

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA



Correlación estadística entre Resonancia Magnética Nuclear y otras técnicas espectroscópicas en el análisis metabólico

TRABAJO DE INVESTIGACION PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO DE BACHILLER EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN QUÍMICA

AUTORA

Heldy Lorelyn Vasquez Limaco

ASESORA:

Helena Maruenda Castillo

Lima, setiembre 2022

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN	1
CAPÍTULO 1: LA METABOLÓMICA	2
1.1. Aplicaciones de la metabolómica en las ciencias de los alimentos	9
1.2. Aplicaciones de la metabolómica en las ciencias de la salud	13
CAPÍTULO 2: ESTRATEGIAS EN EL ANALISIS METABOLÓMICO	15
2.1. Estudio metabolómico dirigido	17
2.2. Estudio metabolómico no dirigido	21
2.3. Estudio metabolómico semi- dirigido	25
CAPÍTULO 3: QUIMIOMETRÍA EN ESTUDIOS METABOLÓMICOS	30
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	42
ANEXO	43
REFERENCIAS	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática del proceso de análisis metabolómico. Figura adaptada de la referencia 8.....	3
Figura 2. Espectro de ¹ H-RMN ampliado en el rango de 5 a 10 ppm de un extracto de café. La muestra liofilizada (60 mg) con 100 mM de buffer de oxalato (pH 4) fue redisuelta con 1 mL de D ₂ O con 100 uL de TSP-D ₂ O a 3Mm. Figura adaptada de la Tesis de V. Leyva-PUCP. ¹⁴	5
Figura 3. Estrategia de trabajo seguida en análisis metabolómico basado en RMN supervisado y no supervisado. Figura tomada de la referencia 16.....	7
Figura 4. Tratamiento de datos detallado para el análisis de PCA. Figura adaptada de la página web: https://www.sartorius.com/	8
Figura 5. Representación esquemática de las tres aplicaciones más comunes de la metabolómica en las ciencias de los alimentos.....	10
Figura 6. Gráficos de puntuación de cafés tostados. A) Análisis de puntuación por regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS). B) Análisis de componentes principales (PCA), los puntos de color gris claro indican 100% Arábica, mientras que los puntos negros representan 100% Robusta. Figuras tomadas de la referencia 25.....	11
Figura 7. Diferencias metabólicas de los metabolitos del té en áreas de cultivo diferentes: el té blanco (Korea AP) y oolong (China), representadas mediante el gráfico del coeficiente OPLS-DA. Las muestras liofilizadas de té se disolvieron en 540 μL de agua deuterada y 60 μL de 0.5 mM de sal sódica del ácido 3-(trimetilsilil)-[2,2,3,3d ₄]-propiónico (TSP) en agua destilada. Figura tomada de la referencia 26.....	12
Figura 8. Tecnologías basadas en RMN y MS utilizadas para metabolómica. Figura adaptada de las referencias 19, 31.	15
Figura 9. Esquema general de estrategias a seguir en estudios de metabolómica cuantitativa. Figura adaptada de las referencias 1,3,5.....	17
Figura 10. (A) Análisis de componentes principales y (B) análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) de los espectros de RMN de ¹ H de especies de vainilla. Cinco muestras independientes (n=5) por especie de vainilla fueron analizadas. Figura tomada de la referencia 7.	23
Figura 11. Flujo de trabajo para el análisis metabolómico no dirigido por MS. Figura adaptada de la referencia 40.....	25
Figura 12. Espectros ¹ H-RMN de extractos de arándano, verde (azul) y maduro (verde) y arándano rojo (rojo). (L) se refiere a los compuestos detectados a partir de las muestras de arándano rojo y (B) a las de arándano. Ácido clorogénico (6), catequina (7), epicatequina (10), 2-O-cafeoil arbutina (14), quercetina-3-O-glucósido (20), quercetina-3-O-glucurónido (21), derivados de p-cumaroil y cafeoil-glucósido (25, 33, 35) y β-p-arbutina (37). Figura tomada de la referencia 46.	27
Figura 13. Mapa de calor de varios compuestos críticos responsables de la clasificación de diferentes tiempos de almacenamiento de muestras de KBT. Figura tomada de la referencia 48.....	29
Figura 14. Árbol genealógico de espectroscopia de correlación estadística. Figura tomada de la referencia 52.....	30
Figura 15. Espectroscopía estadística de correlación total (STOCSY): (A) gráficos de correlación/covarianza STOCSY unidimensionales (1D) y (B) bidimensionales (2D) de un conjunto de datos de RMN en orina. Figura tomada de la referencia 52.....	33
Figura 16. Gráfica Het-STOCSY unidimensional generada a partir de espectros de RMN de ³¹ P- ¹ H} y ¹ H CPMG de todas las muestras: (A) la correlación de la resonancia de RMN de ³¹ P de PC con ascorbato y glutatión; (B) una expansión de los espectros ³¹ P- ¹ H} MAS NMR que muestra los picos conductores y su correlación con PC y PE; y (C) la correlación de la resonancia de RMN de ³¹ P con señales de ¹ H de taurina y fosforiletanolamina (PE). Figura adaptada de la referencia 55.....	35

Figura 17. Gráficas de correlación Het-STOCSY bidimensionales derivadas de espectros de RMN de ^{31}P - $\{^1\text{H}\}$ y ^1H CPMG MAS de colon transverso. Figura adaptada de la referencia 55. **36**

Figura 18. Correlación RMN-MS para muestras de orina de ratones (A) control y (B) asociados a una dosis alta de hidracina. N-metilnicotinamida (NMND), ácido N-metil nicotínico (NMNA). Figura adaptada de la referencia 57. **39**

Figura 19. Diagrama esquemático de los resultados del análisis de correlación entre las señales NIR (panel superior) y RMN (panel de la derecha). Figura tomada de la referencia 59. **41**



LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Estudios basados en RMN y MS de biofluidos humanos asociados a diferentes dietas.	14
Tabla 2. Comparación de diferentes tecnologías metabolómicas, RMN y MS. Tabla adaptada de las referencias 3,16 y 32.	16
Tabla 3. Número de metabolitos identificados según plataforma analítica. Tabla adaptada de la referencia 17.	18
Tabla 4. Tiempo de retención, transiciones MS y concentración de plaguicidas identificados en las muestras de vino chipriota. Tabla obtenida a partir de datos de la referencia 41.	20
Tabla 5. Los principales experimentos de correlación de RMN. Tabla adaptada de la referencia 44.	22
Tabla 6. Señales de RMN de ^1H y ^{13}C asignadas para los metabolitos diferenciadores en extractos metanólicos de cuatro especies de vainilla. Tabla adaptada de la referencia 7.	24
Tabla 7. Análisis MS/MS utilizado como referencia en la identificación de los biomarcadores asociados a la toxicidad de la hidracina en muestras de orina. Tabla adaptada de la referencia 57.	37

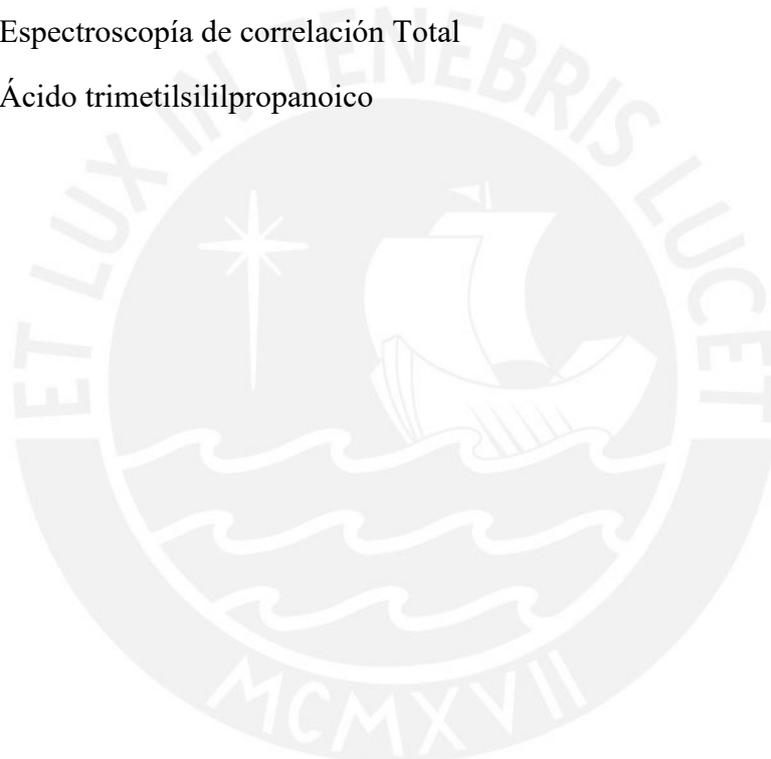


LISTA DE ABREVIATURAS¹

ANOVA	Análisis de la varianza
CE	Electroforésis capilar
COSY	Espectroscopía de RMN de correlación homonuclear
DOPY	Espectroscopía de RMN de proyección ordenada por difusión
DOSY	Espectroscopía de RMN de difusión
EC	Epicatequina
EGC	Epigallocatequina
EGCG	Epigallocatequina-3-galato
ESI	Ionización por electrospray
GC	Cromatografía de gases
Het-STOCSY	Espectroscopía de correlación total estadística Heteronuclear
HILIC	Columna cromatográfica de interacción hidrofílica
HPLC-DAD	Cromatografía líquida de alta definición acoplada a un detector de diodos
HR-MAS	Espectroscopía de RMN de estado sólido con giro de ángulo mágico.
HSQC	Espectroscopía de RMN de correlación heteronuclear a través de un enlace
K-STOCSY	Espectroscopía de RMN de correlación total estadística Cinética
LC-MS/MS	Cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas tandem
MCF	Cloroformiato de metilo
MRM	Monitoreo de reacción múltiple
NMNA	Ácido <i>N</i> - metil nicotínico
NMND	<i>N</i> -metilnicotinamida
OPLS-DA	Análisis discriminante de mínimos cuadrados ortogonales parciales
O-STOCSY	Espectroscopía de correlación total estadística ortogonal
PC	Componente Principal
PCA	Análisis de Componentes Principales
PLS-DA	Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales
PRM	Monitoreo de reacción en paralelo

¹ La mayor parte de estas abreviaturas corresponde a sus siglas en inglés.

RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RP	Columna cromatográfica de fase reversa
R-STOCSY	Espectroscopia de correlación total estadística Reconectado
SHY	Heteroespectroscopía estadística
SRM	Monitorización de reacción seleccionada
SRORSY	Espectroscopia de regresión total estadística
STAMSY	Espectrometría de masas de correlación total estadística
STOCSY	Espectroscopia de correlación total estadística
STORM	Optimización de subconjuntos por comparación con estándares de referencia
TOCSY	Espectroscopía de correlación Total
TSP	Ácido trimetilsililpropanoico



¹ La mayor parte de estas abreviaturas corresponde a sus siglas en inglés.

RESUMEN

La metabolómica es el análisis completo de todos los metabolitos presentes en un sistema biológico. Su aplicación en el área de las ciencias y tecnologías de alimentos ha permitido abordar la calidad, la autenticidad y la denominación de origen de diversos productos, así como también identificar metabolitos asociados con las propiedades organolépticas, nutritivas o nocivas de un alimento.

El análisis de mezclas en estudios de metabolómica se centra en el uso de metodologías basadas en la espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y la espectrometría de Masas (MS), esta última de modo directo o acoplada a diversos sistemas cromatográficos. El uso de estas metodologías dependerá en muchos casos del tipo de análisis químico-analítico que la muestra requiera, resaltando entre ellas el estudio dirigido, no dirigido o semi- dirigido.

En este trabajo de investigación se presentarán varios ejemplos de estudios de este tipo, haciendo uso de la RMN y otras técnicas espectroscópicas y espectrométricas para el análisis de mezclas complejas. También, se abordará la correlación estadística total (STOCSY) y heteroespectroscópica (SHY) y se presentarán algunos ejemplos de su potencialidad en la identificación de metabolitos en muestras biológicas de importancia en las ciencias de los alimentos y ciencias de la salud.

CAPÍTULO 1: LA METABOLÓMICA

La metabolómica es un campo emergente en el área de las ciencias “ómicas” que se centra en el análisis completo y cuantitativo de moléculas pequeñas - peso molecular <1500 Da presentes en un sistema biológico¹ con la finalidad de identificar cambios en el metabolismo de un organismo bajo condiciones diversas, enfermedad, estrés del medio ambiente, manipulación genética, toxicidad y terapia química, entre otros.² Ello es posible pues el metaboloma es un reflejo de las rutas bioquímicas propias de cada sistema biológico y por lo tanto brinda información clave de este.³⁻⁵ Todo estudio de metabolómica involucra una serie de pasos, resumidos en la Figura 1, los cuales dependen del tipo de plataforma analítica a utilizar y del tipo de muestra a estudiar.

La recolección y la preparación de la muestra, así como la extracción, son todos procesos claves en investigaciones de este tipo. La preparación dependerá de si se trata de una muestra sólida, como partes de una planta y alimentos, entre otros, o de muestras líquidas, como jugos u otros consumibles líquidos o fluidos biológicos, como sangre y esputo, entre otros. Por lo general, el material sólido se liofiliza y se extrae el material seco con el solvente adecuado, mientras que el material líquido se diluye directamente para el análisis.^{6,7} La extracción dependerá en gran parte de la técnica a utilizar para el análisis químico y de la naturaleza del estudio. En el caso de un estudio dirigido, en donde se busca extraer ciertos metabolitos en particular, se utilizan los solventes que maximicen la extracción de este tipo de compuestos y, en caso de un estudio no dirigido, en donde se desea analizar el metaboloma completo, el solvente a utilizar deberá garantizar la extracción de la mayor cantidad de metabolitos a la vez.

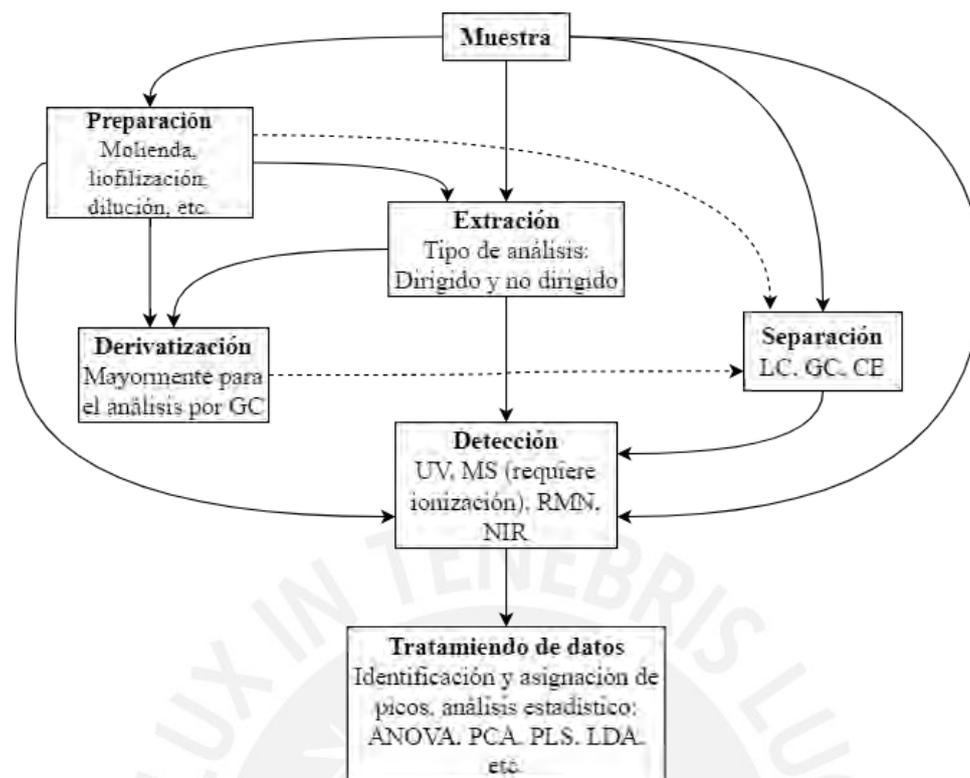


Figura 1. Representación esquemática del proceso de análisis metabolómico. Figura adaptada de la referencia 8.

Entre las técnicas analíticas más utilizadas para la caracterización del metaboloma se encuentran la espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN), espectroscopía que jugó un rol vital desde el inicio de la metabolómica,⁹ y la espectrometría de Masas (MS). Esta última, acoplada a la cromatografía líquida, LC-MS, o de gases, GC-MS, con analizadores de masas cada vez más sofisticados y sensibles, permiten hoy en día la detección y cuantificación de cientos de metabolitos dentro de mezclas complejas obtenidas de organismos vivos, como plantas, animales, humanos y microorganismos.¹⁰

El metaboloma puede estar conformado tanto por metabolitos de naturaleza hidrofílica como hidrofóbica. Por lo general, en metabolómica basada en RMN los metabolitos hidrofílicos o medianamente polares son extraídos empleando metanol, agua o una mezcla de ambos en distintas proporciones.¹¹ En estas preparaciones se mantiene el pH constante con un buffer adecuado,⁸ comúnmente 200 mM de oxalato de potasio (pH=4)⁷ o fosfato de potasio (pH=

7.4).¹² Típicamente, el estándar utilizado como referencia para la cuantificación es el ácido 3-(trimetilsilil)-propanoico-d₄ (TSP- d₄). En el análisis por RMN también se ha reportado el uso de mezclas de solventes orgánicos para ampliar la gama de metabolitos hidrofóbicos extraídos.¹³

El análisis de metabolitos hidrofóbicos, o menos polares, requiere una extracción con solventes orgánicos de baja polaridad (hexano y diclorometano, entre otros), y las plataformas analíticas más utilizadas para este tipo de compuestos son la cromatografía líquida o de gases acoplada a MS (CG-MS, HPLC-MS). En este tipo de técnicas, la muestra extraída se diluye y se le añaden los estándares de referencia para la cuantificación. El paso de derivatización química señalada en la Figura 1, es a veces necesario, por ejemplo, para el análisis de ácidos grasos o aminoácidos mediante GC-MS, compuestos muy polares que se separan mejor como ésteres.¹¹

En el caso de la espectrometría de MS, la detección de cada metabolito se realiza uno a uno a medida que son eluidos de la columna. La intensidad de la señal detectada por MS depende de la capacidad de ionización de cada metabolito y no solo de su concentración, detalle que complica en cierta forma la cuantificación mediante esta técnica analítica. Por el contrario, la detección en técnicas como la RMN que se realiza en simultáneo permite la cuantificación directa de todos los metabolitos presentes. Si bien los espectros de RMN son complejos y con frecuencia muchas de las señales se solapan entre sí, el área debajo de cada una de las señales es proporcional a la concentración de cada metabolito. En la Figura 2 se muestra el espectro RMN de hidrógeno (¹H-RMN) de un extracto de café, en donde se observa que, una vez identificadas las señales con el metabolito, sin la necesidad de recurrir a una separación cromatográfica se pudo evaluar la calidad de distintos tipos de café a partir de la concentración de los biomarcadores asociados al tipo de grado de tostado.¹⁴

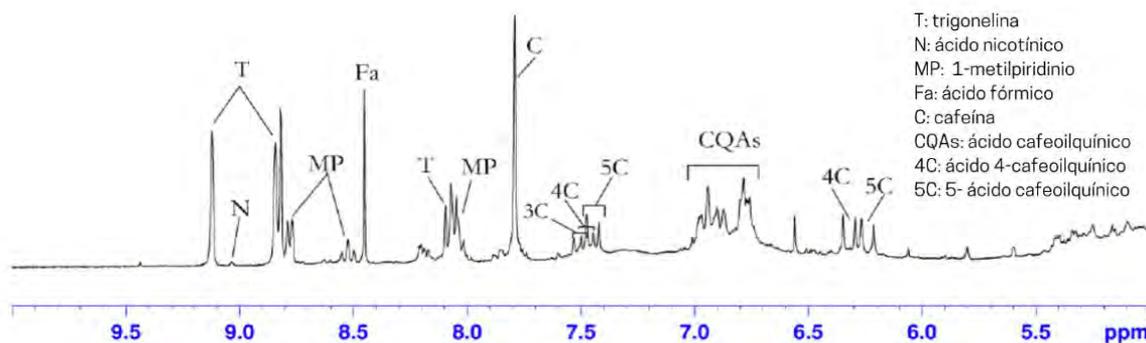


Figura 2. Espectro de ^1H -RMN ampliado en el rango de 5 a 10 ppm de un extracto de café. La muestra liofilizada (60 mg) con 100 mM de buffer de oxalato (pH 4) fue redisuelta con 1 mL de D_2O con 100 μL de TSP- D_2O a 3Mm. Figura adaptada de la Tesis de V. Leyva-PUCP.¹⁴

El tratamiento estadístico de datos es otra de las etapas fundamentales en estudios de metabolómica, pues la gran cantidad de datos que se obtienen es alta y se requiere del uso de programas informáticos adecuados, basados principalmente en el cálculo de la varianza y de la covarianza.

La varianza es una medición de la dispersión de cada variable con respecto a su medida:

$$\text{var}(X) = \frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})(X_i - \bar{X})}{n - 1} \quad \text{Ecuación 1}$$

y la covarianza, es una medición de la variación de una variable, con respecto a su media y con respecto a la variación de otra variable, con respecto a su propia media:

$$\text{cov}(X, Y) = \frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})}{n - 1} \quad \text{Ecuación 2}$$

Un valor positivo de covarianza significa que ambas dimensiones aumentan o disminuyen juntas, un valor negativo indica un comportamiento opuesto entre ellas, es decir la medida de una variable aumenta mientras que la otra disminuye, y una covarianza igual a cero indica que las dos dimensiones varían de forma independiente, es decir, no se encuentran correlacionadas.

La Figura 3, presentada por Vignoli et. al. (2019), resume la estrategia que generalmente se emplea en un análisis metabolómico basado en RMN. En ésta se muestra el tratamiento más simple, análisis univariable, el cual determina la variación de una sola variable (en este caso concentración de un analito) entre todos los distintos grupos evaluados o, también, determina la correlación (positiva en rojo; negativa en azul, Figura 3), de cada una de las variables frente a todas las otras, una a una, para lo cual se emplean generalmente regresiones univariadas, cálculos del coeficiente de correlación de Pearson y/o comparaciones de las varianzas entre las medias por el test de ANOVA (Análisis de la Varianza).

Un análisis multivariable, en cambio, también ilustrado en la Figura 3 (métodos no supervisado y supervisado), es un proceso más complejo en donde se evalúa los cambios de todas las variables entre todos los diferentes grupos a la vez con la finalidad de identificar diferencias entre ellas. Para este tipo de análisis multivariable, es necesario que todos los espectros obtenidos tengan que ser agrupados, alineados y transformados en matrices de datos recopilados que contienen N filas (casos) con K columnas (variables o dimensiones).^{15,16} En esta matriz cada espectro u observación está definido como un punto en un espacio donde cada variable es un eje ortogonal. Para reducir la dimensionalidad de los datos y obtener información relevante sobre la agrupación y/o discriminación entre las muestras, se aplican diferentes métodos estadísticos, mayormente el Análisis de Componentes Principales (PCA, por sus siglas en inglés) no supervisado (Figura 3) y el Análisis Discriminante de Mínimos Cuadrados Parciales (PLS-DA, por sus siglas en inglés),¹⁵ análisis supervisado en donde se incluye información del grupo al que las muestras pertenecen (Figura 3). Estos métodos de análisis multivariable realizan una transformación lineal de las variables originales y construyen un nuevo set de ejes ortogonales llamados componentes principales (PC) en el caso de PCA o variables latentes (LV) en el caso de PLS. El nuevo espacio es construido de manera que la primera componente principal (PC1) corresponda a un eje en la dirección que maximiza la

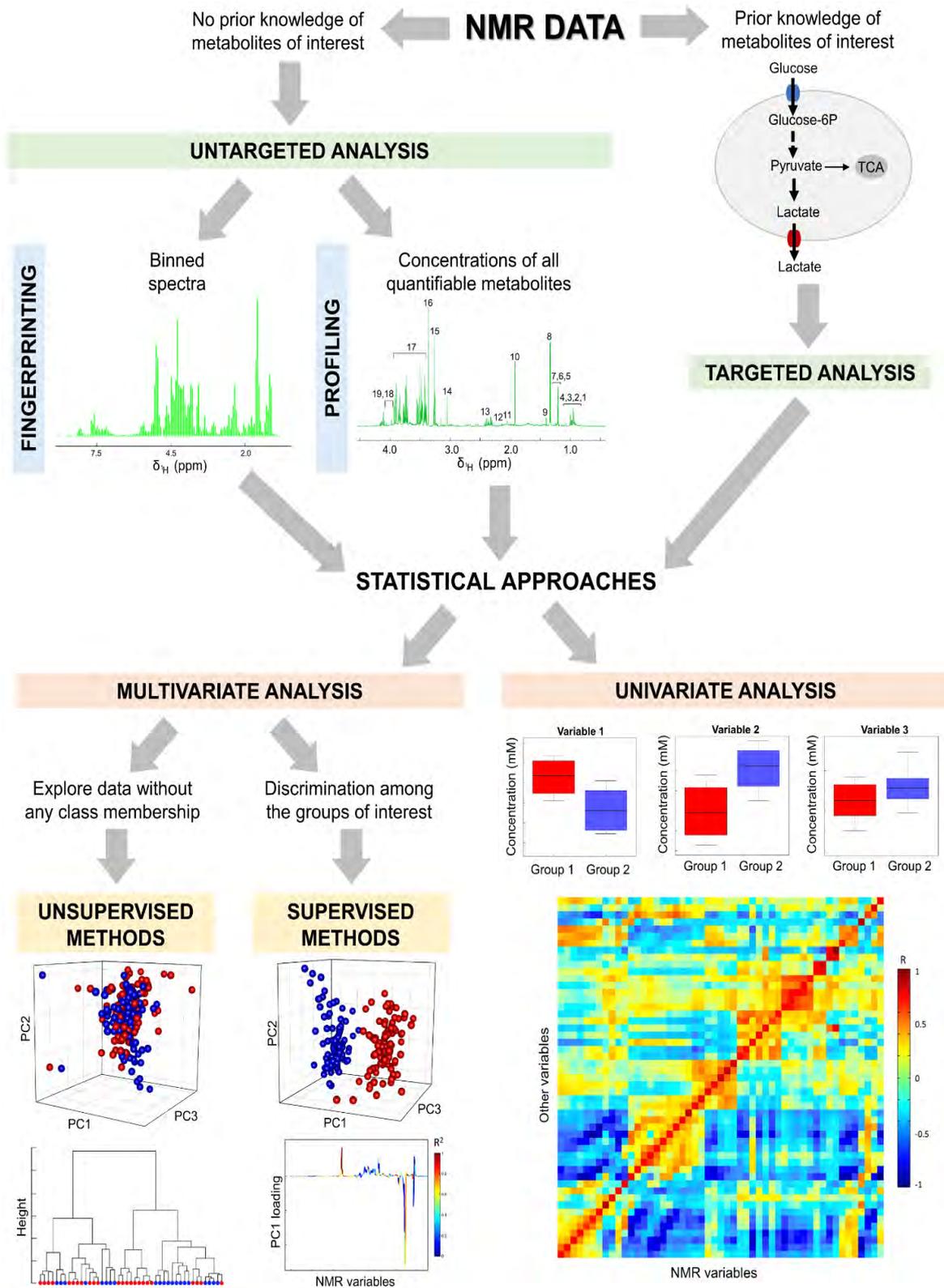


Figura 3. Estrategia de trabajo seguida en análisis metabolómico basado en RMN supervisado y no supervisado. Figura tomada de la referencia 16.

varianza de las proyecciones de cada una de las observaciones sobre dicho eje. La segunda componente principal (PC2) corresponde a un eje ortogonal a PC1 que maximiza la varianza restante de las observaciones sobre el eje PC2. Las subsiguientes componentes principales serán construidas de la misma manera hasta completar el espacio. Por consiguiente, las primeras componentes principales constituyen la mejor representación de los datos en una menor dimensión.

En la Figura 4 se ilustra el proceso con tres variables, ejes X_1 , X_2 y X_3 , información que después del tratamiento queda plasmada en dos ejes principales, PC1 y PC2.

Por otro lado, PLS-DA es un método de regresión lineal multivariable en el cual se genera un nuevo eje coordenado donde el primer eje (LV1) o primera variable latente maximiza la covarianza entre las observaciones (input) y los resultados (output). La segunda variable latente

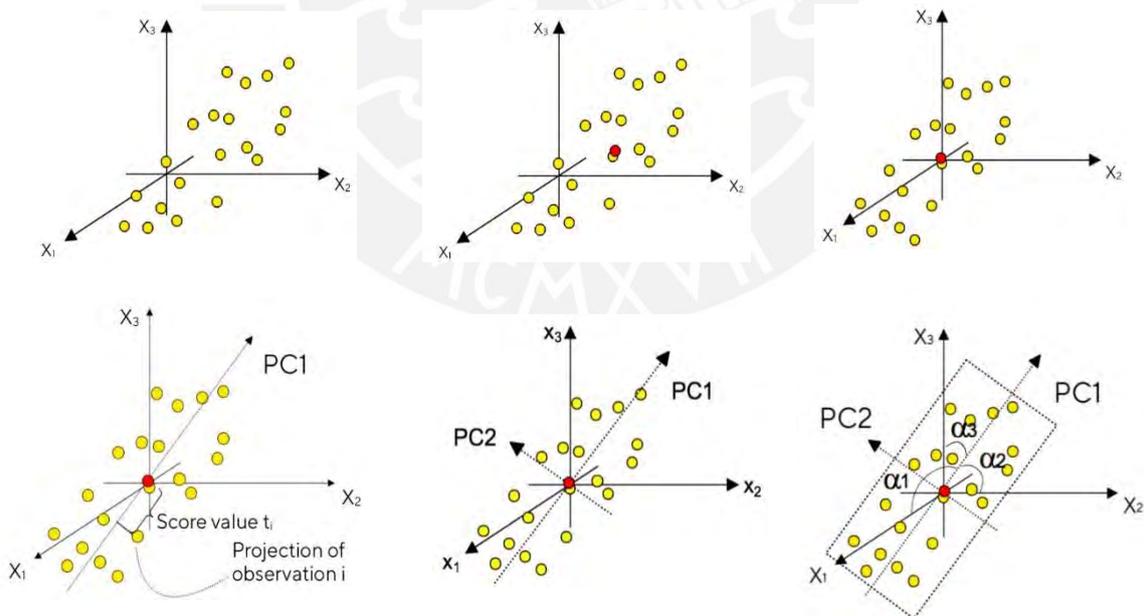


Figura 4. Tratamiento de datos detallado para el análisis de PCA. Figura adaptada de la página web: <https://www.sartorius.com/>

(LV2) será el eje ortogonal a LV1 que maximiza la covarianza restante entre las observaciones y los resultados.¹⁵ Los subsiguientes ejes o variables latentes serán construidas del mismo modo hasta completar el espacio. Por consiguiente, las primeras variables latentes constituyen la representación de los datos en una menor dimensión, en la cual se obtiene la mayor correlación entre las observaciones y los resultados.

Actualmente, los estudios de metabolómica han sido ampliamente utilizados en varias áreas dentro de las ciencias de la salud y las ciencias de los alimentos, entre otros,^{3,17} incluyendo las ciencias forenses.¹⁸ En el caso particular de las ciencias de los alimentos, la metabolómica se ha centrado en el análisis de control de calidad del alimento, la identificación de biomarcadores, propiedades organolépticas y nutricionales, así como también en la seguridad alimentaria, área en la que resaltan estudios para garantizar la inocuidad de un alimento, la detección de la presencia de patógenos o contaminantes, y la evaluación de la adulteración del producto alimenticio o de los riesgos del consumo de alimentos genéticamente modificados.^{8,19}

1.1. Aplicaciones de la metabolómica en las ciencias de los alimentos

El estudio de la metabolómica en el área de alimentos ha incrementado paulatinamente a lo largo de los años, debido a que están directamente relacionados con la nutrición y la salud humana. Actualmente, esta área se conoce como metabolómica de los alimentos y cubre muchos ámbitos vinculados no solo a los recursos alimenticios (condiciones de cultivo, calidad del producto, propiedades, etc.), sino también como apoyo en el análisis de procesos (control de calidad, mejoramiento de protocolos, ausencia de contaminantes) y en la evaluación del efecto en el ser humano tras la ingesta del alimento, entre otras aplicaciones (Figura 5).²⁰

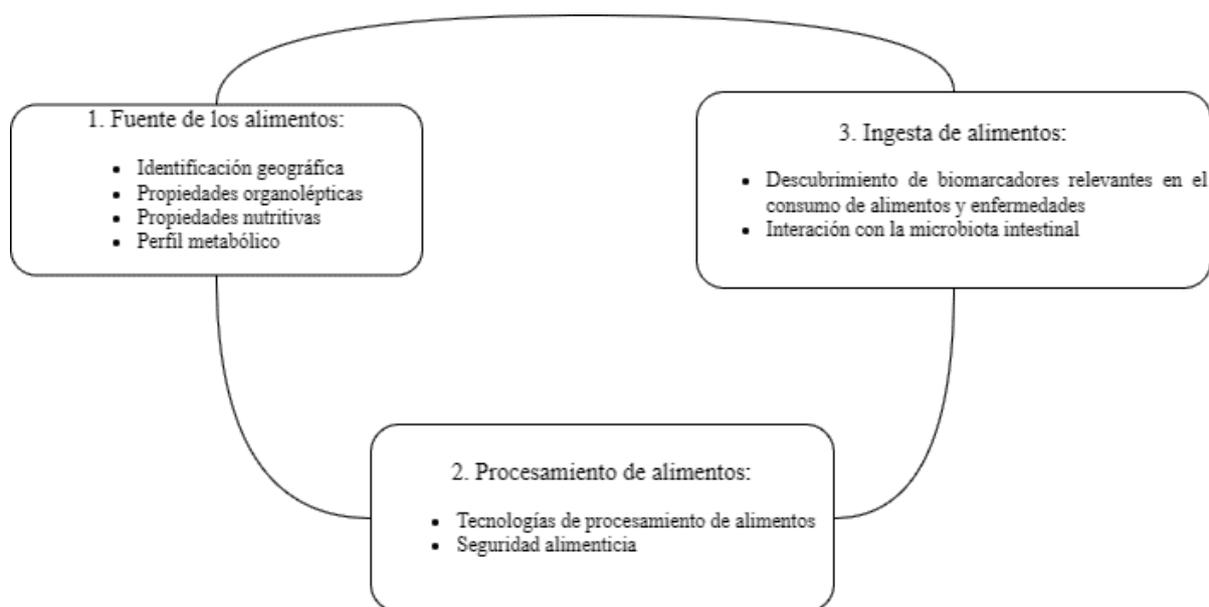


Figura 5. Representación esquemática de las tres aplicaciones más comunes de la metabolómica en las ciencias de los alimentos.

Tradicionalmente, el análisis de los alimentos se basaban en la identificación y clasificación de compuestos generales, tales como proteínas, grasas, carbohidratos, fibras, vitaminas, oligoelementos, sólidos y/o cenizas.²¹ Actualmente, sin embargo, los estudios no solo se basan en el análisis puntual de los compuestos químicos presentes, sino en la evaluación de características diversas como calidad, propiedades organolépticas, nutritivas y de autenticidad, entre muchos otros aspectos de interés, a través del perfil metabólico del alimento.

El estudio de la fuente del alimento en la metabolómica es útil y eficaz para la determinación de la autenticidad, trazabilidad y calidad de estos, pues la constitución química de la materia prima plasmada en el perfil metabólico del producto, se encuentra asociada con factores ambientales, como el origen geográfico,²² el clima²³ y factores genéticos,²⁴ determinados por la especie y la variedad de la planta.

Un buen ejemplo es la implementación a nivel nacional, en Colombia, de una metodología metabolómica basada en RMN para la protección de la autenticidad del café colombiano de

calidad de exportación.²⁵ Mediante el análisis del perfil metabólico basado en RMN de protón (¹H-RMN) del extracto de café se validó un modelo que permite clasificar y discriminar muestras de granos de café colombiano frente a muestras de café de otros países, como Indonesia, Vietnam, Camerún, China, Uganda, México, Perú y Brasil (Figura 6A) haciendo uso de análisis multivariable. Dicha metodología también permitió discriminar el café según especie, *C. arábica* versus *C. robusta*. En la Figura 6B, los países con café 100% robusta se encuentran representados por los puntos negros (Vietnam, Guatemala y México), mientras que las zonas de puntos grises claro representan a las muestras de café provenientes de países como Perú, Brasil y Colombia, con café netamente 100% arábica. En este estudio, todas las muestras del café, un total de 192, proveniente de más de 24 países, fueron tostadas en las mismas condiciones y extraídas siguiendo el mismo protocolo, con la finalidad de garantizar que la variación observada se encuentre vinculada solo con el origen de la muestra y no con su procesamiento.

Otro ejemplo es el té, *Camellia sinensis*, producto en el cual la calidad del sabor y del aroma también se ve determinada por la ubicación geográfica del cultivo, el clima y las prácticas

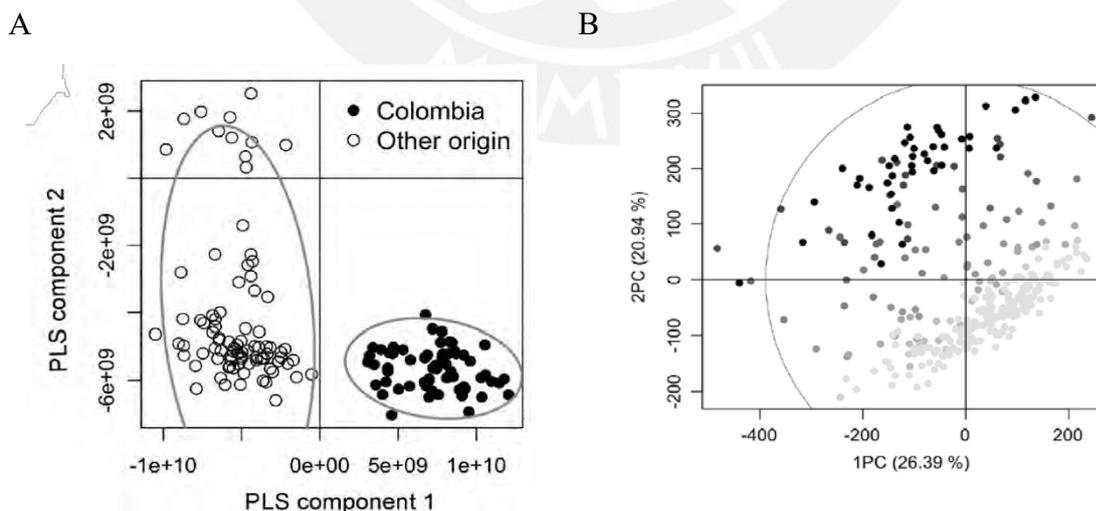
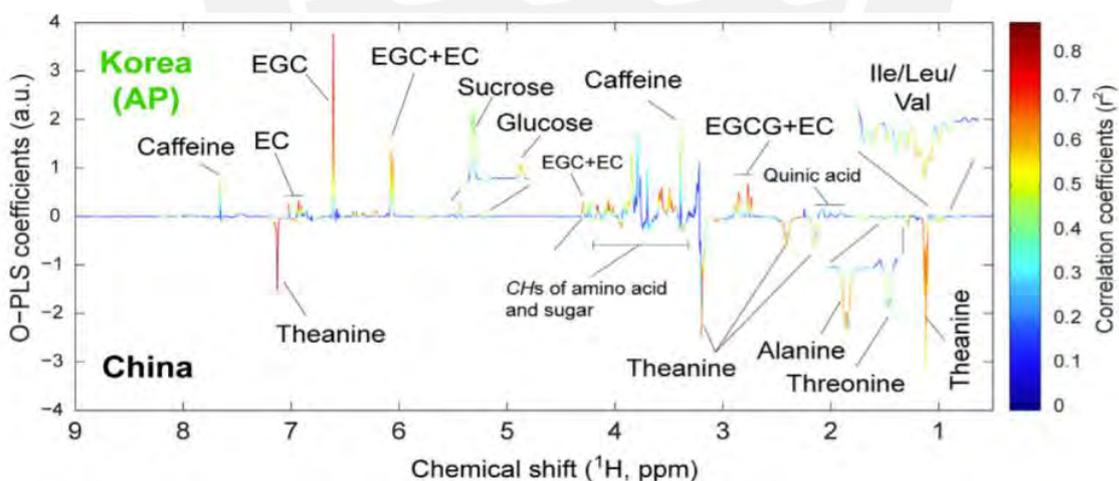


Figura 6. Gráficos de puntuación de cafés tostados. A) Análisis de puntuación por regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS). B) Análisis de componentes principales (PCA), los puntos de color gris claro indican 100% Arábica, mientras que los puntos negros representan 100% Robusta. Figuras tomadas de la referencia 25.

culturales en la elaboración (té verde y blanco).²⁶ Mediante un análisis metabolómico por RMN, se identificaron diferencias entre las muestras de té colectadas en Corea del Sur, Japón y China. Las muestras provenientes de Corea, un total de 129, mostraron niveles altos de isoleucina, leucina, valina, EC (epicatequina), EGC (epigallocatequina), cafeína, sacarosa y glucosa. En cambio, el té de China (número total de 39 muestras analizadas) mostró niveles bajos de teanina, alanina y treonina. Las muestras de Japón (n=29) mostraron un bajo nivel de sacarosa frente a las muestras de China, y frente a Corea no se mostraron diferencias significativas. En la Figura 7, se muestra uno de los resultados de este estudio: el análisis multivariable O-PLS que resalta los biomarcadores responsables de la discriminación entre muestras de té blanco de China frente a las de Corea. China resalta por tener un té con mayor cantidad de teanina, alanina y treonina, mientras que el de Corea se diferencia por contener una mayor cantidad de glucosa, sacarosa, EGCG, EGC, EC y cafeína que el té de China.



EC: epicatequina
 EGC: epigallocatequina
 EGCG: epigallocatequina-3-galato

Figura 7. Diferencias metabólicas de los metabolitos del té en áreas de cultivo diferentes: el té blanco (Korea AP) y oolong (China), representadas mediante el gráfico del coeficiente OPLS-DA. Las muestras liofilizadas de té se disolvieron en 540 μ L de agua deuterada y 60 μ L de 0.5 mM de sal sódica del ácido 3-(trimetilsilil)-[2,2,3,3d₄]-propiónico (TSP) en agua destilada. Figura tomada de la referencia 26.

1.2. Aplicaciones de la metabolómica en las ciencias de la salud

La metabolómica de la ingesta de alimentos es empleada también activamente en el control de inocuidad de los productos de consumo humano. Ello se realiza a través de la evaluación de los cambios que produce el consumo de un alimento contaminado con patógenos, micotoxinas, alérgenos o pesticidas en el metaboloma del plasma, la orina o las heces de un ser humano.¹⁹

El análisis del metaboloma de estos biofluidos también proporciona información de la dieta de una persona, del desarrollo de una patología en particular asociado al consumo de un alimento y de la interacción del alimento con la microbiota intestinal humana, entre otros.²⁰

En el caso de la dieta de una persona, por ejemplo, ésta es fácilmente distinguible a través del metaboloma de la orina.²⁷ En la Tabla 1 se muestran algunos biomarcadores de interés asociados a la dieta de una persona identificados mediante técnicas de RMN y MS, en tres diferentes estudios. Dado que el tipo de muestra no requiere ningún tipo de procesamiento adicional, a parte de la recolección de orina, los análisis de este tipo son de gran utilidad para su empleo en estudios epidemiológicos²⁷ que implican cientos de muestras.

Otro de los ejemplos a resaltar en esta área es la relación del consumo de café asociado al cáncer colorrectal.²⁸ Mediante el análisis cromatográfico GC-MS-MS y LC-MS-MS de muestras de suero de personas de 55-74 años sin antecedentes de algún tipo de cáncer, se pudo discriminar a los bebedores (478 personas) de los no consumidores de café (7 personas) a través del contenido de teofilina, cafeína y paraxantina. Teniendo esto en cuenta y correlacionándolo con muestras de pacientes con (52,705 personas) y sin cáncer colorrectal (77,445 personas), entre 1993-2001, los resultados sugirieron que el contenido de estos analitos se encuentra inversamente relacionado con el desarrollo del cáncer colorrectal. Los autores de este trabajo, sin embargo, resaltaron la necesidad de desarrollar mayores estudios en el área para aclarar el papel del café en esta afección.²⁸

Tabla 1. Estudios basados en RMN y MS de biofluidos humanos asociados a diferentes dietas.

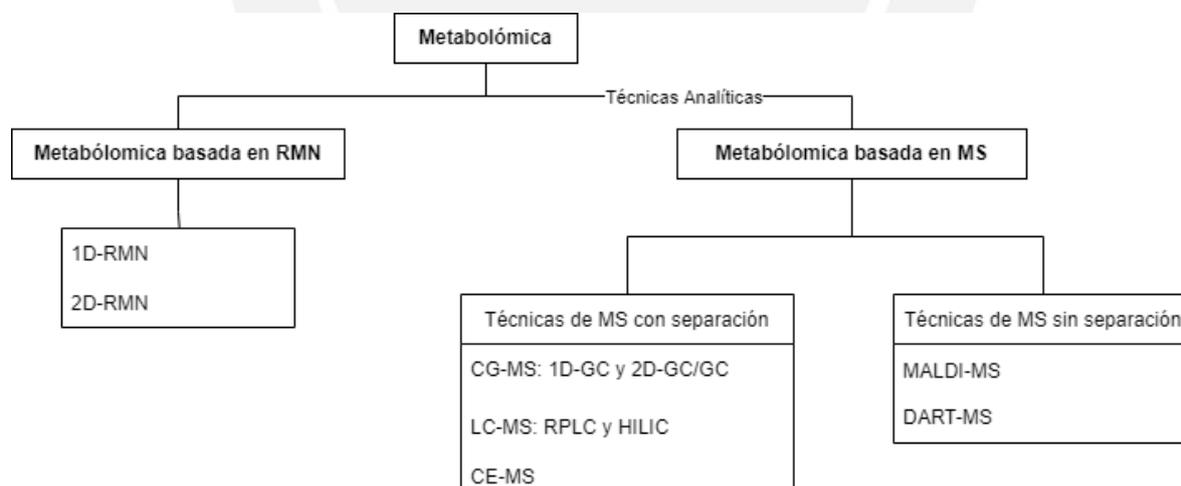
Plataforma	Estudio/ Matriz	Metabolitos	
RMN	Diferenciación en el metaboloma de mujeres jóvenes (plasma y orina) después del consumo de jugo de manzana y arándano. ¹²	<ul style="list-style-type: none"> • Lactato (orina) • D-glucosa (orina) • Ácido cítrico (orina) • Ácido hipúrico (plasma) 	↓* ↓ ↑ ↑
MS	Determinación de biomarcadores asociados a la ingesta de frutas cítricas como la naranja y toronja en humanos, en análisis de orina. ²⁹	<ul style="list-style-type: none"> • Prolina • Betaina • Limoneno 8,9-diol glucurónido • Hesperetina 3'-O-glucurónido • Hidroxiprolina betaína • Naringenina 7-O-glucurónido 	
	Determinación de biomarcadores asociados al consumo de cereales, bayas y pescados con alto contenido de grasa en análisis de plasma en humanos. ³⁰	<ul style="list-style-type: none"> • Ácido hipúrico^b • Heneicosenyl-benzenediol-glucuronide^c • Betaína del ácido piperólico^c • γ- butirotbetaína 	RP RP HILIC HILIC
*: Las flechas indican el aumento o disminución en el nivel de metabolitos en plasma u orina después del consumo de jugo de arándano vs. el jugo de manzana. b: encontrado en bayas c: encontrado en cereales RP: Columna de fase reversa HILIC: Columna de interacción hidrofílica.			

Habiendo presentado algunos ejemplos de la aplicación de la metabolómica en las ciencias de los alimentos y ciencias de la salud, haciendo uso de las dos plataformas analíticas más comunes, espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear, a continuación, en el siguiente capítulo, se desarrollarán las diferentes estrategias en el análisis de mezclas.

CAPÍTULO 2: ESTRATEGIAS EN EL ANÁLISIS METABOLÓMICO

La investigación en metabolómica es un desafío para la química analítica debido a que las propiedades físicas y químicas de los metabolitos son muy diversas y, a menudo éstos se encuentran distribuidos en un amplio rango de concentraciones.⁵ Actualmente, la metabolómica se centra en el uso de metodologías basadas en RMN (espectros monodimensional 1D y bidimensional 2D) y la espectrometría de masas, de modo directo o acoplado a sistemas diversos como la cromatografía de gases (GC), la cromatografía de líquidos (LC) y la electroforesis capilar (CE) (Figura 8).

El uso de cada una de estas metodologías, RMN y MS, se encuentra supeditado a la naturaleza de los metabolitos de interés (peso molecular y volatilidad, por ejemplo). Ambos métodos de detección son complementarios y se aplican de forma rutinaria para evaluar cambios en el metaboloma de un sistema. Las desventajas de uno se ven compensadas por las fortalezas del otro, como se ilustra en la Tabla 2.



1D-RMN: Caracterización monodimensional por RMN, 2D-RMN: Caracterización bidimensional por RMN, GC: Cromatografía de gases, GC/GC: compuestos eluidos en una primera columna se importan a la columna secundaria para una segunda separación, LC: Cromatografía líquida, HILIC: Cromatografía de interacción hidrofílica, RPLC: Cromatografía líquida de fase reversa, MALDI: Ionización por electropulverización por ablación láser y DART: Análisis directo en tiempo real.^{19,31}

Figura 8. Tecnologías basadas en RMN y MS utilizadas para metabolómica. Figura adaptada de las referencias 19, 31.

Tabla 2. Comparación de diferentes tecnologías metabolómicas, RMN y MS. Tabla adaptada de las referencias 3,16 y 32.

Tecnologías		Ventajas	Desventajas
Espectroscopía de RMN		<ul style="list-style-type: none"> ● Es cuantitativo. ● Es no destructivo. ● Es un análisis rápido. ● No requiere separación de componentes. ● Detecta en simultáneo a todos los compuestos presentes en una mezcla. ● Es compatible con muestras sólidas y líquidas. ● Se cuenta con software y base de datos para la identificación de metabolitos. ● No requiere derivatizar. 	<ul style="list-style-type: none"> ● Instrumentación costosa. ● Solo detecta núcleos activos magnéticamente. ● Posee pobre o moderada sensibilidad en el rango μM^5.
Espectrometría de masas	Acoplada a cromatografía líquida LC-MS	<ul style="list-style-type: none"> ● Es sensible. ● Detecta compuestos orgánicos e inorgánicos. ● Puede usarse en imágenes (MALDI). ● Es potente para detectar la mayor parte del metaboloma. 	<ul style="list-style-type: none"> ● No es estrictamente cuantitativo. ● La muestra no es recuperable. ● La instrumentación es costosa con respecto a GC-MS. ● El análisis es lento. ● Posee mala resolución y reproducibilidad de separación frente GC. ● El software y las bases de datos son limitados para la identificación de metabolitos. ● La identificación de nuevos metabolitos requiere de corroboración mediante RMN.
	Acoplada a cromatografía de gases GC-MS	<ul style="list-style-type: none"> ● Es tecnología robusta. ● Es relativamente económico. ● Es cuantitativo previa calibración. ● Posee buena sensibilidad muestras en el rango de nM^5. ● Se cuenta con software y base de datos para la identificación de metabolitos. ● Requiere poca cantidad de muestra. 	<ul style="list-style-type: none"> ● Es destructivo. ● Algunas muestras requieren ser derivatizadas. ● Requiere separación previa ● Procesamiento es lento (20-30 min/muestra). ● No es posible utilizar imágenes. ● La identificación de nuevos metabolitos requiere de corroboración mediante RMN.

El enfoque analítico en estudios de metabolómica puede ser dirigido, no dirigido o semi-dirigido, según lo resumido en la Figura 9,³ y elaborado en los siguientes acápites. Existen ejemplos del uso de ambas plataformas, RMN y MS, en los tres tipos de estrategias.

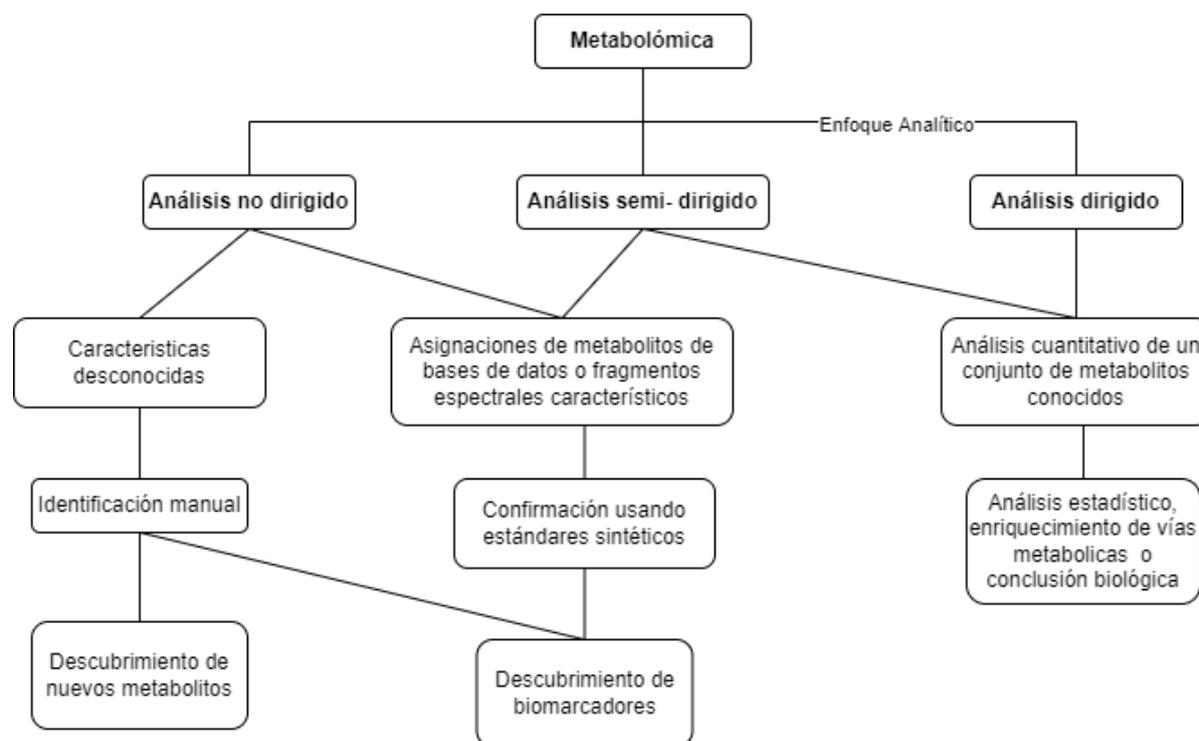


Figura 9. Esquema general de estrategias a seguir en estudios de metabolómica cuantitativa. Figura adaptada de las referencias 1,3,5.

2.1. Estudio metabolómico dirigido

Un estudio de metabolómica bajo análisis dirigido implica el desarrollo de una metodología química analítica con la finalidad de identificar y cuantificar metabolitos específicos dentro de una matriz dada (Figura 9). Para ello, comúnmente se emplean metodologías cromatográficas acopladas a espectrometría de masas, como LC-MS/MS, así como también metodologías basadas en RMN. En la Tabla 3, se muestra el número de metabolitos que ha sido posible identificar en estudios de metabolómica, haciendo uso de MS y RMN.

Tabla 3. Número de metabolitos identificados según plataforma analítica. Tabla adaptada de la referencia 17.

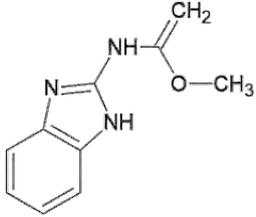
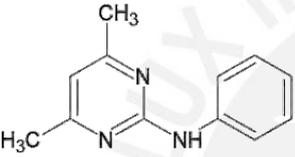
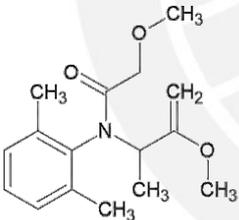
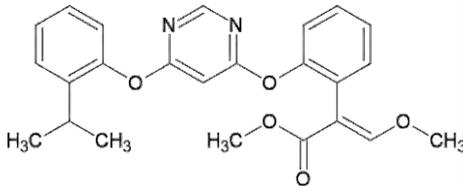
Plataforma		Estudio y estrategia de cuantificación	Nº de metabolitos
GC-MS		Estudio de las variaciones estacionarias y geográficas de la composición de zumo de uvas recolectados en 3 tiempos de cosecha. La cuantificación de metabolitos polares (ácidos orgánicos, amino ácidos) requirió la derivatización con cloroformiato de metilo (MCF y d-MCF) para convertir a los grupos carboxilos a metil ésteres y los grupos amino a carbamato. ³³	50-100
		Estudio del perfil cuantitativo de metabolitos polares de 2 cultivos de garbanzo en respuesta al estrés causado por la salinidad. La cuantificación de metabolitos (ácidos orgánicos y azúcares) se realizó mediante un ion objetivo MRM , por sus siglas en inglés (Multiple Reaction Monitoring). Los metabolitos requirieron derivatización por parte del N, O-bis -(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA). ³⁴	49
LC-MS/MS	RPLC	Estudio del metaboloma de las hojas de arroz mediante el perfil cuantitativo de los metabolitos presentes. La cuantificación se realizó mediante curvas de calibración por ion objetivo MRM . ³⁵	277
	HILIC	Estudio cuantitativo de metabolitos en muestras biológicas diversas (suero humano y de ratón) y validación del método de calibración PRM-MS en ambos modos de ionización: positivo (109) y negativo (128). ³⁶	237
RMN		Estudio del perfil metabolómico basado en RMN de <i>Crataegus rhipidophylla</i> . Todas las partes de la planta fueron analizadas y todos los metabolitos identificados se cuantificaron a partir del área debajo de cada señal. ³⁷	58
HR-MAS RMN		Análisis metabolómico cuantitativo de la heterogeneidad intratumoral del tejido de cáncer de mama. ³⁸	32
GC-MS/MS: Cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas tándem, LC-MS/MS: Cromatografía líquida de ultra rendimiento acoplada a la espectrometría de masas tándem, MRM: Monitoreo de Reacciones Múltiples, PRM: Monitoreo de Reacción en Paralelo y HR-MAS RMN: Resonancia Magnética de estado sólido.			

Queda claro de esta información, que la espectrometría MS permite la detección y cuantificación de un número mayor de metabolitos, en comparación con la RMN. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, cuantificar mediante RMN es más preciso que por MS, pues la intensidad de un pico en un espectro de masas no se encuentra relacionado solo con la concentración del metabolito sino que depende sustancialmente de su capacidad de ionización y por ello es esencial introducir estándares internos isotópicamente marcados, idénticos o

similares, a los metabolitos de interés, lo cual en escenarios como este se ve complicado por la cantidad de distintas clases de metabolitos.^{39,40}

Un reciente caso de análisis dirigido haciendo uso de la plataforma MS es la búsqueda de 172 metabolitos, todos ellos residuos de plaguicidas, fungicidas y herbicidas, en 27 vinos chipriotas disponibles comercialmente (tinto / blanco, seco / dulce) mediante un análisis por cromatografía líquida y espectrometría de masas en tándem (LC-MS / MS).⁴¹ Las curvas de calibración (cuatro puntos) obtenidas para todos los plaguicidas fueron lineales ($R^2 \geq 0.98$). Cada muestra estándar se analizó en una sola corrida cromatográfica de 30 minutos bajo monitoreo MS/MS de reacciones múltiples (MRM). La validación del método incluyó además el análisis del porcentaje de recuperación (soluciones enriquecidas con los 172 estándares en tres niveles de concentración, 0.01, 0.05 y 0.1 mg/kg) y la determinación de los límites de cuantificación y precisión del método. En el experimento piloto desarrollado en este estudio se demostró que solo el 55.6% de estas muestras de vino resultaron positivas al contenido de residuos de plaguicidas, detectándose solamente cuatro de los 172 metabolitos, la carbendazima, el pirimetanilo, el metalaxilo y la azoxistrobina, mostrados en la Tabla 4.

Tabla 4. Tiempo de retención, transiciones MS y concentración de plaguicidas identificados en las muestras de vino chipriota. Tabla obtenida a partir de datos de la referencia 41.

Residuo de pesticida	Modo	tR (min)	Ion calificador 1 (Q1)	Ion calificador 2 (Q2)	Concentración (mg/kg) y tipo de vino
<p>Carbendazim (fungicida)</p>  <p>191.18 g/mol</p>	ESI ⁺	3.15	160.0	132.0	rojo dulce < 0.01 rojo seco = 0.015 blanco = 0.012
<p>Pirimetamil (fungicida)</p>  <p>199.26 g/mol</p>	ESI ⁺	11.75	200.1	82.1	rojo dulce = ND* rojo seco = ND* vino blanco = 0.022
<p>Metalaxilo (insecticida)</p>  <p>279.33 g/mol</p>	ESI ⁺	10.74	220.2	192.2	rojo dulce = ND* rojo seco = 0.014 vino blanco = 0.010
<p>Azoxistrobina (fungicida)</p>  <p>403.38 g/mol</p>	ESI ⁺	13.32	372.1	329.1	vino rojo dulce = ND* vino rojo seco = ND* vino blanco = 0.026
* ND: No detectado					

2.2. Estudio metabolómico no dirigido

Por el contrario, los estudios de metabolómica basados en un análisis no dirigido se centran en la detección de todas las señales asociadas a los metabolitos que constituyen la mezcla compleja (incluyen metabolitos desconocidos) para obtener patrones o huellas dactilares (“fingerprints” en inglés) que representen al metaboloma. Este tipo de análisis no se basa en la búsqueda de metabolitos específicos, sino más bien en la comparación de todo el perfil metabolómico de las muestras bajo estudio con la finalidad de identificar a los metabolitos que diferencian a las muestras.^{42,43}

Para este tipo de análisis no focalizado, la espectroscopía de RMN ha resultado ser útil pues cada compuesto se encuentra conformado por múltiples señales cuyas intensidades se encuentran relacionadas a su concentración dentro de la mezcla y al número de átomos resonantes asociados a esa señal. Estas señales, convenientemente analizadas mediante los experimentos monodimensionales (1D-RMN; ^1H -RMN y ^{13}C -RMN) y bidimensionales (2D-RMN) de correlación homonuclear y heteronuclear (Tabla 5), permiten la determinación de la identidad de los metabolitos y su debida cuantificación haciendo uso de un solo estándar de concentración conocida.

En un estudio no dirigido basado en RMN existen dos estrategias. Una de ellas hace uso de las huellas dactilares que representa cada uno de los espectros de RMN, y la otra de elaboración de perfil metabólico basado en la identificación y la cuantificación de metabolitos presentes en la mezcla (Figura 3). El análisis de las huellas dactilares es global, es decir, toma en cuenta la comparación metabólica de todos los metabolitos detectables (asignados o no asignados) presentes en la muestra biológica. Para este análisis multivariable, todos los espectros tienen que ser agrupados, alineados y transformados en matrices de datos con la finalidad de reducir el número total de variables.¹⁶

Tabla 5. Los principales experimentos de correlación de RMN. Tabla adaptada de la referencia 44.

Correlación	Técnica principal	Comentarios
	^1H - ^1H COSY	Acoplamiento entre ^1H - ^1H , 2 a 3 enlaces.
	^1H - ^1H TOCSY	Acoplamiento del protón, J, retransmitido dentro de un sistema de espín acoplado. Los protones remotos pueden correlacionarse siempre que haya una red de acoplamiento continuo entre ellos.
	^1H - ^{13}C HSQC	Acoplamiento heteronuclear ^1H - ^{13}C de un enlace.
	^1H - ^{13}C HMBC	Acoplamiento heteronuclear de largo alcance, normalmente sobre 2 o 3 enlaces en ^{13}C .

Un reciente ejemplo de un análisis no dirigido realizado basado en RMN es el realizado con las hojas de cuatro especies de vainilla peruana *V. planifolia* (113 g, 6 hojas), *V. palmarum* (93 g, 7 hojas), *V. ribeiroi* (14 g, 6 hojas) y *V. pompona* (257 g, y 7 hojas) con la finalidad de discriminar e identificar marcadores importantes que permitan diferenciarlas entre ellas.⁷

En este trabajo se identificaron 36 metabolitos. La asignación de las señales se realizó mediante distintos los experimentos 1D y 2D RMN mencionados en la Tabla 5, constatándose también las señales con la información disponible en bases de datos como BMRB (Biological Magnetic Resonance Bank) y HMDB (Human Metabolome Database) y otros bancos de datos como los mencionados en la Tabla A1 en Anexo.

El análisis mostró que varios ácidos orgánicos, azúcares, glucósidos y aminoácidos son los responsables de la diferenciación entre especies observada en Figuras 10A y 10B.⁷

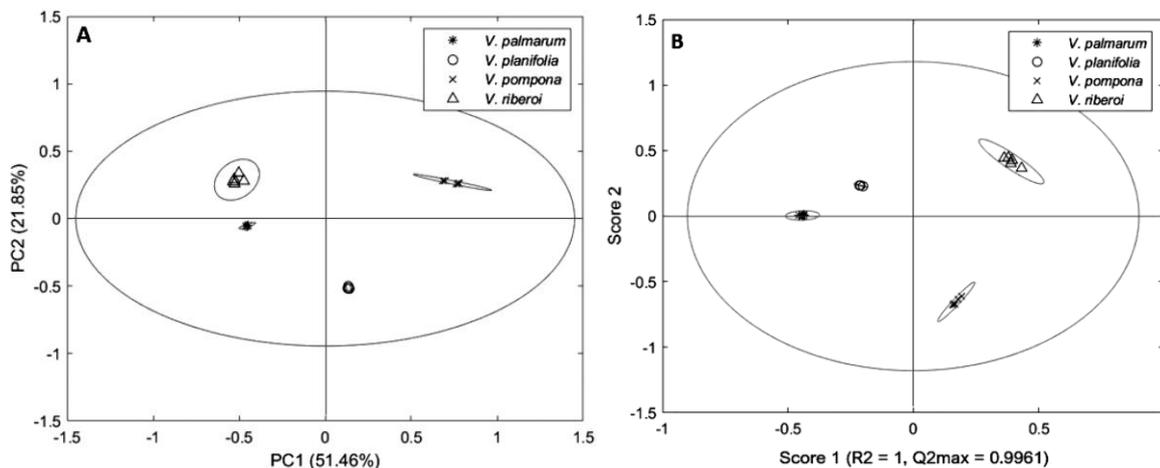
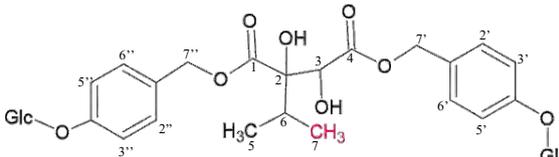
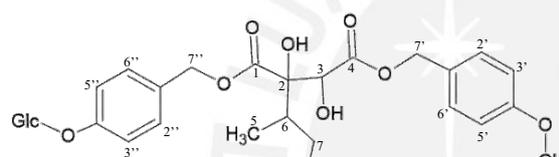
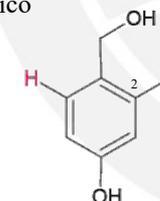
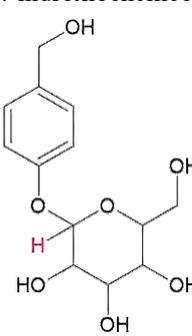


Figura 10. (A) Análisis de componentes principales y (B) análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) de los espectros de RMN de ^1H de especies de vainilla. Cinco muestras independientes ($n=5$) por especie de vainilla fueron analizadas. Figura tomada de la referencia 7.

En la Tabla 6 se presenta la información completa de RMN que permitió en dicho estudio asignar y cuantificar a los metabolitos discriminantes entre las vainillas. Los hidrógenos marcados en rojo en la Tabla 6 son las señales que fueron tomadas en cuenta para la cuantificación de dichos compuestos. En ese estudio se halló que la *V. pompona* y *V. planifolia* fueron las especies con mayor cantidad de glucósidos A y B, y con menor cantidad de glucósido de alcohol 4-hidroxibencílico. Se observó lo contrario para *V. ribeiroi* y, en particular, para *V. palmarum*, que acumuló la mayor concentración de glucósido de alcohol 4-hidroxibencílico.⁷ Estos resultados se vieron reforzados por la parte sensorial olfativa ya que los frutos de *V. pompona* y *V. planifolia* se caracterizan por tener un aroma dulce a vainilla mientras que los frutos de *V. palmarum*, la especie con los niveles más bajos de glucósidos A y B en sus hojas, no produce frutos fragantes.⁷ Cabe mencionar que los glucósidos son considerados importantes precursores de la glucovainillina, glucósido que cuando hidroliza durante el curado libera a su aglicona, la vainillina, molécula responsable de gran parte del olor de vainilla. Por ello la importancia de contar con métodos directos (^1H -RMN) para su debida cuantificación en hojas.

Tabla 6. Señales de RMN de ^1H y ^{13}C asignadas para los metabolitos diferenciadores en extractos metanolicos de cuatro especies de vainilla. Tabla adaptada de la referencia 7.

Metabolito	Asignación	δ ^1H	δ ^{13}C	2D-RMN
<p>Glucósido A</p> 	CH-2',6' CH-2'',6'' CH-3',5' CH-3'',5'' CH-7'a CH-7'b CH-7''a CH-7''b CH (Glc) CH' (Glc) Cq-1',1'' Cq-4',4'' COO-1 Cq-2 CH-3 COO-4 CH3-5 CH-6 CH3-7	7.28 (d, 9.0) 7.18 (d, 8.7) 7.09 (d, 9.0) 7.07 (8.60) 5.05 (d, 11.7) 4.97 (d, 11.4) 4.89 (d, 12.0) 4.68 (d, 12.0) 4.96 (d, 7.3) 4.93 (d, 7.2) 4.66 (s) 0.85 (d, 6.84) 2.19 (m) 0.92 (d, 6.78)	133.61 133.37 119.66 119.64 70.34 70.34 70.08 70.08 103.62 103.64 132.49 160.42 175.37 85.77 76.42 175.78 18.83 36.61 20.01	TOCSY HSQC HMBC
<p>Glucósido B</p> 	CH-2',6' CH-2'',6'' CH-3',5' CH-3'',5'' CH2-7' CH2-7'' Cq-2 CH3-5 CH-6 CH-7a CH-7b CH3-8	7.29 (d, 8.80) 7.23 (d, 8.80) 7.09 7.07 4.99 4.91 0.85 (d, 6.88) 1.89 1.10 (m) 1.35 (m) 0.78 (t, 7.65)	133.23 133.23 119.49 119.47 69.51 70.00 81.33 14.85 43.19 27.31 27.31 14.65	TOCSY HSQC HMBC
<p>Alcohol 4-hidrobencilico</p> 	CH2-OH CH-2,6 CH-3,5 Cq-1 Cq-4	4.51 (s) 7.23 (d, 8.40) 6.83 (d, 8.30) 	66.61 132.08 118.14 135.28 158.53	HSQC HMBC
<p>Glucósido de alcohol 4-hidroxibencilico</p> 	CH2-OH Cq-1 CH-2,6 CH-3,5 Cq-4 CH-1(Glc) CH-2(Glc)	4.56 (s) 7.11 (d, 8.75) 7.33 (d, 8.92) 5.01 (d, 7.80) 3.54	66.41 138.21 119.7 131.8 159.51 103.61 78.95	HSQC HMBC
<p>El proceso de extracción de la muestra implicó la limpieza, liofilización, pulverización y extracción (50 mg en 0.75 mL buffer en D₂O con 0.1% TSP-d₄ y 0.75 mL de metanol deuterado).</p>				

Existen sin duda innumerables ejemplos de métodos basados en la plataforma analítica basada en MS. En este caso los metabolitos se detectan como iones y se registra para cada cual su espectro de Masas y su espectro MS², como mínimo. Todos los iones se detectan durante el tiempo de ejecución de la cromatografía y, de ese modo no existen limitaciones en cuanto al número de sustancias.⁴² La determinación de su identidad se realiza, tal como se esquematiza en la Figura 11, contrastando esta información experimental con espectros estadísticos disponibles en bases de datos (ver Tabla A1 en Anexo) o haciendo uso de estándares.⁴⁵ La cuantificación en esta plataforma, como ya ha sido comentado antes, se realiza mediante la adición de estándares internos.³⁹

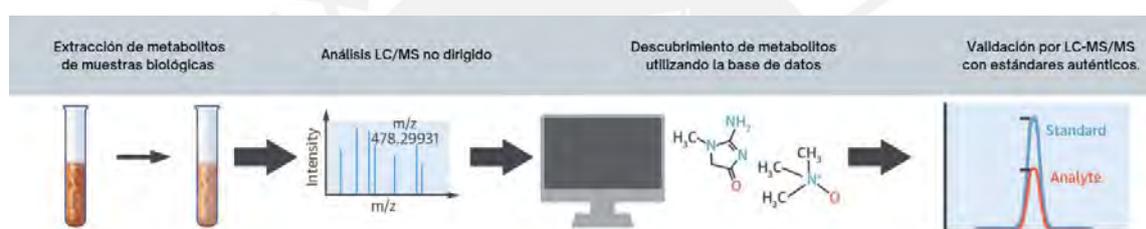


Figura 11. Flujo de trabajo para el análisis metabolómico no dirigido por MS. Figura adaptada de la referencia 40.

2.3. Estudio metabolómico semi- dirigido

Tal como su nombre indica, en este tipo de estrategia se analiza metabolitos conocidos y desconocidos a la vez. En muchos casos los estudios metabolómicos semi- dirigidos emplean las dos plataformas elaboradas hasta el momento, RMN y MS, aprovechando que se complementan entre sí.

Un buen ejemplo de esta metodología es la caracterización de hojas de arándano *Vaccinium myrtillus L.* y arándano rojo *Vaccinium vitis-idaea L.* mediante un análisis combinado de enfoque dirigido (HPLC-DAD y HPLC-MS), en búsqueda de la detección de ciertos compuestos fenólicos, y, no dirigido (¹H-RMN), para estudiar las huellas dactilares

metabolómicas de las hojas de ambas especies relacionadas al tiempo de recolección.⁴⁶ El interés por evaluar el efecto del tiempo de recolección en el metaboloma de estas hojas se debe a que esta planta se utiliza como medicina herbal en varios países de Europa por sus propiedades astringentes, antisépticas, antibacterianas y antiinflamatorias.⁴⁷

Este estudio permitió la identificación de 37 compuestos en los extractos de las hojas de arándanos, de los cuales 21 corresponden a las hojas del arándano rojo y 18 a las hojas del arándano común. Para ello se utilizaron los datos de tiempos de retención, señales m/z, y los espectros de RMN 1D y 2D (COSY y HMBC). Además, los metabolitos fenólicos se cuantificaron por cromatografía líquida de alta resolución con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD) mediante las curvas de calibración estándar correspondientes.

El análisis metabolómico no dirigido basado en ¹H-RMN reveló diferentes perfiles de composición de los extractos de hojas de arándano y arándano rojo identificándose tres zonas con diferencias notables, la región aromática, la de los azúcares y la de los lípidos (Figura 12). Se observa que varias señales en los espectros de arándano variaron considerablemente entre los puntos de recolección, mientras que las señales de los extractos de arándano rojo permanecieron en un nivel relativamente constante independientemente del momento de la recolección mostrando un alto contenido de ácido clorogénico 5-O-cafeoilquínico (ver recuadros I-VII en la Figura 12). Estos resultados indican que la maduración de las hojas de ambas especies sigue dinámicas distintas y debido a ello, el estudio concluye que es necesario definir la época óptima de recolección según la especie de arándano.

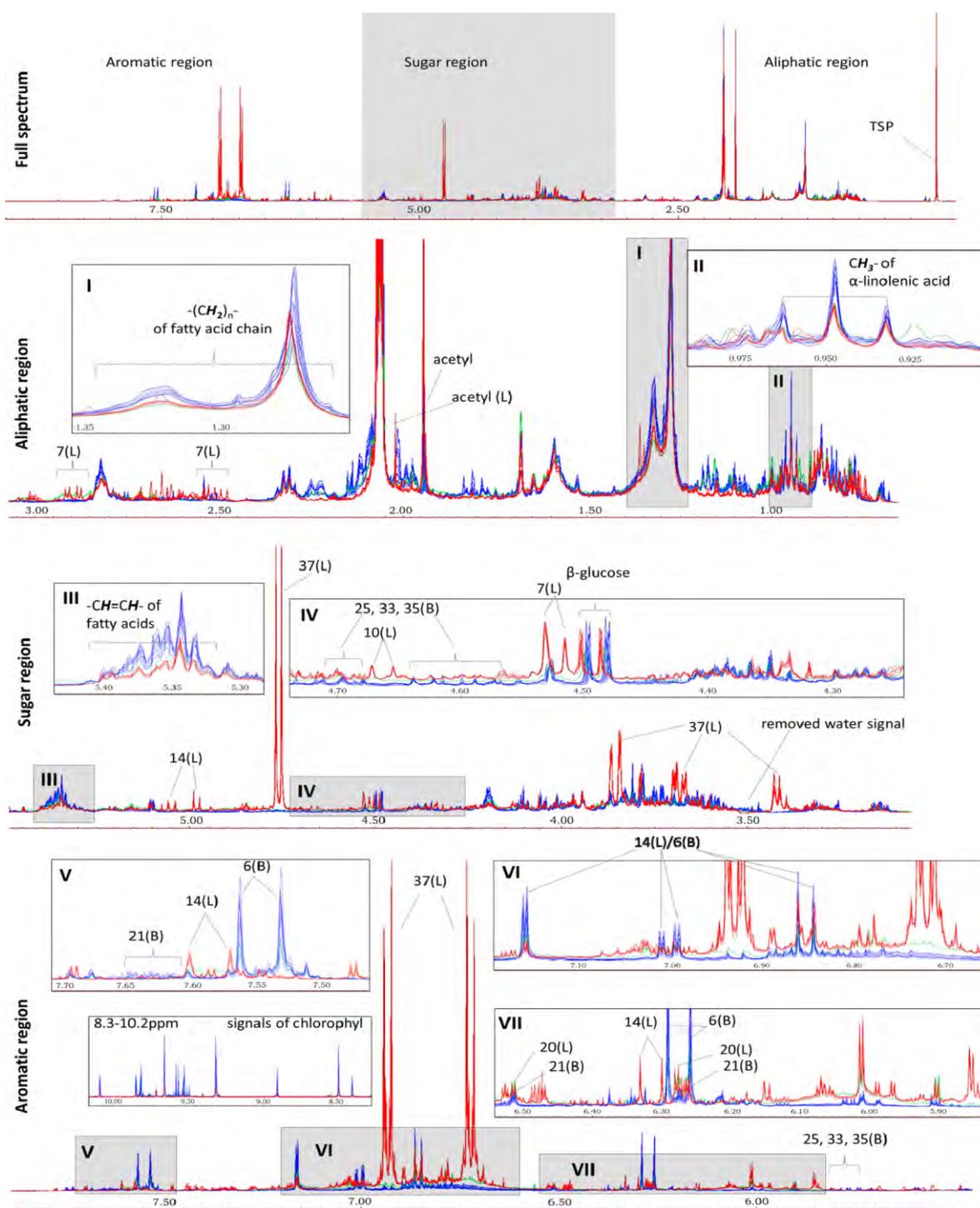


Figura 12. Espectros $^1\text{H-RMN}$ de extractos de arándano, verde (azul) y maduro (verde) y arándano rojo (rojo). (L) se refiere a los compuestos detectados a partir de las muestras de arándano rojo y (B) a las de arándano. Ácido clorogénico (6), catequina (7), epicatequina (10), 2-O-caffeoyl arbutina (14), quercetina-3-O-glucósido (20), quercetina-3-O-glucurónido (21), derivados de p-cumaroyl y caffeoyl-glucósido (25, 33, 35) y β -p-arbutina (37). Figura tomada de la referencia 46.

Otro ejemplo de análisis semi-dirigido es la determinación del efecto del tiempo de almacenamiento sobre el perfil metabólico y la calidad del sabor del té negro keemun (KBT) únicamente mediante HPLC-DAD-MS.⁴⁸ Mediante HPLC-DAD a 360 nm fue posible la evaluación cuantitativa del análisis dirigido, en el que se determinaron cuantitativamente aquellos metabolitos relacionados con la calidad del sabor de té. Este estudio toma como referencia información previa,⁴⁹ donde se menciona que el amargor, la astringencia, el umami y el dulzor del KBT se encuentran relacionados con las concentraciones de cafeína, EGCG (epigallocatequina-3-galato), L-teanina y sacarosa.

Por otro lado, el análisis del perfil metabólico relacionado con el factor de almacenamiento de KBT fue posible mediante un análisis no dirigido basado en LC-MS. Se determinó mediante este análisis que los compuestos marcadores responsables de discriminar las muestras de KBT según su tiempo de almacenamiento son: el ácido quínico, las catequinas galloiladas, el ácido linoleico, el ácido málico, el ácido palamítico y el galato-3'-teaflavina por su alta correlación (color rojo) obtenida en el mapa de calor en la Figura 13, en donde el eje x contempla el tiempo de almacenamiento y eje y su correlación con el metabolito. Los resultados obtenidos también muestran que los polifenoles presentes en las muestras se degradaron durante el almacenamiento, especialmente a los 10 años de almacenamiento de, mientras que las concentraciones de cafeína y teobromina se mantuvieron estables. Finalmente, los compuestos relacionados al amargor, la astringencia y el umami se correlacionaron negativamente con los años de almacenamiento, mientras que el dulzor tuvo un coeficiente de correlación positivo.

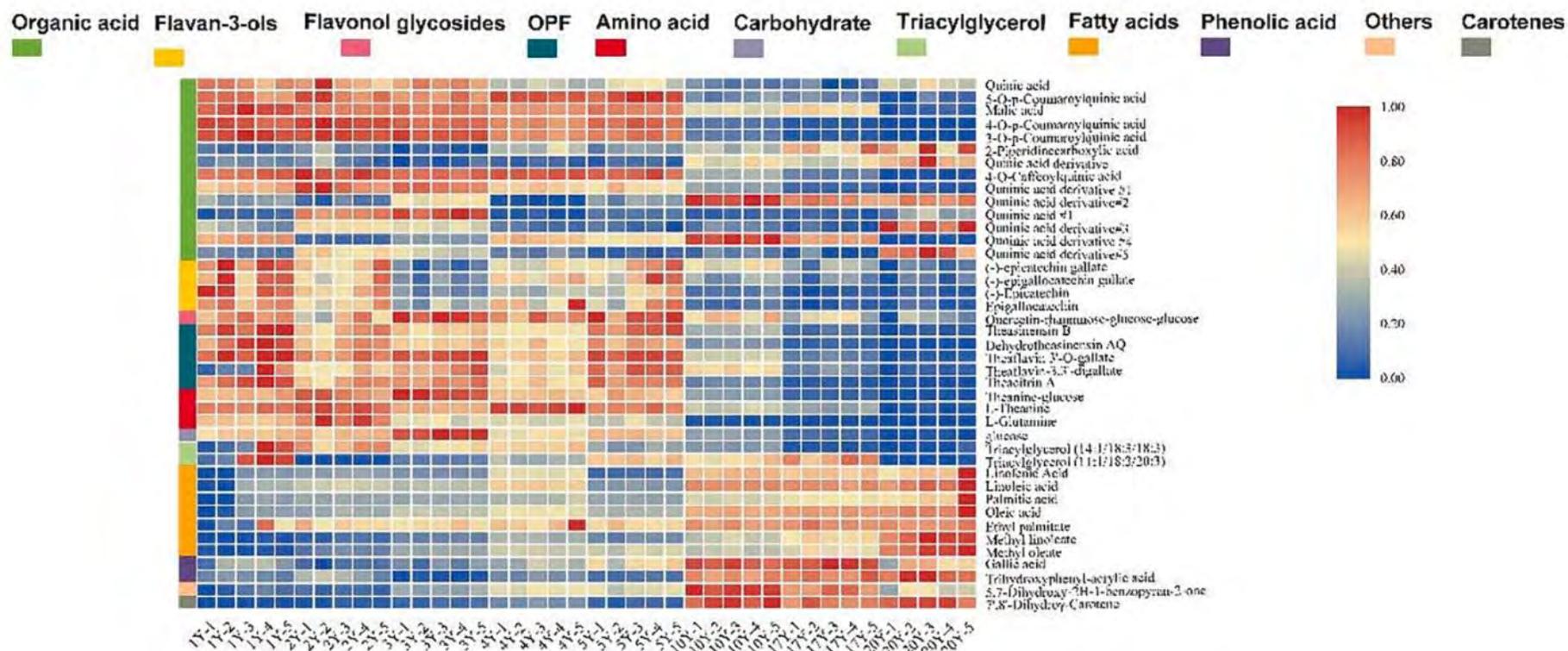
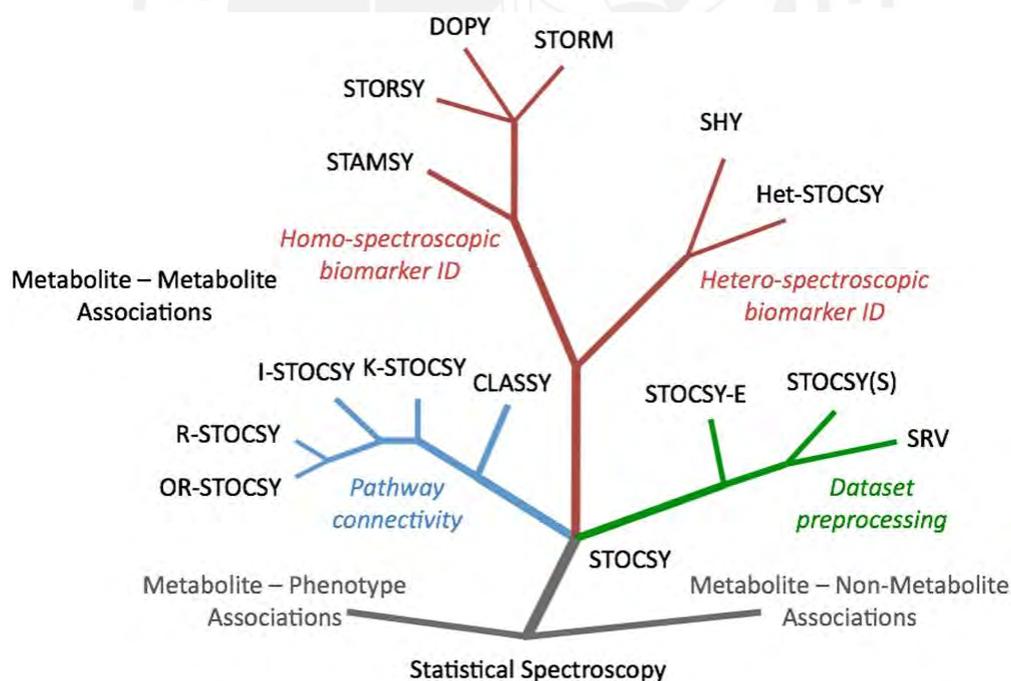


Figura 13. Mapa de calor de varios compuestos críticos responsables de la clasificación de diferentes tiempos de almacenamiento de muestras de KBT. Figura tomada de la referencia 48.

CAPÍTULO 3: QUIMIOMETRÍA EN ESTUDIOS METABOLÓMICOS

Tal como se ha mencionado en los acápites anteriores, el uso de las plataformas analíticas basadas en RMN y la espectrometría de masas son comunes en estudios de metabolómica, en donde no solo se busca identificar a los metabolitos presentes en mezclas, sino también determinar las correlaciones que existen entre las señales que expliquen la respuesta del sistema biológico a los cambios experimentados.

La correlación estadística es una útil herramienta para el análisis de los datos generados en este tipo de estudios. En la Figura 14 se muestra un árbol genealógico que ilustra las distintas clasificaciones de correlación estadística que existen, todas las cuales nacen de lo que comúnmente se conoce como espectroscopía de correlación total estadística, STOCSY, por sus siglas en inglés.



Espectroscopía de correlación total estadística (STOCSY), Optimización de subconjuntos por comparación con estándares de referencia (STORM), Espectroscopía de proyección ordenada por difusión (DOPY), Espectroscopía de masas de correlación estadística (STAMSY), Correlación heteroespectroscópica estadística (SHY), STOCSY heteronuclear (Het-STOCSY), Análisis de conglomerados por espectroscópica estadística (CLASSY), STOCSY cinético (K-STOCSY), STOCSY iterativo (I-STOCSY), STOCSY reacomplado (R-STOCSY), STOCSY reacomplado con filtrado ortogonal (OR-STOCSY), Edición STOCSY (STOCSY-E), Escalado STOCSY (STOCSY(S)) y el Reacomplamiento estadístico de variables (SRV).

Figura 14. Árbol genealógico de espectroscopía de correlación estadística. Figura tomada de la referencia 52.

El término de STOCSY fue introducido por Oliver Cloarec y colaboradores en el año 2005 como una herramienta muy útil en la identificación de biomarcadores en estudios metabolómicos basados en la espectroscopía de RMN.⁵⁰ La correlación estadística asociada a esta metodología se genera a través de la asociación entre las covarianzas de las variables espectroscópicas.⁵¹ La fuerza de esta asociación se mide a través del coeficiente de correlación que varía entre +1 y -1, donde +1 es la correlación positiva total, 0 es ninguna correlación y -1 es la correlación negativa total.

Hoy en día, la espectroscopía de correlación estadística permite no solo determinar con certeza qué señales pertenecen a un determinado metabolito, sino también qué metabolitos dentro de la mezcla provienen de una misma ruta metabólica (Ecuación 3; en donde r_{mn} es el coeficiente de correlación entre las intensidades de las señales m y n, en todos los espectros de i a j; \bar{x}_m y \bar{x}_n corresponden a la media de las intensidades de las señales m y n, respectivamente; y σ_{x_m} y σ_{x_n} , las respectivas desviaciones estándar). Un r_{mn} cercano a 1 indica que las señales m y n pertenecen a la misma molécula. En el caso que m y n no pertenezcan a una misma molécula la magnitud de r_{mn} dependerá de cuán vinculados metabólicamente estén los compuestos a los que pertenecen dichas señales.⁵²

$$r_{mn} = \frac{\sum_{i=1}^j (x_{im} - \bar{x}_m)(x_{in} - \bar{x}_n)}{(j - 1) \cdot \sigma_{x_m} \sigma_{x_n}} \quad \text{Ecuación 3}^{52}$$

$$R = \frac{1}{j - 1} X_1^t X_2 \quad \text{Ecuación 4}^{52}$$

$$R = \frac{1}{j - 1} X_1^t Y \quad \text{Ecuación 5}^{52}$$

Las ecuaciones 4 y 5, matemáticamente equivalentes a la ecuación 3, identifican diferencias entre conjuntos de datos (X_1 , X_2 , Y) y no solo señales. En estas ecuaciones, R es una matriz de coeficientes de correlación. Cuando la información de las matrices X_1 y X_2 deriva de la misma técnica analítica, R es definido como correlación homoespectroscópica; mientras que cuando provienen de diferentes técnicas analíticas, como RMN heteronuclear^{53,54} (^1H - ^{31}P , ^1H - ^{19}F , ^1H - ^{13}C , por ejemplo) o RMN y espectrometría de masas, R es clasificada como correlación heteroespectroscópica. La matriz X_2 podría contener datos derivados de genómica, proteómica y transcriptómica, en cuyo caso el estudio no se centra solo en el metaboloma sino más bien en la relación entre los metabolitos y otros aparatos más complejos dentro del sistema biológico. Otro caso particular, la ecuación 5, es cuando Y no es una matriz de datos sino más bien contiene rasgos fenotípicos. En ese caso R reflejará las asociaciones entre metaboloma-fenotipo.⁵²

En la Figura 15, se muestran los gráficos correlación / covarianza STOCSY en una dimensión (1D) y dos dimensiones (2D), respectivamente, obtenidos con los espectros de ^1H -RMN de un conjunto de muestras de orina. En la Figura 15A se muestra la región seleccionada por el recuadro en negro en el gráfico 2D (Figura 15B), fila a la que le corresponde el desplazamiento químico 1.2 ppm, correspondiente a la señal de H del metilo del ácido-3-hidroxi-butírico (Figura 15A). Esta señal, definida como el pico conductor, se utiliza como punto de partida para determinar su correlación frente a todas las otras señales en el espectro. Todos los picos denotados con color rojo intenso indican una alta correlación con este pico, confirmándose así que todas esas señales corresponden a los otros hidrógenos del ácido-3-hidroxi-butírico (dd, CH_2 , Hs geminales a ~ 2.4 ppm; m, CH, metino a ~ 4.1 ppm). Las otras correlaciones de valor relativamente alto en este gráfico son las de color celeste en la zona negativa, indicando que la conexión no estructural metabólica que existe entre el ácido 3-hidroxi-butírico y los compuestos a los que corresponde esas otras señales es inversa, es decir, si uno aumenta, el otro disminuye.

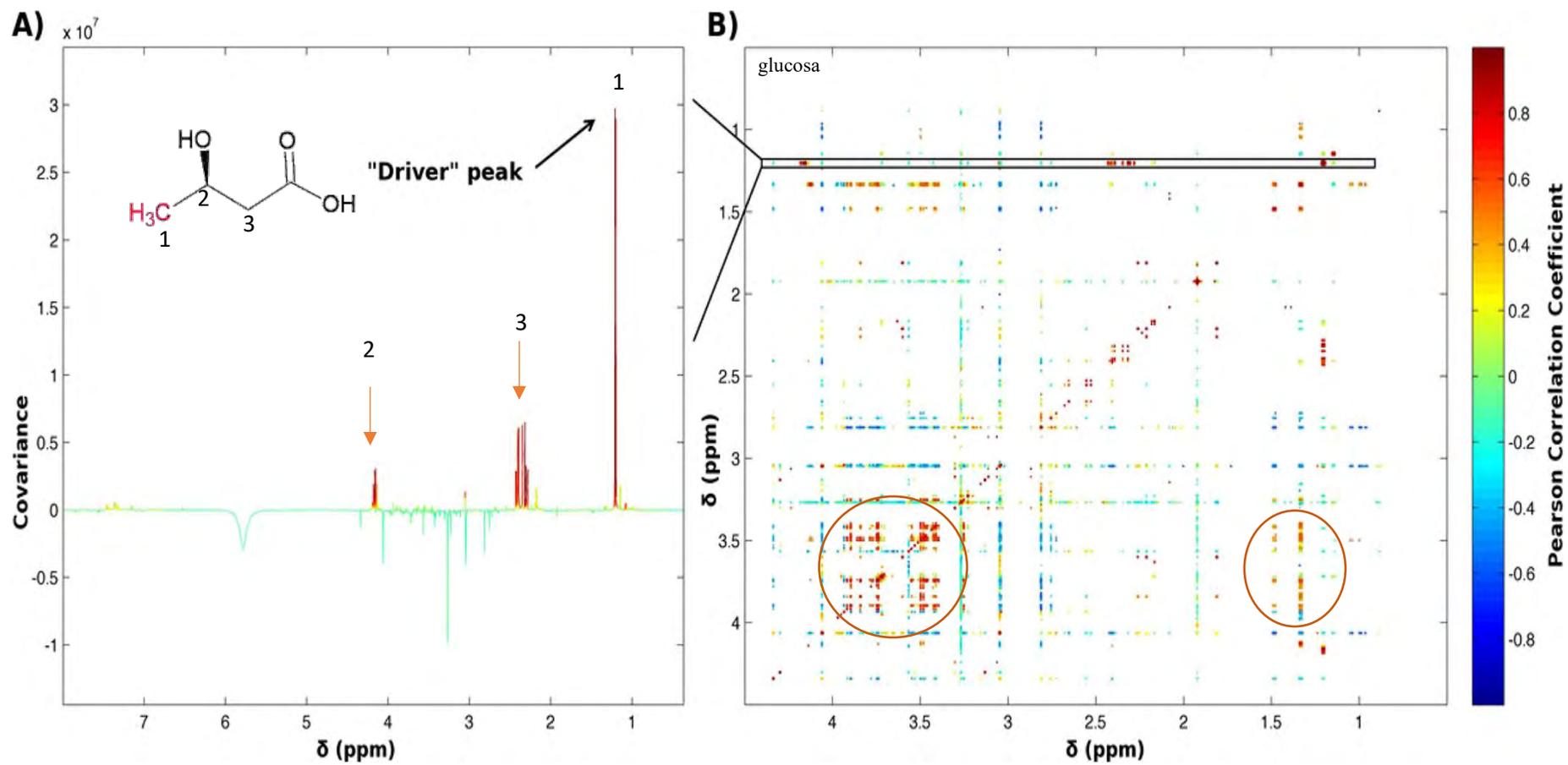


Figura 15. Espectroscopía estadística de correlación total (STOCY): (A) gráficos de correlación/covarianza STOCY unidimensionales (1D) y (B) bidimensionales (2D) de un conjunto de datos de RMN en orina. Figura tomada de la referencia 52.

En la Figura 15B (STOCSY 2D), se logran apreciar algunas correlaciones positivas no estructurales de baja intensidad entre el ácido 3-hidroxi-butírico y el lactato (1.33 ppm, CH), la alanina (1.48 ppm, CH₃) y la glucosa (3.5-4 ppm, CH). En un análisis STOCSY, el proceso realizado con el pico conductor se hace con cada señal de los espectros en búsqueda de correlaciones que faciliten la identificación de la mayor cantidad de metabolitos en espectros complejos en donde existe una alta superposición de señales.⁵⁰

Un buen ejemplo de correlación estadística heteroespectroscópica (SHY) descrita por la ecuación 2, es el estudio Het-STOCSY ¹H-³¹P en la evaluación de la compartimentalización molecular de los fosfolípidos/triglicéridos en muestras (n=75) de biopsia de tejido intestinal humano.⁵⁵ Dicho estudio se condujo haciendo uso de RMN en estado sólido, y a pesar de no haber identificado a todos los analitos fosforilados presentes en estos tejidos, el trabajo permitió no solo asignar a algunos de ellos sino también relacionarlos a través de posibles interacciones metabólicas (Figuras 16 y 17). El interés por caracterizar a los fosfolípidos y su ambiente alrededor del tejido se encuentra relacionado con el hecho de que estas moléculas son importantes constituyentes de las membranas celulares y su deterioro conduce al desarrollo de ciertas patologías.⁵⁶

En la Figura 16A se muestra la correlación entre todas las señales de ¹H presentes en el tejido intestinal con la señal del ³¹P a 2.05 ppm y a 2.58 ppm, definidos, en cada caso, como el pico conductor (Figura 16B). Por lo tanto, este análisis heteroespectroscópico permite identificar a todas las señales de ¹H pertenecientes al metabolito fosforilado con un ³¹P que resuene a estos valores. Así, a través correlaciones con las señales de ¹H a 4.17, 3.65 y 3.22 ppm (Figura 16A) se identificó a la fosforilcolina (PC en Figura 16A), y con 3.96 y 3.24 ppm (CH₂-N⁺ y CH₂-O), a la fosforiletanolamina (PE, en Figura 16C). En el caso de la fosforilcolina, las correlaciones de menor grado entre el pico conductor ³¹P a 2.05 ppm (Figura 16A) con las señales asignadas al ascorbato (H-4 en 4.50 ppm, H-

5 en 4.10 ppm) y al glutati3n (gln β CH₂ a 2.20 ppm, gln δ CH₂ a 2.55ppm, cys β CH₂ a 2.95 ppm, gly α CH₂ a 3.80 ppm y cys α CH₂ a 4.55 ppm), sugieren una conexi3n metab3lica con cada cual.

Igualmente, a trav3s del Het- STOCSY 2D (Figura 17) se observa correlaciones de varios tipos de ³¹P (rango 0 ppm – 0.5 ppm) con ¹Hs en las regiones δ 3.0 ppm - 3.1 ppm (CH₂ - N⁺) y 3.9 ppm – 4 ppm (CH₂-O), recuadros en rojo, se1ales que fueran identificadas previamente como pertenecientes a la creatina (N-Me ~ 3.05 ppm y CH₂ ~ 3.95 ppm), lo que en dicho estudio sugiri3 actividad fosfocreatina/creatina quinasa en estos tejidos.

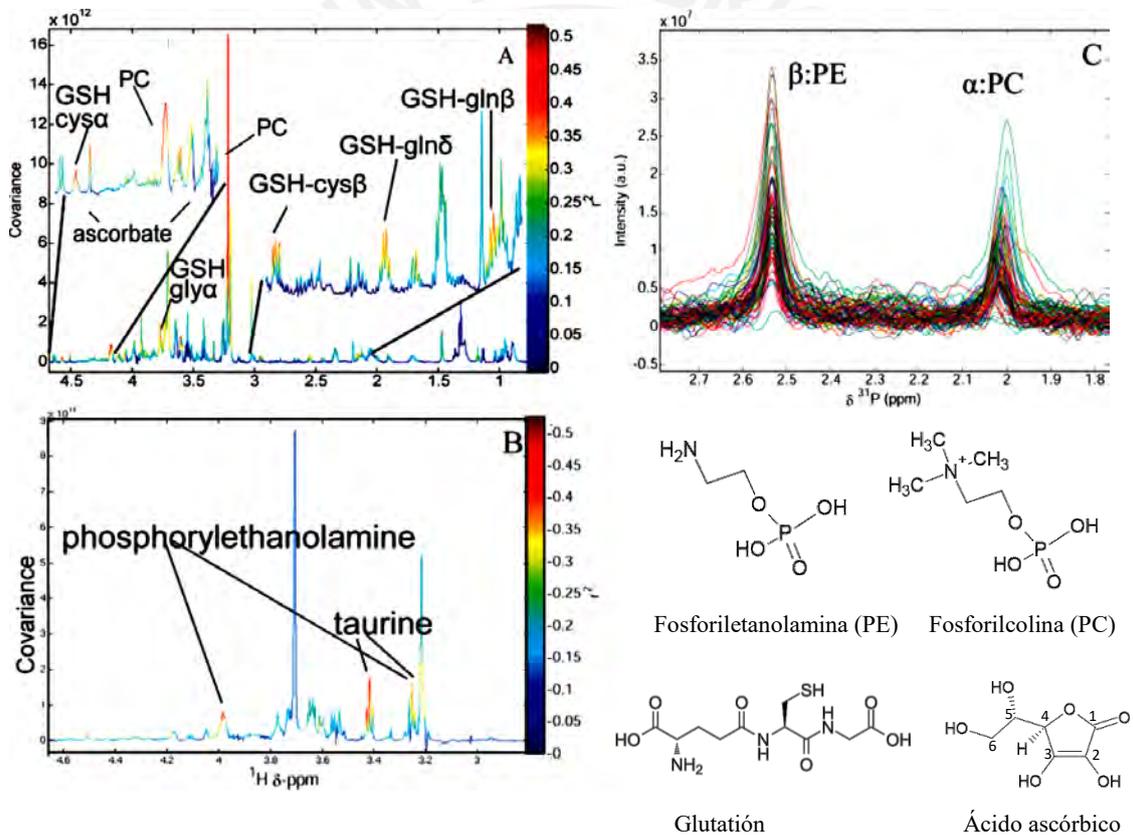


Figura 16. Gr1fica Het-STOCSY unidimensional generada a partir de espectros de RMN de ³¹P-¹H y ¹H CPMG de todas las muestras: (A) la correlaci3n de la resonancia de RMN de ³¹P de PC con ascorbato y glutati3n; (B) una expansi3n de los espectros ³¹P-¹H} MAS NMR que muestra los picos conductores y su correlaci3n con PC y PE; y (C) la correlaci3n de la resonancia de RMN de ³¹P con se1ales de ¹H de taurina y fosforiletanolamina (PE). Figura adaptada de la referencia 55.

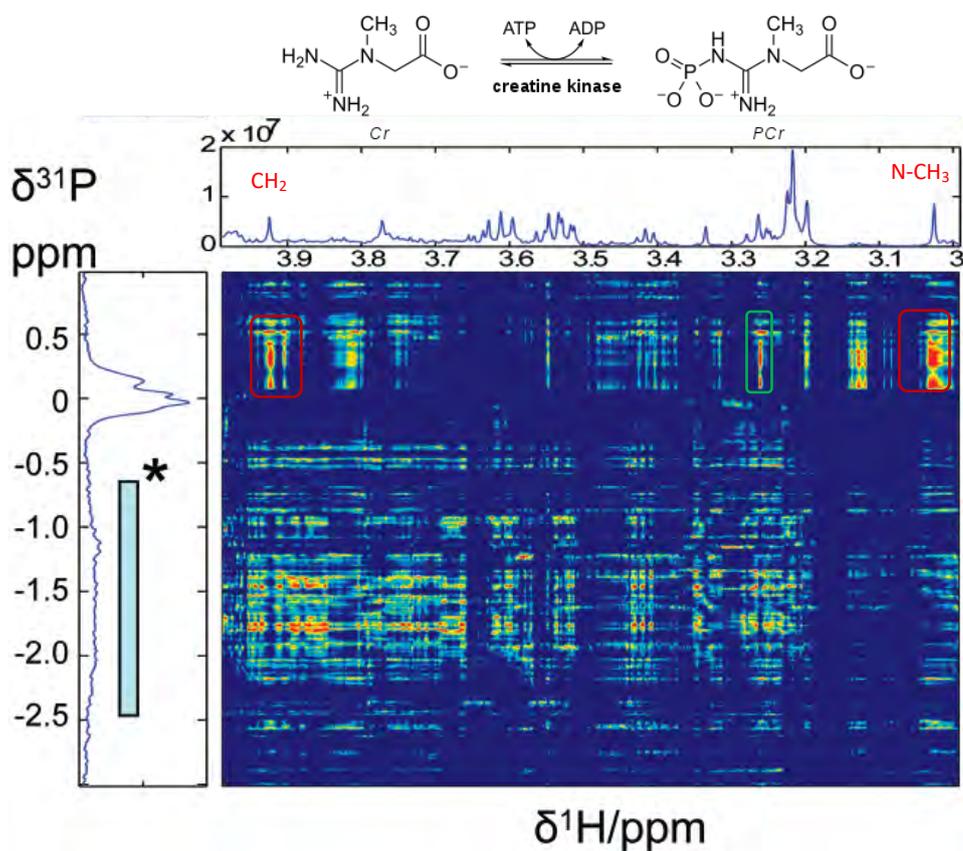


Figura 17. Gráficas de correlación Het-STOCSY bidimensionales derivadas de espectros de RMN de ^{31}P - $\{^1\text{H}\}$ y ^1H CPMG MAS de colon transverso. Figura adaptada de la referencia 55.

Otro buen ejemplo de SHY, pero esta vez de correlación heteroespectroscópica 1D- ^1H RMN y UPLC-MS, es la evaluación del efecto toxicológico de la hidracina en ratones.⁵⁷ La aplicación de SHY en este estudio permite la identificación de biomarcadores en muestras de orina asociados a la toxicidad de la hidracina. El estudio involucró dos grupos, el de control (n=54) y el de ratones sometidos a altas dosis (n=58) de hidracina. La preparación de la muestra en ambos casos es distinta, pero por tratarse de orina, no fue necesaria una etapa de extracción y se siguieron las pautas mencionadas anteriormente en el Capítulo 1. El espectrómetro de masa tándem operó en modo positivo y adquirió señales en el rango de masa de 50 a 850 m/z. Con el uso del software MATLAB se calcularon los coeficientes de correlación de Pearson en base a las intensidades de las señales RMN y los puntos espectrales obtenidos por MS (tiempos de retención y el

recuento de iones m/z). Gran parte del análisis en este estudio se basó en los datos MS² obtenidos con estándares puros de los metabolitos bajo estudio (Tabla 7) y su comparación con los m/z detectados en las muestras de orina.

Tabla 7. Análisis MS/MS utilizado como referencia en la identificación de los biomarcadores asociados a la toxicidad de la hidracina en muestras de orina. Tabla adaptada de la referencia 57.

Compuesto	C3/eV	Masa esperada	Iones detectados (con recuento)
2-aminoadipato	10	162	98 (500), 116 (660), 144(1090), 162 (1060)
2-oxoglutarato	5 10	147	Ninguno Ninguno
Creatina	10	132	90 (400), 132 (660)
Creatinina	10 15	114	86 (270), 114 (1600) 72 (20), 86 (160), 114 (350)
Hipurato	10 5	180	105 (30) 180 (40)
N-metilnicotinamida (NMND)	10 15	137	94 (120), 137 (5000) 92 (180), 94 (660), 110 (80), 137 (220)
Ácido N- metil nicotínico (NMNA)	10 15	138	94 (50), 138 (1700) 92 (150), 94 (190), 138 (1000)
Espermina	10	203	112 (30), 129 (310), 203 (700)

Como se observa en esta Tabla 7, ningún ion asociado al 2-oxoglutarato, estructura presentada en la Figura 18A, fue detectado por masas y ello dificultó su asignación a través de la correlación entre sus propias señales RMN-MS, como es evidente para el caso de la creatina (m/z 90 y 132 con singulete a 3.04 ppm) que se muestran en la Figura 18A. Sin embargo, su presencia se encuentra confirmada a través del triplete a 3.01 ppm correspondiente al metileno del 2-oxoglutarato (Figura 18A). En esta figura se aprecia la correlación positiva de este compuesto con m/z 93, 95, 107 y 134, todos iones no identificados en este estudio. También, dos de estos iones, m/z 93 y 134, muestran correlación negativa con la creatinina, sugiriendo una relación metabólica entre todos ellos. La señal a m/z 145 correlaciona también con un triplete por RMN que se encuentra en la misma zona del triplete del 2-oxoglutarato. Dicha señal corresponde al ion

fragmento de la *N*-acetil lisina con ion molecular de 189 m/z (estructura mostrada en la Figura 18A). Es claro que ambos tripletes se sobrelapan totalmente y se encuentran ligeramente desplazados entre sí. La correlación observada con los datos de m/z facilita resolver problemas de alto solapamiento como este, muy común en los espectros de RMN de mezclas complejas.

Haciendo un análisis similar con todas las correlaciones RMN-MS en los dos grupos de muestras – control *versus* tratamiento con hidracina- se pudieron identificar muchos metabolitos que aumentan y otros que disminuyen por el consumo de la hidracina. Parte de los resultados se resumen en la Figura 18B y confirman lo reportado anteriormente: la *N*-metilnicotinamida (NMND), la creatina y el 2-aminoadipato aumentan con la dosis de hidracina mientras que el ácido *N*-metil nicotínico (NMNA), el hipurato y el 2-oxoglutarato disminuyen.⁵⁸ Primero, en dicha figura se observa la correlación negativa entre todas las señales de ¹H del NMND con el m/z 138 correspondiente al ion molecular de la NMNA. Segundo, la correlación positiva entre las señales de NMND con m/z 90, 98 y 132 confirman que estos metabolitos aumentan con el consumo de hidracina; mientras que la correlación negativa con 105 y 180 confirman que, si NMND aumenta, el hipurato disminuye. En este estudio se reporta por primera vez a la espermina, con m/z 203, rara vez observada en orina de rata, como un nuevo biomarcador de toxicidad, a través de la correlación positiva del NMND y m/z 203. Por último, es claro también de esta figura que existen muchos valores m/z aún no identificadas con el compuesto al que pertenecen y por lo tanto existen más biomarcadores de toxicidad por determinar.

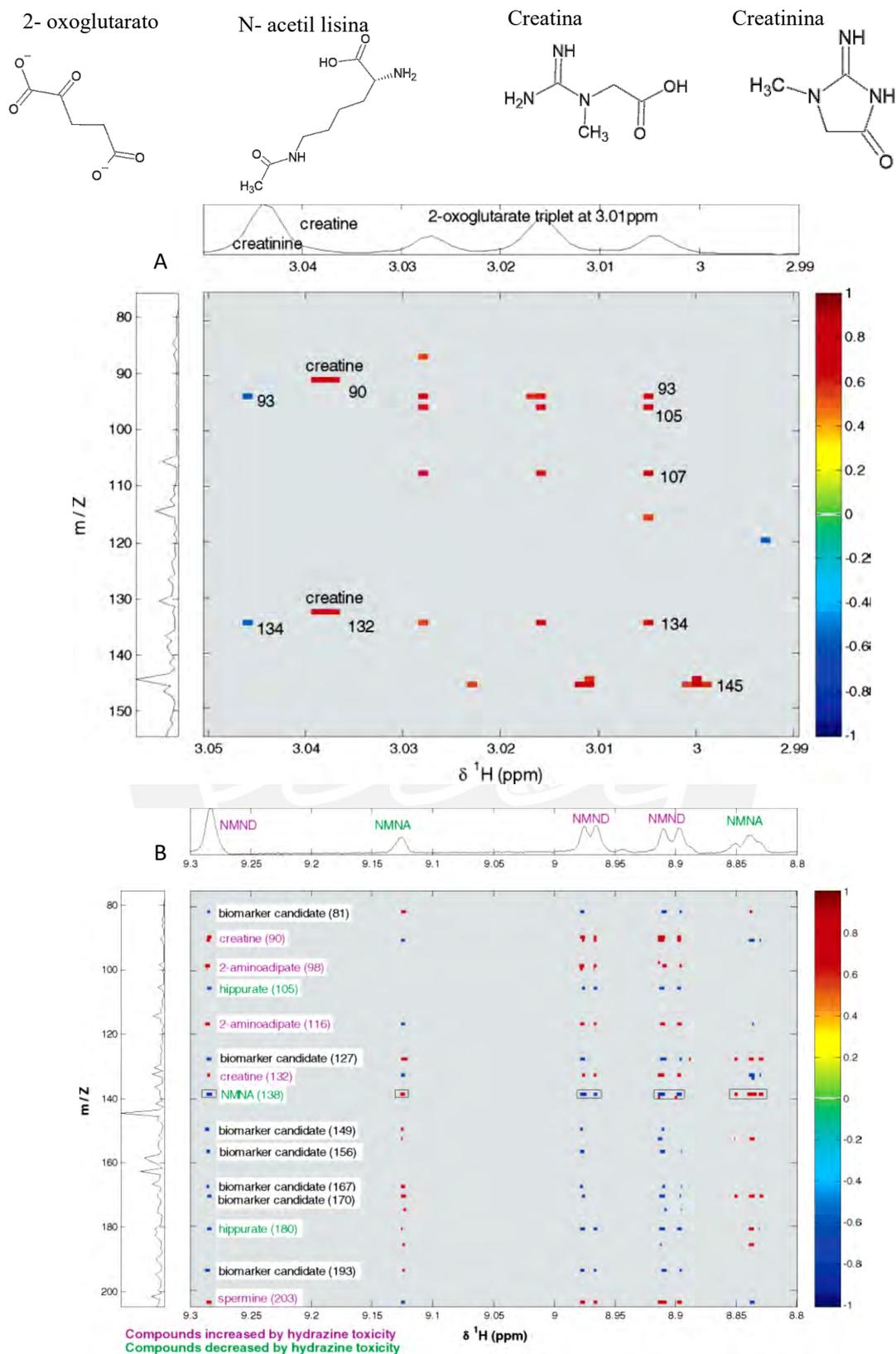


Figura 18. Correlación RMN-MS para muestras de orina de ratones (A) control y (B) asociados a una dosis alta de hidrazina. *N*-metilnicotinamida (NMND), ácido *N*-metil nicotínico (NMNA). Figura adaptada de la referencia 57.

Otra aplicación reciente de la metodología heteroespectroscópica que merece ser mencionada, es la evaluación de la frescura de la espinaca japonesa (*Brassica rapa var. perviridis*), más conocida como “komatsuna”, haciendo uso de la correlación de datos de espectroscopia visible-infrarrojo cercano (Vis-NIR) con datos de RMN. El análisis de la frescura poscosecha de este producto es importante para la gestión de calidad en la cadena de suministro del mercado.⁵⁹

En este estudio se examina la correlación entre la concentración de los metabolitos en los espectros de RMN con la producción acumulada de CO₂ durante seis días de almacenamiento. El valor de CO₂ se utiliza como un indicador del metabolismo de senescencia vegetal⁵⁹ y se mide utilizando un sistema de flujo continuo acoplado a un cromatógrafo de gases. Varios tipos de metabolitos (aromáticos, azúcares, amino ácidos/ácidos orgánicos) correlacionan positivamente con el CO₂ (señales de color rojo), como se ve en el espectro RMN (eje y) de la Figura 19. La glucosa, entre otros azúcares aún no identificados, y los aminoácidos, a saber, isoleucina, valina, treonina, alanina, glutamina, glutamato, GABA, asparagina, tirosina y fenilalanina, muestran correlación positiva con la producción de CO₂. Estas señales a su vez muestran, a través de SHY, correlación negativa con ciertas zonas del espectro NIR, las cuales comprenden la región vinculada con el contenido de proteína (2150–2190 nm) y de celulosa (1738-1752 nm), confirmando que estas macromoléculas se degradan en sus monómeros durante el almacenamiento, y se convierten así en biomarcadores de frescura fáciles de monitorear mediante equipos portátiles NIR utilizados en la industria.

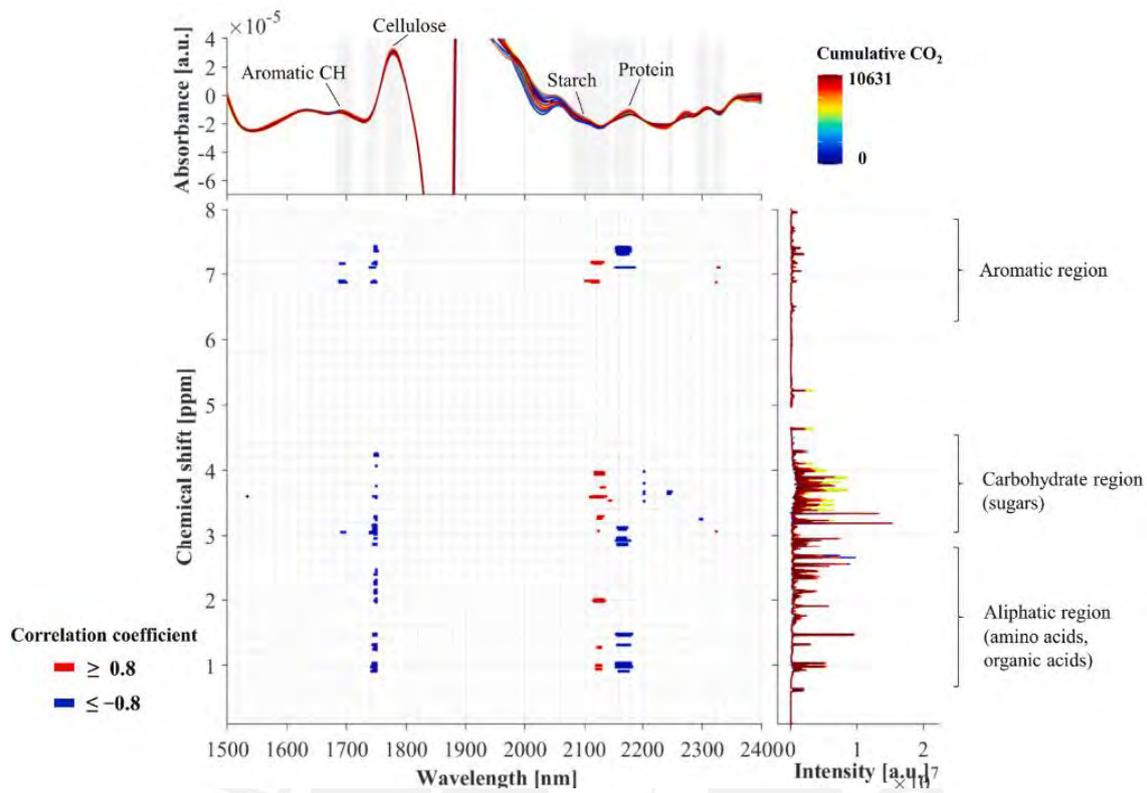


Figura 19. Diagrama esquemático de los resultados del análisis de correlación entre las señales NIR (panel superior) y RMN (panel de la derecha). Figura tomada de la referencia 59.



CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

- La metabolómica en las ciencias de los alimentos y ciencias de la salud ha demostrado ser de gran utilidad tanto en la denominación de origen, como en la discriminación entre especies, en la identificación de biomarcadores asociados a toxicidad de un producto, entre otros casos.
- La espectroscopia de correlación estadística total (STOCSY) es una herramienta que simplifica la identificación de biomarcadores en mezclas complejas. En el estudio Het-STOCSY discutido en esta tesis se demostró la utilidad de esta herramienta en la evaluación de la compartimentalización molecular de los fosfolípidos/triglicéridos en muestras de biopsia de tejido intestinal humano (n=75), través del seguimiento de la correlación ^1H - ^{31}P .⁵⁵
- La correlación estadística heteroespectroscópica SHY basada en RMN hasta el momento ha sido poco explotada en el análisis metabolómico. La evaluación de la frescura y calidad de la komatsuna (RMN-NIR)⁵⁹ y la evaluación del efecto toxicológico de la hidracina en ratones (1D- ^1H RMN y UPLC-MS)⁵⁷, ambos estudios discutidos en este documento, son de los pocos trabajos reportados en el área.
- Teniendo en cuenta la potencia de la metodología SHY y lo poco que ésta ha sido explotada en el área de las ciencias de los alimentos para la identificación de biomarcadores de interés dentro de mezclas complejas asociadas a rutas metabólicas del sistema, se recomienda invertir esfuerzo en el diseño de nuevas metodologías SHY basadas en RMN aplicadas a las ciencias de los alimentos, en particular control de calidad de productos alimenticios.

ANEXO

Tabla A1. Bases de datos espectrales disponibles para la identificación de metabolitos. Tabla adaptada de la referencia 45.

Datos espectrales	Base de datos	Página Web	Estadística	Referencia
MS	LMSD	https://lipidmaps.org/	37500 estructuras lipídicas con espectros MS/MS.	60
	METLIN	https://metlin.scripps.edu/	240516 metabolitos de entrada y 12057 metabolitos con espectros MS/MS.	61
	MassBank	https://massbank.eu/MassBank/	2337 metabolitos y 40889 espectros (LC-MS, GC-MS, etc.)	62
	Golm metabolome	http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/	2019 metabolitos con espectros GC-MS	63
RMN	BMRB	https://bmrbi.io/metabolomics/	9841 biomoléculas con espectros ^1H , ^{13}C y ^{15}N .	64
	Madison	https://nmrfam.wisc.edu/	798 compuestos con espectros 1D y 2D RMN.	65
	NMRShiftDB	https://nmrshiftdb.nmr.uni-koeln.de/	42840 estructuras y 50897 espectros medidos.	66
	Birmingham Metabolite Library	http://www.bml-nmr.org/	208 metabolitos y 3328 espectros 1D y 2D RMN.	67
MS/RMN	RIKEN	http://prime.psc.riken.jp/	1583 metabolitos	68
	HMBD	https://hmdb.ca/	41806 metabolitos y 1579 metabolitos con espectros RMN y MS.	69

REFERENCIAS

- (1) Patti, G. J.; Yanes, O.; Siuzdak, G. Innovation: Metabolomics: The Apogee of the Omics Trilogy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2012**, *13* (4), 263–269. <https://doi.org/10.1038/nrm3314>.
- (2) Nicholson, J. K.; Holmes, E.; Lindon, J. C. Chapter 1 - Metabonomics and Metabolomics Techniques and Their Applications in Mammalian Systems; Lindon, J. C., Nicholson, J. K., Holmes, E. B. T.-T. H. of M. and M., Eds.; Elsevier Science B.V.: Amsterdam, 2007; pp 1–33. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-044452841-4/50002-3>.
- (3) Liu, X.; Locasale, J. W. Metabolomics: A Primer. *Trends Biochem. Sci.* **2017**, *42* (4), 274–284. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.01.004>.
- (4) JC Lindon, E Holmes, J. N. Peer Reviewed: So What's the Deal with Metabonomics? *Anal. Chem.* **2003**, *75* (17), 384 A-391 A. <https://doi.org/10.1021/ac031386+>.
- (5) Xu, Y. J.; Wang, C.; Ho, W. E.; Ong, C. N. Recent Developments and Applications of Metabolomics in Microbiological Investigations. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2014**, *56*, 37–48. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.12.009>.
- (6) Salem, M. A.; Jüppner, J.; Bajdzienko, K.; Giavalisco, P. Protocol: A Fast, Comprehensive and Reproducible One-Step Extraction Method for the Rapid Preparation of Polar and Semi-Polar Metabolites, Lipids, Proteins, Starch and Cell Wall Polymers from a Single Sample. *Plant Methods* **2016**, *12* (1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s13007-016-0146-2>.
- (7) Leyva, V. E.; Lopez, J. M.; Zevallos-Ventura, A.; Cabrera, R.; Cañari-Chumpitaz, C.; Toubiana, D.; Maruenda, H. NMR-Based Leaf Metabolic Profiling of *V. Planifolia* and Three Endemic Vanilla Species from the Peruvian Amazon. *Food Chem.* **2021**, *358* (February). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129365>.
- (8) Cevallos-Cevallos, J. M.; Reyes-De-Corcuera, J. I.; Etxeberria, E.; Danyluk, M. D.; Rodrick, G. E. Metabolomic Analysis in Food Science: A Review. *Trends Food Sci. Technol.* **2009**, *20* (11–12), 557–566. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.07.002>.
- (9) Nicholson, J. K.; Buckingham, M. J.; Sadler, P. J. High Resolution ¹H n.m.r. Studies of Vertebrate Blood and Plasma. *Biochem. J.* **1983**, *211* (3), 605–615. <https://doi.org/10.1042/bj2110605>.
- (10) Courant, F.; Antignac, J. P.; Dervilly-Pinel, G.; Le Bizec, B. Basics of Mass Spectrometry Based Metabolomics. *Proteomics* **2014**, *14* (21–22), 2369–2388. <https://doi.org/10.1002/pmic.201400255>.
- (11) Mushtaq, M. Y.; Choi, Y. H.; Verpoorte, R.; Wilson, E. G. Extraction for Metabolomics: Access to the Metabolome. *Phytochem. Anal.* **2014**, *25* (4), 291–306. <https://doi.org/10.1002/pca.2505>.
- (12) Liu, H.; Tayyari, F.; Khoo, C.; Gu, L. A ¹H NMR-Based Approach to Investigate Metabolomic Differences in the Plasma and Urine of Young Women after Cranberry Juice or Apple Juice Consumption. *J. Funct. Foods* **2015**, *14*, 76–86. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.018>.

- (13) Cho, I. H.; Kim, Y. S.; Choi, H. K. Metabolomic Discrimination of Different Grades of Pine-Mushroom (*Tricholoma Matsutake* Sing.) Using ¹H NMR Spectrometry and Multivariate Data Analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2007**, *43* (3), 900–904. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.09.002>.
- (14) Vanessa, L. Nuclear Magnetic Resonance and High Performance Liquid Chromatography Chemical Analysis of Peruvian Roasted Coffee Beans. Tesis de maestría en Química. Escuela de Posgrado, Pontificia Universidad Católica del Perú, **2013**.
- (15) Worley, B.; Powers, R. Multivariate Analysis in Metabolomics. *Curr. Metabolomics* **2013**, *1* (1), 92–107. <https://doi.org/10.2174/2213235x11301010092>.
- (16) Vignoli, A.; Ghini, V.; Meoni, G.; Licari, C.; Takis, P. G.; Tenori, L.; Turano, P.; Luchinat, C. High-Throughput Metabolomics by 1D NMR. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2019**, *58* (4), 968–994. <https://doi.org/10.1002/anie.201804736>.
- (17) Pinu, F. R.; Goldansaz, S. A.; Jaine, J. Translational Metabolomics: Current Challenges and Future Opportunities. *Metabolites* **2019**, *9* (6). <https://doi.org/10.3390/metabo9060108>.
- (18) Castillo-Peinado, L. S.; Luque de Castro, M. D. Present and Foreseeable Future of Metabolomics in Forensic Analysis. *Anal. Chim. Acta* **2016**, *925*, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.04.040>.
- (19) Li, S.; Tian, Y.; Jiang, P.; Lin, Y.; Liu, X.; Yang, H. Recent Advances in the Application of Metabolomics for Food Safety Control and Food Quality Analyses. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2021**, *61* (9), 1448–1469. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1761287>.
- (20) Kim, S.; Kim, J.; Yun, E. J.; Kim, K. H. Food Metabolomics: From Farm to Human. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2016**, *37*, 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.09.004>.
- (21) Wishart, D. S. Metabolomics: Applications to Food Science and Nutrition Research. *Trends Food Sci. Technol.* **2008**, *19* (9), 482–493. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2008.03.003>.
- (22) Wei, F.; Furihata, K.; Koda, M.; Hu, F.; Kato, R.; Miyakawa, T.; Tanokura, M. ¹³C NMR-Based Metabolomics for the Classification of Green Coffee Beans According to Variety and Origin. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60* (40), 10118–10125. <https://doi.org/10.1021/jf3033057>.
- (23) Yao, R.; Heinrich, M.; Zou, Y.; Reich, E.; Zhang, X.; Chen, Y.; Weckerle, C. S. Quality Variation of Goji (Fruits of *Lycium* Spp.) in China: A Comparative Morphological and Metabolomic Analysis. *Front. Pharmacol.* **2018**, *9* (FEB), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00151>.
- (24) Graham, S. F.; Ruiz-Aracama, A.; Lommen, A.; Cannizzo, F. T.; Biolatti, B.; Elliott, C. T.; Mooney, M. H. Use of NMR Metabolomic Plasma Profiling Methodologies to Identify Illicit Growth-Promoting Administrations. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *403* (2), 573–582. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-5815-z>.

- (25) Arana, V. A.; Medina, J.; Alarcon, R.; Moreno, E.; Heintz, L.; Schäfer, H.; Wist, J. Coffee's Country of Origin Determined by NMR: The Colombian Case. *Food Chem.* **2015**, *175*, 500–506. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.160>.
- (26) Lee, J. E.; Lee, B. J.; Chung, J. O.; Kim, H. N.; Kim, E. H.; Jung, S.; Lee, H.; Lee, S. J.; Hong, Y. S. Metabolomic Unveiling of a Diverse Range of Green Tea (*Camellia Sinensis*) Metabolites Dependent on Geography. *Food Chem.* **2015**, *174*, 452–459. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.086>.
- (27) Mennen, L. I.; Sapinho, D.; Ito, H.; Galan, P.; Hercberg, S.; Scalbert, A. Urinary Excretion of 13 Dietary Flavonoids and Phenolic Acids in Free-Living Healthy Subjects - Variability and Possible Use as Biomarkers of Polyphenol Intake. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2008**, *62* (4), 519–525. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602744>.
- (28) Guertin, K. A.; Lofffield, E.; Boca, S. M.; Sampson, J. N.; Moore, S. C.; Xiao, Q.; Huang, W. Y.; Xiong, X.; Freedman, N. D.; Cross, A. J.; Sinha, R. Serum Biomarkers of Habitual Coffee Consumption May Provide Insight into the Mechanism Underlying the Association between Coffee Consumption and Colorectal Cancer. *Am. J. Clin. Nutr.* **2015**, *101* (5), 1000–1011. <https://doi.org/10.3945/ajcn.114.096099>.
- (29) Pujos-Guillot, E.; Hubert, J.; Martin, J. F.; Lyan, B.; Quintana, M.; Claude, S.; Chabanas, B.; Rothwell, J. A.; Bennetau-Pelissero, C.; Scalbert, A.; Comte, B.; Hercberg, S.; Morand, C.; Galan, P.; Manach, C. Mass Spectrometry-Based Metabolomics for the Discovery of Biomarkers of Fruit and Vegetable Intake: Citrus Fruit as a Case Study. *J. Proteome Res.* **2013**, *12* (4), 1645–1659. <https://doi.org/10.1021/pr300997c>.
- (30) Hanhineva, K.; Lankinen, M. A.; Pedret, A.; Schwab, U.; Kolehmainen, M.; Paananen, J.; de Mello, V.; Sola, R.; Lehtonen, M.; Poutanen, K.; Uusitupa, M.; Mykkänen, H. Nontargeted Metabolite Profiling Discriminates Diet-Specific Biomarkers for Consumption of Whole Grains, Fatty Fish, and Bilberries in a Randomized Controlled Trial. *J. Nutr.* **2015**, *145* (1), 7–17. <https://doi.org/10.3945/jn.114.196840>.
- (31) Ren, J. L.; Zhang, A. H.; Kong, L.; Wang, X. J. Advances in Mass Spectrometry-Based Metabolomics for Investigation of Metabolites. *RSC Adv.* **2018**, *8* (40), 22335–22350. <https://doi.org/10.1039/c8ra01574k>.
- (32) Wishart, D. S. NMR Metabolomics: A Look Ahead. *J. Magn. Reson.* **2019**, *306*, 155–161. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2019.07.013>.
- (33) Tumanov, S.; Zubenko, Y.; Obolonkin, V.; Greenwood, D. R.; Shmanai, V.; Villas-Bôas, S. G. Calibration Curve-Free GC–MS Method for Quantitation of Amino and Non-Amino Organic Acids in Biological Samples. *Metabolomics* **2016**, *12* (4). <https://doi.org/10.1007/s11306-016-0994-9>.
- (34) Dias, D. A.; Hill, C. B.; Jayasinghe, N. S.; Atieno, J.; Sutton, T.; Roessner, U. Quantitative Profiling of Polar Primary Metabolites of Two Chickpea Cultivars with Contrasting Responses to Salinity. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2015**, *1000*, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.07.002>.
- (35) Chen, W.; Gong, L.; Guo, Z.; Wang, W.; Zhang, H.; Liu, X.; Yu, S.; Xiong, L.;

- Luoa, J. A Novel Integrated Method for Large-Scale Detection, Identification, and Quantification of Widely Targeted Metabolites: Application in the Study of Rice Metabolomics. *Mol. Plant* **2013**, *6* (6), 1769–1780. <https://doi.org/10.1093/mp/sst080>.
- (36) Zhou, J.; Liu, H.; Liu, Y.; Liu, J.; Zhao, X.; Yin, Y. Development and Evaluation of a Parallel Reaction Monitoring Strategy for Large-Scale Targeted Metabolomics Quantification. *Anal. Chem.* **2016**, *88* (8), 4478–4486. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b00355>.
- (37) Kumar, D.; Thakur, K.; Sharma, S.; Kumar, S. NMR for Metabolomics Studies of *Crataegus Rhipidophylla* Gand. *Anal. Bioanal. Chem.* **2019**. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-01646-z>.
- (38) Gogiashvili, M.; Horsch, S.; Marchan, R.; Gianmoena, K.; Cadenas, C.; Tanner, B.; Naumann, S.; Ersova, D.; Lippek, F.; Rahnenführer, J.; Andersson, J. T.; Hergenröder, R.; Lambert, J.; Hengstler, J. G.; Edlund, K. Impact of Intratumoral Heterogeneity of Breast Cancer Tissue on Quantitative Metabolomics Using High-Resolution Magic Angle Spinning ¹H NMR Spectroscopy. *NMR Biomed.* **2018**, *31* (2), 1–14. <https://doi.org/10.1002/nbm.3862>.
- (39) Cajka, T.; Fiehn, O. Toward Merging Untargeted and Targeted Methods in Mass Spectrometry-Based Metabolomics and Lipidomics. *Anal. Chem.* **2016**, *88* (1), 524–545. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b04491>.
- (40) Baig, F.; Pechlaner, R.; Mayr, M. Caveats of Untargeted Metabolomics for Biomarker Discovery. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2016**, *68* (12), 1294–1296. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2016.05.098>.
- (41) Christodoulou, D. L.; Kanari, P.; Hadjiloizou, P.; Constantinou, P. Pesticide Residues Analysis in Wine by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry and Using Ethyl Acetate Extraction Method: Validation and Pilot Survey in Real Samples. *J. Wine Res.* **2015**, *26* (2), 81–98. <https://doi.org/10.1080/09571264.2015.1022255>.
- (42) Gallo, M.; Ferranti, P. The Evolution of Analytical Chemistry Methods in Foodomics. *J. Chromatogr. A* **2016**, *1428*, 3–15. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.09.007>.
- (43) Nikolskiy, I.; Mahieu, N. G.; Chen, Y. J.; Tautenhahn, R.; Patti, G. J. An Untargeted Metabolomic Workflow to Improve Structural Characterization of Metabolites. *Anal. Chem.* **2013**, *85* (16), 7713–7719. <https://doi.org/10.1021/ac400751j>.
- (44) Claridge, T. D. W. Chapter 1 - Introduction; Claridge, T. D. W. B. T.-H.-R. N. M. R. T. in O. C. (Third E., Ed.; Elsevier: Boston, 2016; pp 1–10. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-08-099986-9.00001-4>.
- (45) Alonso, A.; Marsal, S.; Julià, A. Analytical Methods in Untargeted Metabolomics: State of the Art in 2015. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2015**, *3* (MAR), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00023>.
- (46) Liu, P.; Lindstedt, A.; Markkinen, N.; Sinkkonen, J.; Suomela, J. P.; Yang, B. Characterization of Metabolite Profiles of Leaves of Bilberry (*Vaccinium Myrtillus* L.) and Lingonberry (*Vaccinium Vitis-Idaea* L.). *J. Agric. Food Chem.*

- 2014**, 62 (49), 12015–12026. <https://doi.org/10.1021/jf503521m>.
- (47) Ieri, F.; Martini, S.; Innocenti, M.; Mulinacci, N. Phenolic Distribution in Liquid Preparations of *Vaccinium Myrtillus* L. and *Vaccinium Vitis Idaea* L. *Phytochem. Anal.* **2013**, 24 (5), 467–475. <https://doi.org/10.1002/pca.2462>.
- (48) Huang, A.; Jiang, Z.; Tao, M.; Wen, M.; Xiao, Z.; Zhang, L.; Zha, M.; Chen, J.; Liu, Z.; Zhang, L. Targeted and Nontargeted Metabolomics Analysis for Determining the Effect of Storage Time on the Metabolites and Taste Quality of Keemun Black Tea. *Food Chem.* **2021**, 359 (April), 129950. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129950>.
- (49) Xu, Y.-Q.; Zhang, Y.-N.; Chen, J.-X.; Wang, F.; Du, Q.-Z.; Yin, J.-F. Quantitative Analyses of the Bitterness and Astringency of Catechins from Green Tea. *Food Chem.* **2018**, 258, 16–24. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.042>.
- (50) Cloarec, O.; Dumas, M. E.; Craig, A.; Barton, R. H.; Trygg, J.; Hudson, J.; Blancher, C.; Gauguier, D.; Lindon, J. C.; Holmes, E.; Nicholson, J. Statistical Total Correlation Spectroscopy: An Exploratory Approach for Latent Biomarker Identification from Metabolic ¹H NMR Data Sets. *Anal. Chem.* **2005**, 77 (5), 1282–1289. <https://doi.org/10.1021/ac048630x>.
- (51) Veselkov, K. A.; Inglese, P.; Galea, D.; McKenzie, J. S.; Nicholson, J. K. *Statistical Tools for Molecular Covariance Spectroscopy*, 3rd ed.; Elsevier Ltd., 2016. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.12113-4>.
- (52) Robinette, S. L.; Lindon, J. C.; Nicholson, J. K. Statistical Spectroscopic Tools for Biomarker Discovery and Systems Medicine. *Anal. Chem.* **2013**, 85 (11), 5297–5303. <https://doi.org/10.1021/ac4007254>.
- (53) Coen, M.; Hong, Y. S.; Cloarec, O.; Rhode, C. M.; Reily, M. D.; Robertson, D. G.; Holmes, E.; Lindon, J. C.; Nicholson, J. K. Heteronuclear ¹H-³¹P Statistical Total Correlation NMR Spectroscopy of Intact Liver for Metabolic Biomarker Assignment: Application to Galactosamine-Induced Hepatotoxicity. *Anal. Chem.* **2007**, 79 (23), 8956–8966. <https://doi.org/10.1021/ac0713961>.
- (54) Clendinen, C. S.; Stupp, G. S.; Ajredini, R.; Lee-McMullen, B.; Beecher, C.; Edison, A. S. An Overview of Methods Using ¹³C for Improved Compound Identification in Metabolomics and Natural Products. *Front. Plant Sci.* **2015**, 6 (AUG), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00611>.
- (55) Wang, Y.; Cloarec, O.; Tang, H.; Lindon, J. C.; Holmes, E.; Kochhar, S.; Nicholson, J. K. Magic Angle Spinning NMR and ¹H-³¹P Heteronuclear Statistical Total Correlation Spectroscopy of Intact Human Gut Biopsies. *Anal. Chem.* **2008**, 80 (4), 1058–1066. <https://doi.org/10.1021/ac701988a>.
- (56) Wu, D.; Wu, C.; Zhong, Y. The Association between Paraoxonase 1 Activity and the Susceptibilities of Diabetes Mellitus, Diabetic Macroangiopathy and Diabetic Microangiopathy. *J. Cell. Mol. Med.* **2018**, 22 (9), 4283–4291. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13711>.
- (57) Crockford, D. J.; Holmes, E.; Lindon, J. C.; Plumb, R. S.; Zirah, S.; Bruce, S. J.; Rainville, P.; Stumpf, C. L.; Nicholson, J. K. Statistical Heterospectroscopy, an Approach to the Integrated Analysis of NMR and UPLC-MS Data Sets:

- Application in Metabonomic Toxicology Studies. *Anal. Chem.* **2006**, 78 (2), 363–371. <https://doi.org/10.1021/ac051444m>.
- (58) Holmes, E.; Nicholls, A. W.; Lindon, J. C.; Connor, S. C.; Connelly, J. C.; Haselden, J. N.; Damment, S. J. P.; Spraul, M.; Neidig, P.; Nicholson, J. K. Chemometric Models for Toxicity Classification Based on NMR Spectra of Biofluids. *Chem. Res. Toxicol.* **2000**, 13 (6), 471–478. <https://doi.org/10.1021/tx990210t>.
- (59) Li, X.; Sekiyama, Y.; Nakamura, N.; Suzuki, Y.; Tsuta, M. Estimation of Komatsuna Freshness Using Visible and Near-Infrared Spectroscopy Based on the Interpretation of NMR Metabolomics Analysis. *Food Chem.* **2021**, 364 (June), 130381. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130381>.
- (60) Sud, M.; Fahy, E.; Cotter, D.; Brown, A.; Dennis, E. A.; Glass, C. K.; Merrill, A. H.; Murphy, R. C.; Rietz, C. R. H.; Russell, D. W.; Subramaniam, S. LMSD: LIPID MAPS Structure Database. *Nucleic Acids Res.* **2007**, 35 (SUPPL. 1), 527–532. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl838>.
- (61) Tautenhahn, R.; Cho, K.; Uritboonthai, W.; Zhu, Z.; Patti, G. J.; Siuzdak, G. An Accelerated Workflow for Untargeted Metabolomics Using the METLIN Database. *Nat. Biotechnol.* **2012**, 30 (9), 826–828. <https://doi.org/10.1038/nbt.2348>.
- (62) Horai, H.; Arita, M.; Kanaya, S.; Nihei, Y.; Ikeda, T.; Suwa, K.; Ojima, Y.; Tanaka, K.; Tanaka, S.; Aoshima, K.; Oda, Y.; Kakazu, Y.; Kusano, M.; Tohge, T.; Matsuda, F.; Sawada, Y.; Hirai, M. Y.; Nakanishi, H.; Ikeda, K.; Akimoto, N.; Maoka, T.; Takahashi, H.; Ara, T.; Sakurai, N.; Suzuki, H.; Shibata, D.; Neumann, S.; Iida, T.; Tanaka, K.; Funatsu, K.; Matsuura, F.; Soga, T.; Taguchi, R.; Saito, K.; Nishioka, T. MassBank: A Public Repository for Sharing Mass Spectral Data for Life Sciences. *J. Mass Spectrom.* **2010**, 45 (7), 703–714. <https://doi.org/10.1002/jms.1777>.
- (63) Nordlander, B.; Krantz, M.; Hohmann, S. The Golm Metabolome Database: A Database for GC-MS Based Metabolite Profiling. *Current* **2008**, 20 (August 2007). <https://doi.org/10.1007/4735>.
- (64) Ulrich, E. L.; Akutsu, H.; Doreleijers, J. F.; Harano, Y.; Ioannidis, Y. E.; Lin, J.; Livny, M.; Mading, S.; Maziuk, D.; Miller, Z.; Nakatani, E.; Schulte, C. F.; Tolmie, D. E.; Kent Wenger, R.; Yao, H.; Markley, J. L. BioMagResBank. *Nucleic Acids Res.* **2008**, 36 (SUPPL. 1), 402–408. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm957>.
- (65) Cui, Q.; Lewis, I. A.; Hegeman, A. D.; Anderson, M. E.; Li, J.; Schulte, C. F.; Westler, W. M.; Eghbalnia, H. R.; Sussman, M. R.; Markley, J. L. Metabolite Identification via the Madison Metabolomics Consortium Database [3]. *Nat. Biotechnol.* **2008**, 26 (2), 162–164. <https://doi.org/10.1038/nbt0208-162>.
- (66) Steinbeck, C.; Krause, S.; Kuhn, S. NMRShiftDB - Constructing a Free Chemical Information System with Open-Source Components. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2003**, 43 (6), 1733–1739. <https://doi.org/10.1021/ci0341363>.
- (67) Ludwig, C.; Easton, J. M.; Lodi, A.; Tiziani, S.; Manzoor, S. E.; Southam, A. D.; Byrne, J. J.; Bishop, L. M.; He, S.; Arvanitis, T. N.; Günther, U. L.; Viant, M. R. Birmingham Metabolite Library: A Publicly Accessible Database of 1-D 1H and

2-D 1H J-Resolved NMR Spectra of Authentic Metabolite Standards (BML-NMR). *Metabolomics* **2012**, *8* (1), 8–18. <https://doi.org/10.1007/s11306-011-0347-7>.

- (68) Sakurai, T.; Yamada, Y.; Sawada, Y.; Matsuda, F.; Akiyama, K.; Shinozaki, K.; Hirai, M. Y.; Saito, K. PRIME Update: Innovative Content for Plant Metabolomics and Integration of Gene Expression and Metabolite Accumulation. *Plant Cell Physiol.* **2013**, *54* (2), 1–8. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcs184>.
- (69) Wishart, D. S.; Jewison, T.; Guo, A. C.; Wilson, M.; Knox, C.; Liu, Y.; Djoumbou, Y.; Mandal, R.; Aziat, F.; Dong, E.; Bouatra, S.; Sinelnikov, I.; Arndt, D.; Xia, J.; Liu, P.; Yallou, F.; Bjorn Dahl, T.; Perez-Pineiro, R.; Eisner, R.; Allen, F.; Neveu, V.; Greiner, R.; Scalbert, A. HMDB 3.0-The Human Metabolome Database in 2013. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41* (D1), 1–7. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1065>.

