


Figura 6: Análisis de Componentes Principales (PCA) de las dos variedades de Kañiwa.

Modo positivo

K1: Kañiwa “Chilliwa”. K2: Kañiwa “Ramis”



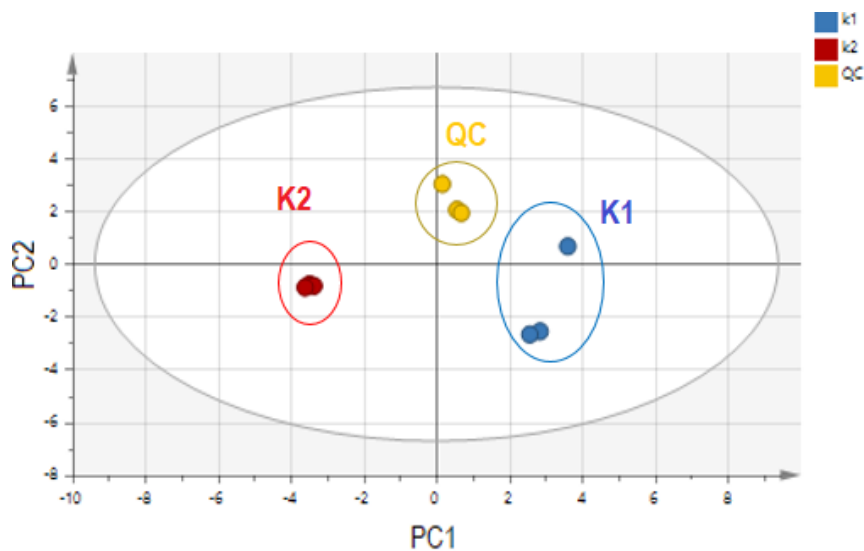
**PC1=70%; PC2=11%; R2=0.815; Q2=0.591**

Figura 7: Análisis de Componentes Principales (PCA) de las dos variedades de Kañiwa.

Modo negativo

K1: Kañiwa “Chilliwa”. K2: Kañiwa “Ramis”

La figura 8 muestra el PCA realizado por la combinación de los TIC del modo positivo y el modo negativo. Al igual que los PCA anteriores, se observan las separaciones entre las dos variedades. El PC1 y el PC2 explican el 53% y el 27% de la varianza. Los  $R^2$  y  $Q^2$  de los PCA son de 0.793 y 0.616, respectivamente.



**PC1=53%; PC2=27%; R2=0.793; Q2=0.616**

Figura 8: Análisis de Componentes Principales (PCA) de las dos variedades de Kañiwa.

Modo positivo y negativo

K1: Kañiwa “Chilliwa”. K2: Kañiwa “Ramis”

La figura 9 muestra el OPLS-DA realizado en base al PCA obtenido por la combinación de los TIC del modo positivo y el modo negativo. El programa SIMCA analiza los datos con la correspondiente clasificación de las variables. Se observa una clara separación de las variedades y estadísticamente es significativa, ya que el  $R^2$  es 1 y el  $Q^2$  es 0.994.

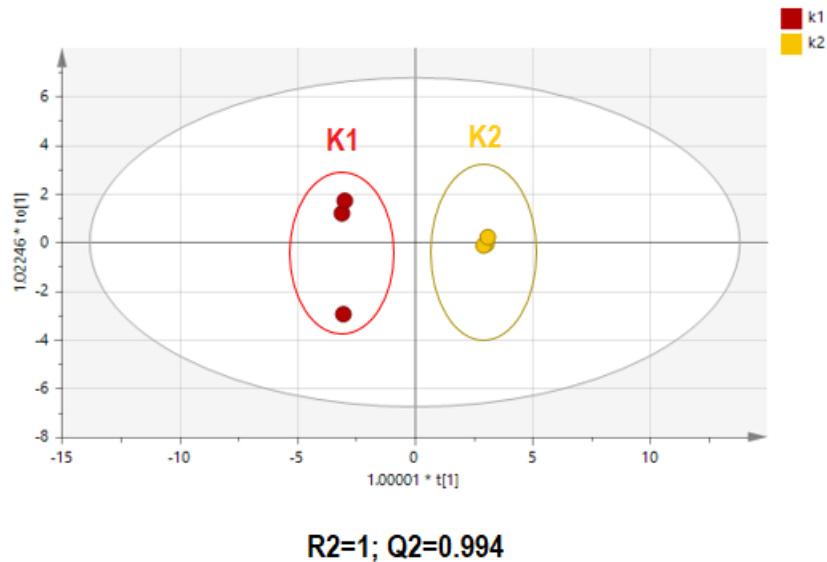


Figura 9: OPLS-DA

K1: Kañiwa “Chilliwa”. K2: Kañiwa “Ramis”

En la figura 10 se muestra el diagrama S-Plot realizado en base al análisis OPLS-DA. En dicho programa los puntos agrupados en el centro de las gráficas representan los compuestos químicos compartidos por ambas variedades.

Asimismo, se observa que los puntos más alejados al extremo derecho representan los posibles biomarcadores de la kañiwa roja “Ramis”; mientras que al extremo izquierdo se observan los posibles biomarcadores de la kañiwa plomo clara “Chilliwa”.

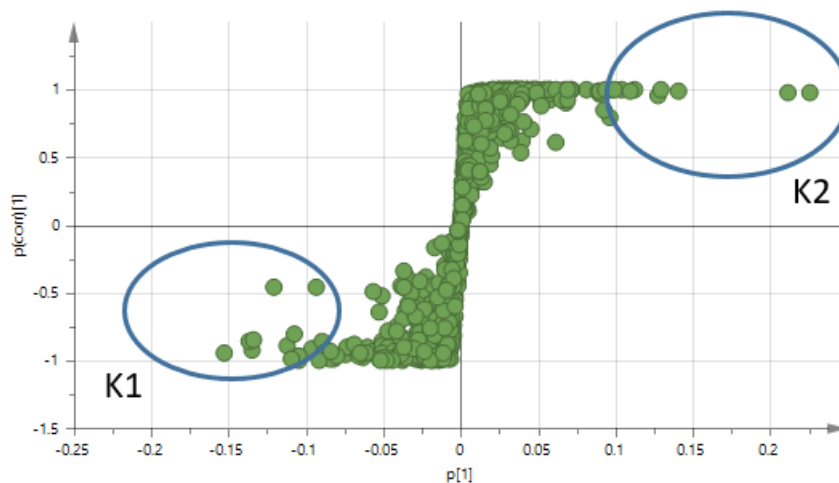


Figura 10: S-Plot del modelo OPLS-DA  
 K1: Kañiwa “Chilliwa”. K2: Kañiwa “Ramis”

En ese sentido, el software SIMCA permite, mediante la comparación de los espectros de masas, identificar putativamente biomarcadores para la diferenciación de estas dos variedades (Tabla 2). El programa encontró 20 posibles biomarcadores, de los cuales solo uno no pudo ser identificado. En donde el N-Acetiltriptófano y la Crustecdisona son los puntos más alejados hacia los extremos derecho e izquierdo del S-Plot, respectivamente.

El rango de pesos de los biomarcadores potenciales varía desde 153 hasta 885 umas. Además, cinco metabolitos tienen un tiempo de retención alrededor del minuto 1, mientras que los demás se encuentran posteriores al minuto 10.

Tabla 2: Biomarcadores potenciales para la diferenciación de K1 (kañiwa plomo clara “Chilliwa”) y K2 (kañiwa roja “Ramis”)

Biomarcador	Modo de ionización	Masa promedio	Promedio Tiempo de Retención (min)	K1	K2
N-Acetilriptófano	Negativo	245.091	11.14		✓
Delfinidina-o-(6"-O-alfa-ramnopiranosil-beta-glucopiranosida)	Negativo	609.144	10.8		✓
2',5'-Dihidroxi flavona 5'-acetato	Negativo	295.059	12.83		✓
N-trans-sinapoiltiramina	Negativo	342.133	11.94		✓
Isoramnetina-3-Glucósido	Negativo	755.201	10.45		✓
Gluconato	Negativo	195.049	1.15		✓
Ácido L-N- (1H-Indol-3-il acetil) aspártico	Positivo	291.096	11.14		✓
Annularin H	Positivo	413.143	10.97		✓
Kaempferol 4'-metil éter 3-(2Glc-glucosilrutinosida)	Negativo	769.216	10.68		✓
Isoramnetina-3-O-Rutinosida	Negativo	623.159	11		✓
Crustecdisona	Negativo	525.304	10.81	✓	
Ácido vernólico	Negativo	295.226	14.15	✓	
Makisterona B	Negativo	539.32	11.02	✓	
Ácido pinélico	Negativo	329.232	12.23	✓	
2',6,7-Trihidroxiisoflavona	Negativo	283.066	1.62	✓	
Desconocido	Positivo	153.04	1.61	✓	
Ácido floionólico	Negativo	331.247	12.19	✓	
Oxipurinol	Positivo	153.04	1.22	✓	
Xantosina	Negativo	283.066	1.22	✓	
Genkwadaphnin-20-palmitato	Negativo	885.444	11.43	✓	

## V. DISCUSIÓN

Trabajos como los de Repo *et al.* (59) utilizan métodos de extracción con uso de solventes orgánicos para la obtención de compuestos hidrofílicos y lipofílicos de kañiwa por separado; sin embargo, aún no se ha desarrollado un método de extracción integral para semillas de kañiwa. Esto todavía resulta un desafío para estudios metabolómicos no dirigidos que tengan como objetivo el análisis de semillas, plantas, alimentos o cualquier sistema biológico (60). El método de extracción realizado es efectivo y otros estudios como los de Bianco *et al.* (61), Chang *et al.* (62), Dinelli *et al.* (63), también proponen la molienda, extracción con un solvente por sonicación y centrifugación para alimentos sólidos que tengan bajo contenido de agua como, por ejemplo, semillas de cereales.

Posteriormente, los cromatogramas obtenidos mostraron que la extracción y el análisis UHPLC-HRMS, con uso de la columna de fase reversa, fueron adecuados, ya que se encontró gran cantidad de metabolitos de mediana y baja polaridad. Además, se evidenció una correcta distribución a lo largo de la corrida; sin embargo, para lograr que las señales iniciales, considerados los de mayor polaridad, tengan una mejor resolución, se recomienda un estudio complementario con uso de una columna de cromatografía líquida de interacción hidrofílica (HILIC).

Los estudios sobre kañiwa en base a su perfil químico son limitados, mucho menos sobre metabolómica. Es por ello que en los siguientes párrafos se comparan los resultados con algunos estudios metabolómicos que tienen como objeto de estudio especies relacionadas.

El estudio de Abu-Reidah *et al.* (64) reportó 179 compuestos de las semillas de una planta herbácea anual denominada *Vicia Faba L. (Fabaceae)*. Esta fue sometida a tratamientos con metanol 80% y técnicas analíticas como UHPLC-ESI-QTOF-MS con uso de una columna Luna C18. En donde se identificó, en su mayoría, compuestos fenólicos, gran parte eran flavonoides como prodelfinidinas, procianidinas, flavonas, etc. Asimismo, compuestos como ácidos orgánicos, alcaloides, terpenoides, entre otros. Algunos de los biomarcadores de kañiwa presentados en este trabajo pertenecen a la misma familia de compuestos que los reportados por el estudio de Abu-Reidah *et al.* (64).

El PCA permitió un buen agrupamiento y separación entre las dos variedades de kañiwa, lo cual se evidenció en los tres PCA presentados. El estudio metabolómico “non-targeted” de Righetti *et al.* (65), el cual tuvo como objetivo discriminar variedades de cereales antiguos (*Triticum spp.*), mostró PCA para los modos positivo y negativo, cuyos PC1 y PC2 explican el 32.9% y 17.1% de la varianza (ESI positivo); 25.8% y 21.4% de la varianza (ESI negativo). Además, sus  $R^2$  y  $Q^2$  son 0.816 y 0.663 (ESI positivo); 0.89 y 0.778 (ESI negativo). Estos valores indicaron un buen modelo para la discriminación correspondiente y son similares a los obtenidos en este estudio.

El OPLS-DA efectuado reforzó la discriminación mediante una mejor separación de las clases (variedades de kañiwa). Asimismo, el  $R^2$  y el  $Q^2$  fueron 1 y 0.994. Por otro lado, para la discriminación de variedades de trigo, Righetti *et al.* (65) efectuó un OPLS-DA, el cual obtuvo valores de  $R^2$  (ESI positivo y ESI negativo) mayores a 0.5 y  $Q^2$  mayores a 0.9. Los  $R^2$  mayores a 0.5 y los  $Q^2$  cercanos a 1 resultantes de este estudio y el de Righetti *et al.* (65) demuestran el correcto y buen modelo estadístico aplicado. Por otro lado, el OPLS-DA se considera un paso previo para realizar el S-Plot.

El S-Plot permitió encontrar biomarcadores potenciales para la diferenciación química de las dos variedades de kañiwa de estudio. Según la tabla 2, elaborada a partir de la información del S-Plot, se encontró 20 compuestos, dentro de los cuales se identificaron 19. Sin embargo, cabe resaltar que la identificación certera de dichos biomarcadores debería realizarse con estándares químicos para cada compuesto.

Por medio de los programas utilizados, se encontraron 10 biomarcadores potenciales para la kañiwa plomo clara “Chilliwa”. En donde, uno de ellos no pudo ser identificado y cuya masa es 153.04 umas en un tiempo de retención de 1.61. Asimismo, los otros 9 metabolitos, los cuales sí fueron identificados, se describen en los siguientes párrafos.

La Crustecdisona ( $C_{27}H_{44}O_7$ ) es considerada una hormona esteroidal cuya función consiste en la regulación de los procesos de muda en insectos (66). Sin embargo, también ha sido aislada de plantas como *Podocarpus elatus*, *Podocarpus macrophyllus* y *Polypodium vulgare L.* (67)

El ácido vernólico ( $C_{18}H_{32}O_3$ ), esta sustancia de naturaleza lipídica, de forma específica, ácido graso epoxigenado, se ha reportado en semillas de *Euphorbia lagascae*, *Crepis plaestina* y *Vernonia galamensis*. Actualmente es utilizado para la elaboración de pinturas, plásticos, etc (68).

La Makisterona B ( $C_{28}H_{46}O_7$ ) es un compuesto que pertenece a los fitoecdisteroides (69). Los fitoecdisteroides han sido identificados en más de 100 familias de plantas. Dinan *et al.* (70) reportó que esta categoría de compuestos se encontraba en gran parte del subgénero *Chenopodium*.

El ácido pinélico ( $C_{18}H_{34}O_5$ ) es un metabolito derivado del ácido linoleico (71). Oueslati *et al.* (72) reportaron la presencia de este compuesto en *Salsola tetrandra*, un arbusto de la subfamilia *Chenopodiaceae*.

La 2',6,7-Trihidroxiisoflavona es una flavona, una clase de flavonoide. Los flavonoides están ampliamente distribuidos en distintas plantas y son conocidos por sus actividades biológicas, como por ejemplo su capacidad antioxidante (73).

El ácido floionólico ( $C_{18}H_{36}O_5$ ) es un ácido graso de cadena larga, generalmente constituido por una sección alifática de entre 13 y 21 átomos de carbono. Puede encontrarse en algunas frutas, en plantas como *Olea europea*, cera de manzana, *Agave americana*. Así como constituyente de la cutícula de diversas plantas (74).

El oxipurinol ( $C_5H_4N_4O_2$ ) se clasifica como un inhibidor de la enzima xantina oxidasa, la cual se encarga de transformar la hipoxantina y la xantina a ácido úrico (75).

La xantosina ( $C_{10}H_{12}N_4O_6$ ) es un nucleósido de tipo purina, su estructura puede describirse como una xantina unida a una ribofuranoza por medio del enlace beta-N(9)-glicosídico (76). Por otro lado, es utilizado como precursor en la formación de cafeína en algunas plantas (77).

El compuesto Genkwadaphnin-20-palmitato es un diterpeno obtenido de extractos de *Daphne oleoides*. Su estructura cuenta con alta cantidad de átomos de oxígeno. Además, ha demostrado tener una potente actividad citotóxica contra algunas líneas celulares (78).

Por otro lado, por medio de los programas utilizados, se ha identificado 10 biomarcadores potenciales para la kañiwa roja “Ramis” los cuales se describen en los siguientes párrafos.

El N-acetiltriptófano ( $C_{13}H_{14}N_2O_3$ ) es un derivado del aminoácido triptófano (79).

La delphinidina-o-(6"-O-alfa-ramnopiranosil-beta-glucopiranosida) pertenece a la familia de las antocianinas. Torskangerpoll *et al.* (80) reportaron la presencia de dicho compuesto en flores de distintas variedades de tulipanes. Las antocianinas son

compuestos hidrosolubles, los cuales, por lo general, se encuentran glicosilados y aportan colores como rojo, azul o púrpura a vegetales y frutas (81).

La 2',5'-Dihydroxiflavona 5'-acetato ( $C_{17}H_{12}O_5$ ) es una flavona, una clase de flavonoide, la cual ha sido reportada por Wollenweber *et al.* (82) en especies de *Primula*.

La N-trans-sinapoyltiramina ( $C_{19}H_{21}NO_5$ ) pertenece a los derivados del ácido hidroxicinámico (83), los cuales se caracterizan por ser compuestos polifenólicos obtenidos por medio de la ruta bioquímica del mevalonato-shikimato en plantas (84). N-trans-sinapoyltiramina ha sido aislada de las especies *Piper boechmeriaefolium* y *Lindera glauca* (85,86)

La Isoramnetina-3-Glucósido ( $C_{22}H_{22}O_{12}$ ) es una glicosiloxiflavona (87), pertenece al grupo de metabolitos secundarios denominados flavonoides, a los cuales se les conoce por su actividad antioxidante, antiinflamatoria y antimicrobiana (88).

El Gluconato ( $C_6H_{11}O_7^-$ ) es una base conjugada del ácido D-glucónico (89). Las sales de gluconato son sustancias naturales que pueden ser utilizados como aditivos alimentarios (90).

El Ácido L-N-(1H-Indol-3-il acetil) ( $C_{14}H_{14}N_2O_5$ ) aspártico es un aminoácido alfa caracterizado por una cadena alifática N-acilada. Se ha reportado en variedades de tomates, así como componente de distintos tejidos vegetales (91).

La Annularin H ( $C_{10}H_{10}O_5$ ) es un metabolito policétido, se ha extraído del hongo de agua dulce denominado *Annulatascus triseptatus* (92).

El Kaempferol 4'-metil éter 3-(2Glc-glicosilrutinosida) ( $C_{34}H_{42}O_{20}$ ) es un flavonoide. Ha sido identificado, por medio de UHPLC-MS, en extractos metanólicos de *Boungainvillea glabra* y raíz de *Filago germánica* (93,94).

Isoramnetina-3-O-rutinosida ( $C_{28}H_{32}O_{16}$ ) pertenece a la familia de los flavonoides y ha sido reportada en plantas como *Calendula officinalis*, *Papaver rhoeas*, *Hippophae rhamnoides* (95)

En el análisis de los biomarcadores descritos cabe resaltar que ninguno ha sido aislado de las variedades de kañiwa estudiadas.

Sin embargo, Repo *et al.* (16) reportaron que las semillas kañiwa variedad “Kello”, “Wila” y “Guinda” contenían Isoramnetina y la variedad “Ayara” contenía Kaempferol, por lo que es probable que se encuentren en la kañiwa roja “Ramis” como se reportó en este estudio. Por otro lado, debido a la gran cantidad de plantas que contienen estos

compuestos químicos, no se considerarían metabolitos diferenciadores de la variedad en cuestión.

Por su parte, la Delfinidina-o-(6''-O-alfa-ramnopiranosil-beta-glucopiranosida), uno de los metabolitos encontrados en la kañiwa roja “Ramis”, es una antocianina. Este metabolito explicaría el color rojo de la kañiwa roja “Ramis” —característica que no se presenta en la kañiwa plomo clara “Chilliwa”— y se establece como biomarcador potencial para diferenciar esta variedad de kañiwa de la kañiwa plomo clara “Chilliwa”. Como se mencionó anteriormente, este estudio metabolómico fue llevado a cabo como una investigación preliminar para tratar de identificar las diferencias entre las variedades de kañiwa plomo clara “Chilliwa” y kañiwa roja “Ramis”. En ese sentido, los resultados obtenidos se limitan a las muestras utilizadas en el estudio; pero pueden ser de utilidad para estudios de mayor envergadura, en donde se tomen en cuenta otras variables (localidad, cultivo, almacenamiento, clima, entre otros). Asimismo, es recomendable hacer uso de otras bases de datos para la identificación de las estructuras químicas de los biomarcadores desconocidos.

## VI. CONCLUSIONES

Para las kañiwas plomo clara “Chilliwa” y roja “Ramis”, colectadas en Junio del 2017, procedentes de la provincia Ayaviri (Puno), se concluye lo siguiente:

- Se obtuvieron los perfiles metabolómicos de las variedades de kañiwa plomo clara “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 20 biomarcadores. Diecinueve de ellos identificados putativamente como: Crustecdisona, ácido vernólico, makisterona B, ácido pinélico, 2',6,7-Trihidroxiisoflavona, ácido floionólico, oxipurinol, xantosina, genkwadaphnin-20-palmitato correspondientes a la kañiwa plomo clara “Chilliwa”; N-acetilriptófano, delfinidina-o-(6"-O-alfa-ramnopiranosil-beta-glucopiranosida), 2',5'-dihydroxiflavona 5'-acetato, n-trans-sinapoitiramina, isoramnetina-3-Glucósido, gluconato, ácido L-N-(1H-Indol-3il acetil) aspártico, annularin H, kaempferol 4'-metil éter 3-(2Glc- glucosilrutinosida), Isoramnetina-3-O-rutinosida correspondientes a la kañiwa roja “Ramis”.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Innovation NRCACT. Lost Crops of the Incas: Little-known Plants of the Andes with Promise for Worldwide Cultivation. National Academies Press; 1989.
2. Tapia ME, Fries AM. Guía de campo de los cultivos andinos. Fao; Anpe-Perú. 2007. 221 p.
3. Mamani VA. Manejo y mejoramiento de kañiwa. Editor Altiplano EIRL. 2010;1:43.
4. FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). (2000). Cultivos andinos subexplotados y su aporte a la alimentación. Agronomía de los cultivos andinos. Qañiwa (*Chenopodium pallidicaule* Aellen). Disponible en: [http://www.fao.org/tempref/GI/Reserved/FTP\\_FaoRlc/old/prior/segalim/prodalim/prodveg/cdrom/contenido/libro10/home10.htm](http://www.fao.org/tempref/GI/Reserved/FTP_FaoRlc/old/prior/segalim/prodalim/prodveg/cdrom/contenido/libro10/home10.htm)
5. Dettmer K, Hammock BD. Metabolomics - A new exciting field within the “omics” sciences. *Environ Health Perspect.* 2004;112(7):396–7.
6. Tjønneland A, Ove L. Forecasting individual breast cancer risk using plasma metabolomics and biocontours. *Metabolomics* [Internet]. 2015;1376–80. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s11306-015-0793-8>
7. Wu C, Kim HK, Wezel GP Van, Choi YH. Metabolomics in medicinal chemistry Metabolomics in the natural products field – a gateway to novel antibiotics. *Drug Discovery Today Technologies* [Internet]. 2015. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ddtec.2015.01.004>
8. Cubero-leon E, Peñalver R, Maquet A. Review on metabolomics for food authentication. *FRIN* [Internet]. 2014;60:95–107. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2013.11.041>
9. Dettmer K, Aronov PA, Hammock BD. Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrometry Rev.* 2007;26(1):51–78.
10. Roberts LD, Souza AL, Gerszten RE, Clish CB. Targeted Metabolomics. *Curr Protoc Mol Biol.* 2012. 1-24 p.
11. Li CR, Li MN, Yang H, Li P, Gao W. Rapid characterization of chemical markers for discrimination of Moutan Cortex and its processed products by direct

- injection-based mass spectrometry profiling and metabolomic method. *Phytomedicine* [Internet]. 2018; Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.04.003>
12. Martínez Bueno MJ, Díaz-Galiano FJ, Rajska Ł, Cutillas V, Fernández-Alba AR. A non-targeted metabolomic approach to identify food markers to support discrimination between organic and conventional tomato crops. *J Chromatogr A* [Internet]. 2018;1546:66–76. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.03.002>
  13. Catchpole GS, Beckmann M, Enot DP, Mondhe M, Zywicki B, Taylor J, et al. Hierarchical metabolomics demonstrates substantial compositional similarity between genetically modified and conventional potato crops. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2005;102(40):14458–62. Disponible en: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0503955102>
  14. “ITIS Standard Report Page: *Chenopodium pallidicaule*”. [Internet]. Disponible en: [https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search\\_topic=TSN&](https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&)
  15. IPGRI, PROINPA, IFAD. Descriptores para Cañahua (*Chenopodium pallidicaule* Aellen). 2005. 54 p.
  16. Repo-Carrasco-Valencia R, Hellström JK, Pihlava JM, Mattila PH. Flavonoids and other phenolic compounds in Andean indigenous grains: Quinoa (*Chenopodium quinoa*), kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*) and kiwicha (*Amaranthus caudatus*). *Food Chem* [Internet]. 2010;120(1):128–33. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.087>
  17. Ligarda Samanez, Carlos A.; Repo-Carrasco Ritva; Encina Zelada, Christian; Herrera Bernabé, Iván; Quinde-Axtell Z. Extracción con soluciones neutra y alcalina para el aislamiento de fibra soluble e insoluble a partir de salvado de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.), kiwicha (*Amaranthus caudatus* L.) y cañihua (*Chenopodium pallidicaule* Aellen). *Rev Soc Química Perú*. 2012;78(1):53–64.
  18. Repo-Carrasco R, Espinoza C, Jacobsen SE. Nutritional value and use of the andean crops quinoa (*Chenopodium quinoa*) and kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*). *Food Rev Int*. 2003;19(1–2):179–89.
  19. Mujica, A., Jacobsen, S., Ortiz, R., Canahua, A., Apaza, V., Aguilar, P.C. & Dupeyrat, R. 2002. La Cañihua (*Chenopodium pallidicaule* Aellen) en la nutrición humana del Perú. UNA-Puno, Escuela de post grado, CARE Regional Puno, Embajada Real de los Países Bajos, INIA, CIP. Puno, Peru, 68 p.

20. Pinto M., Alarcón V., Soto JL., Rojas W. 2010. Usos tradicionales, no tradicionales e innovaciones agroindustriales de los granos andinos. Cap. XI. En: En: Rojas W, Soto JL, Pinto M, Pager M, Padulosi S (Editores). 2010. Granos Andinos. Avances, logros y experiencias desarrolladas en quinua, cañahua y amaranto en Bolivia. Bioersity International, Roma, Italia.
21. Mussap M, Zaffanello M, Fanos V. Metabolomics: a challenge for detecting and monitoring inborn errors of metabolism. 2018;6(1). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.21037/atm.2018.09.18>.
22. Lämmmerhofer M, Weckwerth W. Metabolomics in practice. Weinheim an der Bergstrasse, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH; 2013.
23. Johnson CH, Ivanisevic J, Siuzdak G. Metabolomics: beyond biomarkers and towards mechanisms. Nat Publ Gr [Internet]. 2016;1–9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nrm.2016.25>
24. Patti, G. J., Yanes, O., & Siuzdak, G. (2012). Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 13(4), 263–269. doi:10.1038/nrm3314
25. Abdul-Hamid M. Emwas. Chapter 13 The Strengths and Weaknesses of NMR Spectroscopy and Mass Spectrometry with Particular Focus on Metabolomics Research. Vol. 1277.
26. Chromatography. IUPAC Compend Chem Terminol [Internet]. 1993;819 (Recommendations 1990):2179. Disponible en: <http://goldbook.iupac.org/C01075.html>
27. Lindsay S. High performance liquid chromatography. Chichester: Wiley; 1998.
28. Reuhs BL. Food Analysis. 2017;213–26. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-45776-5>
29. Kumar A, Saini G, Nair A, Sharma R. Review UPLC : A Preeminent Technique in Pharmaceutical Analysis. 2012;69(3):371–80.
30. Kazakevich Y. Hplc for pharmaceutical scientists. John Wiley & Sons; 2017.
31. Bjarnholt N, Li B, D’Alvise J, Janfelt C. Mass spectrometry imaging of plant metabolites-principles and possibilities. Nat Prod Rep. 2014;31(6):818–37.
32. Dunham WH, Mullin M, Gingras AC. Affinity-purification coupled to mass spectrometry: Basic principles and strategies. Proteomics. 2012;12(10):1576–90.
33. Murayama C, Kimura Y, Setou M. Imaging mass spectrometry: Principle and application. Biophys Rev. 2009;1(3):131–9.

34. Finehout EJ, Lee KH. An introduction to mass spectrometry applications in biological research. *Biochem Mol Biol Educ*. 2004;32:93–100.
35. Ho CS, Lam CWK, Chan MHM, Cheung RCK, Law LK, Lit LCW, et al. *Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications*. 2003;24(February):3–12.
36. Stahnke H, Kittlaus S, Kempe G, Hemmerling C, Alder L. The influence of electrospray ion source design on matrix effects. *J Mass Spectrom*. 2012;47(7):875–84.
37. *Electrospray Ionisation –Instrumentation*. CHROMacademy [Internet]. 2010;1–18. Disponible en : [https://www.chromacademy.com/lms/sco31/Fundamental\\_LC-MS\\_Electrospray\\_Ionisation\\_Theory.pdf](https://www.chromacademy.com/lms/sco31/Fundamental_LC-MS_Electrospray_Ionisation_Theory.pdf)
38. Zubarev RA, Makarov A. Orbitrap mass spectrometry. *Anal Chem*. 2013;85(11):5288–96.
39. Orbitrap LC-MS | Thermo Fisher Scientific - PE [Internet]. Thermofisher.com. [citado 10 de Septiembre 2018]. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/pe/en/home/industrial/mass-spectrometry/liquid-chromatography-mass-spectrometry-lc-ms/lc-ms-systems/orbitrap-lc-ms.html>
40. Harper D, Birnbaum I, Chatfield C, Collins AJ. Introduction to Multivariate Analysis. Vol. 12, *Contemporary Sociology*. 1983. p. 433.
41. Esbensen KH, Geladi P. Principal component analysis: concept, geometrical interpretation, mathematical background, algorithms, history, practice. In: Brown SD, Tauler R, Walczak B, eds. *Comprehensive chemometrics*. Vol. 2. Oxford: Elsevier; 2009:211–226
42. Sarkar U, Sciences F, Datta S, Sciences F. *Principal Component Analysis*. 2017;(January).
43. Blasco H, Błaszczynski J, Billaut JC, Nadal-Desbarats L, Pradat PF, Devos D, et al. Comparative analysis of targeted metabolomics: Dominance-based rough set approach versus orthogonal partial least square-discriminant analysis. *J Biomed Inform*. 2015;53:291–9.
44. Worley B, Powers R. *Multivariate Analysis in Metabolomics*. *Curr Metabolomics* [Internet]. 2012;1(1):92–107. Disponible en: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=2213-235X&volume=1&issue=1&spage=92>

45. Wiklund S, Johansson E, Sjöström L, Mellerowicz EJ, Edlund U, Shockcor JP, et al. Visualization of GC/TOF-MS-based metabolomics data for identification of biochemically interesting compounds using OPLS class models. *Anal Chem.* 2008;80(1):115–22.
46. MS-DIAL [Internet]. Prime.psc.riken.jp. [citado 14 de Noviembre 2018]. Disponible en: [http://prime.psc.riken.jp/Metabolomics\\_Software/MS-DIAL/](http://prime.psc.riken.jp/Metabolomics_Software/MS-DIAL/)
47. Du X, Zeisel SH. Spectral Deconvolution for Gas Chromatography Mass Spectrometry-Based Metabolomics: Current Status and Future Perspectives. *Comput Struct Biotechnol J* [Internet]. 2013;4(5):e201301013. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2001037014600568>
48. Li L, Ren W, Kong H, Zhao C, Zhao X, Lin X, et al. An alignment algorithm for LC-MS-based metabolomics dataset assisted by MS/MS information. *Anal Chim Acta* [Internet]. 2017;990:96–102. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.07.058>.
49. Veselkov KA, Vingara LK, Masson P, Robinette SL, Want E, Li J V., et al. Optimized Preprocessing of Ultra-Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Urinary Metabolic Profiles for Improved Information Recovery. *Anal Chem* [Internet]. 2011 Aug;83(15):5864–72. Disponible en: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac201065j>
50. Mcclarren R. Computational nuclear engineering and radiological science using python. Joe Hayton; 2017.
51. Loess Local Regression -- from Wolfram MathWorld [Internet]. Mathworld.wolfram.com. 2019 [citado 10 de Octubre del 2019]. Disponible en: <http://mathworld.wolfram.com/LoessLocalRegression.html>
52. MS-FINDER [Internet]. Prime.psc.riken.jp. [citado 14 de Noviembre 2018]. Disponible en: [http://prime.psc.riken.jp/Metabolomics\\_Software/MS-FINDER/index.html](http://prime.psc.riken.jp/Metabolomics_Software/MS-FINDER/index.html)
53. SIMCA : Soft Independent Modeling of Class Analogy [Internet]. Camo.com. [citado 10 de Octubre del 2019]. Disponible en: <https://www.camo.com/resources/simca.html>
54. Barcelo D, Chormey D, Bakirdere S, Turan N, Engin G. *Data Analysis for Omic Sciences*. San Diego: Elsevier; 2018.
55. Vinaixa M, Schymanski EL, Neumann S, Navarro M. Trends in Analytical Chemistry Mass spectral databases for LC / MS- and GC / MS-based metabolomics :

- State of the field and future prospects. *Trends Anal Chem* [Internet]. 2016;78:23–35. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2015.09.005>
56. Wishart DS, Feunang YD, Marcu A, Guo AC, Liang K, Rosa V, et al. HMDB 4.0: The human metabolome database for 2018. 2018;46(March):608–17.
57. Dictionary of Natural Products 27.2 [Internet]. Dnp.chemnetbase.com. 2018 [citado 14 Octubre del 2018]. Disponible en: <http://dnp.chemnetbase.com/faces/chemical/ChemicalSearch.xhtml;jsessionid=11DA1F058813FC1D9BF4F9CF2707C967>
58. Bijttebier S, Van der Auwera A, Foubert K, Voorspoels S, Pieters L, Apers S. Bridging the gap between comprehensive extraction protocols in plant metabolomics studies and method validation. *Anal Chim Acta* [Internet]. 2016;935:136–50. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2016.06.047>.
59. Carrasco de Repo R. Determinación de la capacidad antioxidante y compuestos fenólicos de cereales andinos: Quinoa (*Chenopodium quinoa*), Kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*) y Kiwicha (*Amaranthus caudatus*). 2008;2:85–99.
60. Barbera G La, Capriotti AL, Cavaliere C, Montone CM, Piovesana S, Samperi R, et al. SC. *Food Res Int* [Internet]. 2017; Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2017.07.080>
61. Bianco G, Buchicchio A, Cataldi T. Structural characterization of major soyasaponins in traditional cultivars of Fagioli di Sarconi beans investigated by high-resolution tandem mass spectrometry. 2015;6381–9.
62. Chang Y, Zhao C, Wu Z, Jia Z, Sumin Z, Xin L, et al. Chip-based nanoflow high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry for profiling of soybean flavonoids. 2012;2399–406.
63. Dinelli G, Segura-carretero A, Di R, Marotti I, Arráez-román D, Benedettelli S, et al. Profiles of phenolic compounds in modern and old common wheat varieties determined by liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry. *J Chromatogr A* [Internet]. 2011;1218(42):7670–81. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2011.05.065>
64. Abu-reidah IM, Contreras M, Arr D, Fern A, Segura-carretero A. UHPLC-ESI-QTOF-MS-based metabolic profiling of *Vicia faba* L. (Fabaceae) seeds as a key strategy for characterization in foodomics. 2014;1571–81.

65. Righetti L, Rubert J, Galaverna G, Folloni S, Ranieri R, Stranska-zachariasova M, et al. Characterization and Discrimination of Ancient Grains : A Metabolomics Approach. 2016;1–14.
66. Crustecdysone [Internet]. Pubchem. [citado 26 de Noviembre, 2018]. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6708786#section=Top>
67. Ferrari G. Process for the preparation of polyhydroxylated steroids, lysergol and ergolinic alkaloids. Google Patents; 1980.
68. Zhou XR, Singh S, Liu Q, Green A. Combined transgenic expression of  $\Delta 12$ -desaturase and  $\Delta 12$ -epoxygenase in high linoleic acid seeds leads to increased accumulation of vernolic acid. *Funct Plant Biol.* 2006;33(6):585–92.
69. Makisterone B [Internet]. Pubchem. [citado 26 de Noviembre, 2018]. Disponible en: [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Makisterone\\_B#section=Top](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Makisterone_B#section=Top)
70. Dinan L. Phytoecdysteroids: Biological aspects. *Phytochemistry.* 2001;57(3):325–39.
71. 9,12,13-TriHOME [Internet]. Pubchem. [citado 26 de Noviembre, 2018]. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/9858729#section=Top>
72. Oueslati MH, Jannet H Ben, Mighri Z, Chriaa J, Abreu PM. Phytochemical constituents from *Salsola tetrandra*. *J Nat Prod.* 2006;69(9):1366–9.
73. Hostetler GL, Ralston RA, Schwartz SJ. Flavones : Food Sources, Bioavailability, 2017;423–35.
74. Human Metabolome Database: Showing metabocard for Floionolic acid (HMDB0034295) [Internet]. Hmdb.ca. 2019 [citado 26 de Noviembre, 2018]. Disponible en: <http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB0034295>
75. Oxipurinol [Internet]. Pubchem. [citado 26 de Noviembre, 2018]. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Oxypurinol>
76. Xantosina [Internet]. Pubchem. [citado 26 de Noviembre, 2018]. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/xanthosine>
77. Hiroshi A. Biosynthetic Pathways of Purine and Pyridine Alkaloids in Coffe Plants. 2016,11(7):1047-1054.
78. Riaz M, Saleem A, Siddique S, Khan BA, Nur-e-alam M, Shahzad-ul-hussan S, et al. Phytochemistry of *Daphne oleoides*. 2015;6419(Noviembre).

79. N-Acetiltriptófano [Internet]. Pubchem. [citado 26 de Noviembre, 2018]. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/N-Acetyl-DL-tryptophan#section=Top>
80. Torskangerpoll K, Nørbæk R, Nodland E, Øvstedal DO, Andersen ØM. Anthocyanin content of Tulipa species and cultivars and its impact on tepal colours. *Biochem Syst Ecol.* 2005;33(5):499–510.
81. Khoo HE, Azlan A, Tang ST, Lim SM. Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food Nutr Res* [Internet]. 2017;61(1):1361779. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/16546628.2017.1361779>
82. Wollenweber E. 2',5'-Dihydroxyflavone and its 5'-Acetate — Novel Compounds from the Farinose Exudate of Primula. 1988;305–7.
83. Sinapoyltyramine [Internet]. Pubchem. [citado 27 de Noviembre, 2018]. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/25245053#section=Top>
84. Alam MA, Subhan N, Hossain H, Hossain M, Reza HM, Rahman MM, et al. Hydroxycinnamic acid derivatives: A potential class of natural compounds for the management of lipid metabolism and obesity. *Nutr Metab* [Internet]. 2016;13(1):1–13. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1186/s12986-016-0080-3>
85. Tang GH, Chen DM, Qiu BY, Sheng L, Wang YH, Hu GW, et al. Cytotoxic amide alkaloids from piper boehmeriaefolium. *J Nat Prod.* 2011;74(1):45–9.
86. Chang Y. Alkaloids from *Lindera glauca*. 2001;94(5):811–5.
87. Isorhamnetin 3-glucoside | C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>O<sub>12</sub> | ChemSpider [Internet]. Chemspider. [citado 27 de Noviembre 2018]. Disponible en: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.4477169.html>
88. Kandakumar | Dr V Manju. Pharmacological Applications of Isorhamnetin: A Short Review. *Int J Trend Sci Res Dev* [Internet]. 2017;1(4). Disponible en: <http://www.ijtsrd.com/papers/ijtsrd2202.pdf%0Ahttp://www.ijtsrd.com/biological-science/biochemistry/2202/pharmacological-applications-of-isorhamnetin-a-short-review/s-kandakumar>
89. Gluconato [Internet]. Pubchem. [citado 27 de Noviembre, 2018]. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/gluconate>

90. Costa A, Forte A, Zalewska K, Tiago G, Petrovski Z, Branco LC. Novel biocompatible ionic liquids based on gluconate anion. *Green Chem Lett Rev* [Internet]. 2015;8(1):8–12. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1080/17518253.2014.951695>
91. Human Metabolome Database: Showing metabocard for L-N-(1H-Indol-3-ylacetyl)aspartic acid (HMDB0038666) [Internet]. Hmdb.ca. 2019 [citado 27 de Noviembre, 2018]. Disponible en: <http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB0034295>
92. Li C, Nitka M V, Gloer JB. *Fungus Annulatuscus triseptatus*. 2003;1302–6.
93. Saleem AH, Zengin G, Ahmad I, Tan J, Lee B, Htar TT, et al. Multidirectional insights into the biochemical and toxicological properties of *Bougainvillea glabra* (Choisy.) aerial parts: A functional approach for bioactive compounds. *J Pharm Biomed Anal* [Internet]. 2019; Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.03.027>
94. Saleem H, Htar TT, Naidu R, Nawawi NS, Ashraf M, Ahemad N. Biological, chemical and toxicological perspectives on aerial and roots of *Filago germanica* (L.) huds: Functional approaches for novel phyto-pharmaceuticals. *Food Chem Toxicol* [Internet]. 2018; Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.11.016>
95. Isorhamnetin-3-O-rutinoside [Internet]. Extrasynthese. [citado 27 de Noviembre, 2018]. Disponible en: <https://www.extrasynthese.com/isorhamnetin-3-o-rutinoside.html>

## VIII. ANEXOS

### ANEXO 1



Figura 1: Semillas de kañiwa plomo clara “Chilliwa” (A) y kañiwa roja “Ramis” (B)

## ANEXO 2

