



ARTÍCULO DE REVISIÓN

Técnicas analíticas empleadas en metabólomica de alimentos

Analytical techniques used in food metabolomics

Wilson Saavedra-Charca^a; Víctor Vásquez-Villalobos^{b,*}; Carmen Rojas-Padilla^b

a. Escuela de Ingeniería Agroindustrial. Universidad Nacional de Trujillo. Av. Juan Pablo II s/n, Trujillo, Perú.

b. Departamento de Ciencias Agroindustriales. Universidad Nacional de Trujillo. Av. Juan Pablo II s/n, Trujillo, Perú.

*Autor para correspondencia: vvasquez@unitru.edu.pe (V. Vásquez -Villalobos)

Recibido 27 Octubre 2015; Aceptado 19 Noviembre 2015

RESUMEN

Las poblaciones de metabolitos de bajo peso molecular en lípidos, aminoácidos, péptidos, ácidos nucleicos, ácidos orgánicos, vitaminas, tioles, carbohidratos, etc. presentes en los alimentos, representan productos finales de procesos regulatorios celulares e indican la respuesta de los sistemas biológicos a una variedad de influencias genéticas y ambientales. Su análisis global es un reto difícil que implica el uso de modernas técnicas analíticas y diferentes estrategias metabólicas, utilizando para estos propósitos técnicas de alto rendimiento y alta calidad. No siendo posible analizar todos los metabolitos de bajo peso molecular con una sola plataforma analítica. La mayoría de las técnicas analíticas metabólicas encontradas en análisis de alimentos, seguridad y calidad alimentaria son: Cromatografía de Gases GC (*Gas Chromatography*), Cromatografía Líquida de Alta Resolución HPLC (*High-Performance Liquid Chromatography*), Cromatografía Líquida de Ultra Performance UPLC (*Ultra Performance Liquid Chromatography*), Electroforesis Capilar CE (*Capillary Electrophoresis*) acoplados a Espectrometría de Masas MS (*Mass Spectrometry*) y espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear NMR (*Nuclear Magnetic Resonance*).

Palabras clave: Metabólomica alimentaria, Resonancia Magnética Nuclear, Espectrometría de Masas, Cromatografía de Gases, Cromatografía Líquida de Ultra Performance.

ABSTRACT

Populations of low molecular weight metabolites in lipids, amino acids, peptides, nucleic acids, organic acids, vitamins, thiols, carbohydrates, etc. present in food, represent final products of cellular regulatory processes and indicate the response of biological systems to a variety of genetic and environmental influences. Global analysis is a difficult challenge that involves the use of modern analytical techniques and different metabolomic strategies, using for these purposes high performance and high quality techniques. As it is not possible to analyze all the metabolites of low molecular weight with a single analytical platform. Most of the analytical metabolomic techniques found in the analysis of food safety and food quality are: Gas Chromatography GC, High-Performance Liquid Chromatography HPLC, Ultra Performance Liquid Chromatography UPLC, Electrophoresis Capillary CE; coupled to Mass Spectrometry, MS and Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy.

Keywords: Food metabolomics, Nuclear Magnetic Resonance, Mass Spectrometry, Gas Chromatography, Ultra Performance Liquid Chromatography.

1. Introducción

La mayor esperanza de vida de la población y el incremento de los costos para el cuidado de la salud, ha tomado prioridad en el desarrollo de nuevas alternativas para su mantenimiento. Se han realizado pocos estudios avanzados para entender la relación entre los constituyentes fitoquímicos (metabolitos secundarios de los vegetales) de nuestra alimentación basada en vegetales y la salud a un nivel molecular. A pesar que se ha incrementado el interés por consumir alimentos funcionales y nutraceuticos, la industria nacional y organismos nacionales de regulación y control de alimentos, no utilizan estas técnicas de análisis de última generación para garantizar este efecto; mientras que las ciencias biológicas, médicas y veterinarias han sido testigos que con el advenimiento de la era post-genómica, han aparecido estrategias que proporcionan una visión de la regulación molecular de las células (Watkins y German, 2002).

Los avances en estas áreas han sido impulsados por el desarrollo de tecnologías novedosas que permiten analizar sistemas globales de productos génicos. En este contexto, la transcriptómica define la población de especies de ARNm en una célula en un tiempo específico y en un conjunto de condiciones; la proteómica aborda el problema desafiante de definir cambios en la expresión de la proteína, dinámica proteica y modificaciones post-traduccionales; mientras que el campo emergente de la metabolómica mide los cambios en las poblaciones de metabolitos de bajo peso molecular bajo determinado conjunto de condiciones (Fiehn *et al.*, 2001).

La metabolómica, es el estudio de “muchos metabolitos pequeños como sea posible” en un sistema, y se ha convertido en una importante herramienta en muchas áreas de investigación (Cevallos-Cevallos *et al.*, 2009). Los metabolitos representan un grupo diverso de estructuras de bajo peso molecular incluyendo lípidos, aminoácidos, péptidos, ácidos nucleicos, ácidos orgánicos, vitaminas, tioles y carbohidratos; haciendo del análisis global un reto difícil (Zhang *et al.*, 2012). Los metabolitos de bajo peso molecular representan productos finales de procesos regulatorios celulares e

indican la respuesta de los sistemas biológicos a una variedad de influencias genéticas y ambientales (Fiehn, 2002).

Una estrategia metabolómica implica el uso de modernas técnicas analíticas para determinar las poblaciones globales de metabolitos en las muestras biológicas y se emplean herramientas estadísticas avanzadas y bioinformática para maximizar la recuperación de la información y ayudar a la interpretación de la gran cantidad de datos que son generados.

En el hombre y animales, los perfiles de metabolitos pueden considerarse como indicadores importantes del fenotipo normal y patológico, ofreciendo la posibilidad de identificar biomarcadores del estado de una enfermedad. Procesos celulares anormales pueden causar disturbios en el perfil de metabolitos endógenos de bajo peso molecular. Mediante esta técnica se puede proporcionar una visión de la perturbación de los metabolitos causadas por la expresión génica diferencial, agravio toxicológico, procesos fisiopatológicos y estado untricional alterado (Nicholson *et al.*, 2002).

En este sentido la metabolómica ha emergido como una importante herramienta en muchas disciplinas tales como la medicina y nutrición, farmacología y fisiología vegetal. En ciencia de los alimentos, ha incursionado recientemente como una herramienta de calidad en la inocuidad, cumplimiento de las regulaciones, microbiología y en el procesamiento de materias primas y productos finales (Cevallos-Cevallos *et al.*, 2009).

2. Técnicas analíticas

Los métodos convencionales para el análisis de los metabolitos de bajo peso molecular se han focalizado en componentes específicos, con protocolos de aislamiento y detección a la medida de las características químicas y físicas de los metabolitos de interés. Este enfoque ha sido ampliamente empleado en el perfil de los metabolitos que se acumulan en los fluidos corporales y tejidos de pacientes con errores innatos de metabolismo como aminoacidopatías, defectos de oxidación de ácidos grasos y acidemias orgánicas (Clayton, 2001; Rashed, 2001).

A diferencia de la genómica, transcriptómica y la proteómica, donde se analiza esencialmente una clase de compuestos, las estrategias metabolómicas tienen que detectar un amplio espectro de moléculas con diversas propiedades (Weckwerth, 2003).

Las técnicas analíticas adecuadas para el análisis global de los metabolitos deben ser sensibles, robustas y poseer la capacidad de análisis de alto rendimiento requeridos para un gran número de muestras. En los últimos años se han logrado avances considerables en el desarrollo de tecnologías analíticas, para medir e interpretar perfiles de metabolitos complejos. Sin embargo, dado el amplio rango dinámico y químico de los metabolitos de bajo peso molecular en mezclas biológicas, no es posible analizar todos los metabolitos de bajo peso molecular con una sola plataforma analítica (Glassbrook y Ryals, 2001).

Las técnicas utilizadas con mayor frecuencia para los estudios de metabolómica son espectroscopia NMR y MS (*Nuclear Magnetic Resonance* y *Mass Spectrometry*). Los datos obtenidos por espectroscopia NMR o MS de mezclas biológicas, producen un perfil espectral complejo que refleja el estado metabólico del organismo (Shockcor y Holmes, 2002). Un solo espectro puede contener miles de señales. Para interpretar las perturbaciones bioquímicas, las estrategias basadas en la metabolómica emplean métodos potentes bioinformáticos y estadísticos (Figura 1).

El rápido desarrollo de una gama de plataformas analíticas, incluyendo Cromatografía de Gases GC (*Gas Chromatography*), Cromatografía Líquida de Alta Resolución HPLC (*High-Performance Liquid Chromatography*), Cromatografía Líquida de Ultra Performance UPLC (*Ultra Performance Liquid Chromatography*), Electroforesis Capilar CE (*Capillary Electrophoresis*) acoplado a MS y espectroscopia NMR, puede permitir la separación, detección, caracterización y cuantificación de metabolitos y las rutas metabólicas relacionadas (Zhang, *et al.*, 2012). Debido a la complejidad de los metabolitos y de sus diversas propiedades, ninguna plataforma analítica sola puede

aplicarse para la detección de los metabolitos en una muestra biológica.

El uso combinado de enfoques analíticos instrumentales modernos facilita encontrar los resultados ideales en metabolómica y es beneficioso para detectar los metabolitos que no se puede encontrar mediante técnicas de análisis individual. Se han utilizado plataformas integradas para proporcionar detección sensible y confiable de miles de metabolitos en una muestra de biofluido, el desarrollo continuo de estas plataformas analíticas acelerará el uso generalizado y la integración de la metabolómica en sistemas biológicos (Zhang, *et al.*, 2012).

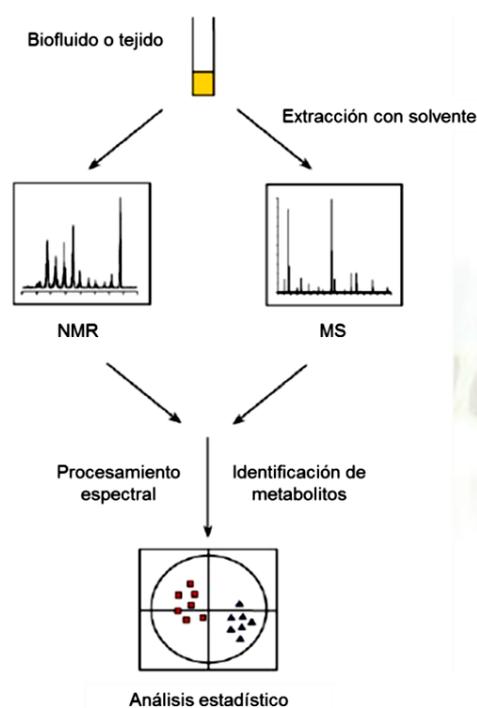


Figura 1. Estrategias experimentales para la elaboración de perfiles de metabolitos de bajo peso molecular en sistemas biológicos.

Fuente: Whitfield *et al.* (2004).

2.1 Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear: *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR)

El uso de la espectroscopia NMR en los estudios de metabolómica ha sido promovido por Nicholson y sus colegas (Nicholson *et al.* 1999, 2002; Nicholson y Wilson, 2003). Se reporta que la espectroscopia NMR es la más importante técnica analítica utilizada en la determi-

nación del perfil global de poblaciones de metabolitos de bajo peso molecular.

La tecnología NMR fue recién utilizada a partir del año 1940 para dilucidar la estructura de las moléculas en química orgánica (Marcone *et al.*, 2013), sin embargo, las diversas aplicaciones de la espectroscopia NMR en ciencia de los alimentos se dieron a partir de 1980, debido principalmente a falta de conocimientos científicos, alto costo de los equipos y la ausencia de piezas diseñadas de RMN específicamente con fines alimenticios. Con el desarrollo de instrumentación de NMR y mejoras de los programas para recolectar y analizar los datos, la aplicabilidad de NMR recientemente se ha expandido rápidamente en el campo de ciencia y tecnología de alimentos, cubriendo diversos campos que incluyen la microbiología de alimentos, química de alimentos, ingeniería de alimentos y envasado de alimentos (Vilen *et al.*, 2010).

El análisis de NMR se basa en el comportamiento (relajación) de los núcleos activos de determinados elementos como ^1H (protón) y ^{13}C (carbono 13) que son los más ampliamente utilizados para aplicaciones alimentarias, en un campo magnético y una irradiación de pulsos de Radio Frecuencia (RF). La relajación describe un proceso complejo a partir de la excitación de los núcleos debido a la división de los niveles de spin nuclear (efecto *Zeeman*) por aplicación del campo magnético, los que tienden al equilibrio (Novoa-Carballal *et al.* 2011).

Basado en el principio de la RMN, la resonancia magnética de imágenes (MRI) permite adicionalmente la observación en el interior de los alimentos, ofrece no sólo información sobre la composición química y estructura interna de ciertos alimentos, también permite monitorear la composición y la modificación estructural de los alimentos cuando experimentan diferentes prácticas agrícolas (cosecha, postcosecha) y procesamiento industrial. Esto aumentará la capacidad de las metodologías actualmente disponibles para la determinación de la calidad de alimentos, que normalmente sólo utilizan para su monitoreo propiedades externas como el color, tamaño, forma o defectos visibles (Chayaprasert y Stroshine, 2005).

Esta técnica permite identificar y cuantificar simultáneamente una amplia gama de compuestos orgánicos en el rango micromolar y proporcionar información imparcial sobre perfiles de metabolitos. La metabolómica basada en NMR es capaz de proporcionar una ‘visión holística’ de los metabolitos bajo ciertas condiciones y de esta forma es ventajosa su utilización. En este sentido ha sido ampliamente utilizado para el análisis de huella metabólica (*fingerprinting*), análisis de perfiles y flujo metabólico (Wu *et al.*, 2010).

El análisis de muestras biológicas basado en NMR, tiene ventajas significativas para aplicaciones metabolómicas, pues requiere poca o ninguna preparación de la muestra y, como es no-destructiva, es capaz de generar un amplio perfil de metabolitos de bajo peso molecular a partir de biofluidos intactos y tejidos (Reo, 2002) y también es inherentemente cuantitativa.

Exitosos estudios han demostrado a la espectroscopia NMR como un método particularmente rico en información, que ofrece oportunidades únicas para mejorar la caracterización estructural y funcional de metabolitos, los cuales podrían ser esenciales para avanzar en la comprensión de muchos procesos biológicos (Winning, *et al.*, 2009). En este sentido se ha utilizado NMR de alto rendimiento para la detección de biomarcadores, desde la perspectiva del descubrimiento de drogas, cada uno de estos metabolitos podría cumplir una serie de funciones útiles. NMR es no selectivo tal que todos los compuestos de bajo peso molecular se detectan simultáneamente en una única prueba y proporciona información estructural rica lo cual es importante para caracterizar componentes de mezclas complejas.

Tarachiwin *et al.* (2007) utilizaron ^1H NMR para realizar la clasificación por calidades de té verde, que usualmente es clasificado por evaluación sensorial. Elaboraron el perfil metabólico (*fingerprinting*) de espectro de ^1H NMR, identificando los constituyentes químicos correlacionando con los mismos criterios de los jueces sensoriales y, de esta manera concibieron un modelo predictivo. Los marcadores de sabor contribuyeron a la discriminación de la calidad del té verde.



Figura 2. Equipo de NMR para análisis de muestras biológicas.

La combinación de técnicas metabólicas y análisis multivariante tiene una extraordinaria ventaja sobre el test sensorial, pues el estudio quimiométrico ofrece resultados más reales en la clasificación del té verde japonés.

Los avances en investigación de uso de NMR en alimentos ha sido abordado en varios estudios recientes con un alcance limitado, centrándose en aplicaciones de NMR o en particular de los alimentos, como el vino (Ogrinc *et al.* 2003), alimentos lácteos (Mariette, 2009) o aplicaciones específicas, tales como identificación de la autenticidad de alimentos (Mannina y Segre, 2002), investigación de las correlaciones entre la distribución del agua y la movilidad, capacidad de retención de agua, calidad de la carne (Pearce *et al.*, 2011), o evaluación e inspección de los parámetros de calidad de frutas (Butz *et al.*, 2005). Así como metabólica basada en NMR en control de calidad de alimentos (Tomassini *et al.*, 2013), metabólica de la leche (Sundekilde *et al.*, 2013).

A pesar de estas ventajas considerables, NMR sufre de ciertos inconvenientes; no es tan sensible como MS y requiere muestras relativamente grandes volúmenes. El tema de la sensibilidad se ha abordado por el

desarrollo de imanes con el incremento del campo de fuerza y mejoras en el diseño de los detectores NMR (Griffin, 2004); sin embargo, el análisis de los metabolitos de baja abundancia por espectroscopia NMR todavía puede resultar problemático (Figura 2).

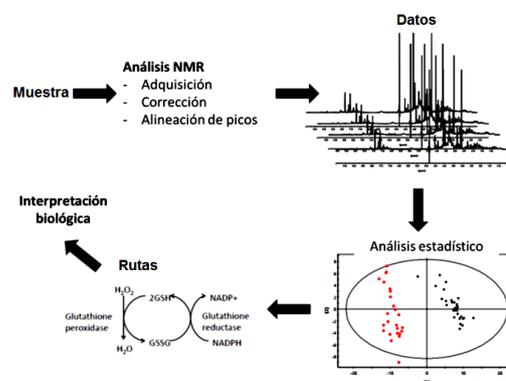


Figura 3. Pasos involucrados en un estudio de metabólica basada en NMR (Brennan, 2014).

para el análisis de muestras biológicas. La muestra se carga por la parte superior y central, siguiendo los pasos mostrados en la Figura 3, donde tras la recolección de muestras, los datos de NMR son adquiridos, procesados y convertidos en una matriz de datos adecuados para el análisis estadístico. Seguidamente, el mapeo de los metabolitos importantes en las rutas metabólicas ayuda a la interpretación biológica de los datos.

2.2 Espectrometría de masas: *Mass Spectrometry* (MS)

El proceso de análisis por espectrometría de masas está basado en el diferente comportamiento que presentan los iones que se forman por las diferentes técnicas de ionización, al atravesar campos eléctricos y magnéticos. Los iones son separados en función de su relación masa/carga (m/z) y detectados posteriormente. Un espectrometro de masas consta de varios componentes básicos: (1) Dispositivo de introducción de la muestra, (2) Cámara de ionización o fuente, donde se generan los iones a partir de las sustancias químicas a analizar (3) Analizador, que diferencia los iones generados en función de su relación m/z (4) Detector que produce una señal eléctrica amplificada para cada uno de los iones generados (Romero *et al.*, 2007) (Figura 4).

La alta sensibilidad de la MS combinada con su amplio rango dinámico es una herramienta muy poderosa para el análisis de grandes poblaciones de metabolitos, permitiendo un análisis cuantitativo reproducible, con capacidad de analizar biofluidos con extrema complejidad molecular (Lee *et al.*, 2010). La MS dentro de metabolómica puede perfilar el impacto del tiempo, el estrés, estado nutricional y perturbación medioambiental en cientos de metabolitos simultáneamente, dando como resultado un conjunto de datos globales o específicos (Zhang *et al.*, 2012).

La comunidad analítica ha iniciado esfuerzos para investigar biomarcadores metabólicos. El análisis del metaboloma facilita la reconstrucción de redes metabólicas, descubrimiento y anotación funcional de biomarcadores. Se requiere de múltiples técnicas analíticas, utilizadas de manera complementaria, para lograr una alta detección del metaboloma que se compone de un gran número de metabolitos de moléculas pequeñas, que existen sobre un amplio rango dinámico en muestras biológicas (Hiller *et al.*, 2010; Weston, 2010).

Sin embargo, la MS también tiene una serie de debilidades: requiere una preparación de muestra elevada, los metabolitos de bajo peso molecular de las muestras biológicas normalmente tienen que ser extraídos en solventes orgánicos, lo cual pueden resultar en pérdidas de ciertos compuestos. Además, posee eficiencia de ionización variable de metabolitos, lo que significa que la MS es incapaz de proporcionar cuantificación absoluta (Weckwerth y Fiehn, 2002), aunque las concentraciones de metabolitos de bajo peso molecular pueden ser determinadas con precisión por MS usando estándares internos de isótopos estables.

Los objetivos de desarrollo de MS en el rango metabolómico, se da a partir del entendimiento de la caracterización estructural de metabolitos importantes, hasta el descubrimiento de biomarcadores. Esta técnica puede utilizarse para analizar muestras biológicas mediante inyección directa o tras separación cromatográfica. Recientes estudios en la precisión de masa, han ampliado considerablemente la gama de metabolitos que pueden ser analizados

por MS y han mejorado la precisión de la identificación de compuestos. La inyección directa al MS puede proporcionar una técnica muy rápida para el análisis de un gran número de metabolitos y por lo tanto se utiliza extensivamente para huellas dactilares metabólicas (*fingerprinting*). Sin embargo, la inyección directa de muestras biológicas tiene algunas desventajas, incluyendo co-supresión y baja eficiencia de ionización (Zhang *et al.*, 2012). Estos problemas pueden ser aliviados por un sistema de cromatografía de acoplamiento al MS. El paso cromatográfico es capaz de reducir el número de analitos que compiten y que ingresan en el MS, adicionalmente de la separación de mezclas complejas de metabolitos (Pham-Tuan *et al.*, 2003).

Como resultado, la cromatografía líquida acoplada a MS está siendo muy utilizada para perfil de metabolitos de bajo peso molecular (Plumb *et al.*, 2002, 2003; Idborg-Bjorkman *et al.*, 2003) por lo que esta técnica analítica puede desempeñar un papel importante en las estrategias metabolómicas futuras (Aharoni *et al.*, 2002).



Figura 4. Esquema de un Espectrómetro de Masas.

Se ha aplicado MS acopladas a otras plataformas analíticas en la determinación de biomoléculas de proteína y péptidos en alimentos (Alomirah *et al.*, 2000), alérgenos alimentarios (Monaci y Visconti, 2009), toxicología alimentaria (Romero *et al.*, 2007), seguridad alimentaria, análisis de calidad (Wang *et al.*, 2013), trazabilidad (Castro-Puyana y Herrero, 2013).

2.3. Cromatografía de Gases – Espectrometría de Masas: *Gas Chromatography (GC) - Mass spectrometry (MS)*

El acoplamiento GC-MS combinando la técnica de separación y la detección e identificación de los componentes de una

mezcla o matriz compleja, es una técnica ampliamente utilizada en laboratorios analíticos de investigación y es una de las técnicas más atractivas y potentes para el análisis rutinario de contaminantes orgánicos debido a que ofrece gran sensibilidad y selectividad. En un sistema GC-MS, las muestras son introducidas al GC pasando éstas al estado gaseoso y mezclándose con un gas inerte que es empujado por una alta corriente de vacío hacia el analizador de MS. Una vez producida la separación, los compuestos separados van llegando al MS gracias a la corriente de vacío. Los compuestos se ionizan y los iones son seleccionados en relación a la razón m/z (McMaster *et al.*, 1998) (Figura 5).

En la actualidad, como un método analítico de metabolómica, se ha utilizado GC-MS como una plataforma de análisis *non-targeted* (no específica), especialmente para metabolitos hidrofílicos (Tsugawa *et al.*, 2011). Generalmente, la metabolómica basada en GC-MS requiere una tecnología de alto rendimiento para manejar un gran volumen de muestras e identificación precisa por picos a través de los tiempos de retención estándar y espectros de masas y puede proporcionar análisis eficiente y reproducible. Para la separación en la columna GC, GC-MS requiere una reacción de derivatización para crear compuestos volátiles (la derivatización es el proceso mediante el cual un compuesto se modifica químicamente, produciendo un nuevo compuesto que tiene propiedades más susceptibles de ser analizadas por un método analítico particular). Compuestos no volátiles no son derivatizados y no serán detectados en el análisis por GC-MS. Usando esta aproximación, los metabolitos volátiles pueden ser directamente separados y cuantificados por GC-MS, y es también posible determinar simultáneamente el perfil de varios cientos de compuestos que incluyen ácidos orgánicos, la mayoría de aminoácidos, azúcares, alcoholes con azúcar, aminas aromáticas y ácidos grasos, teniéndose que realizar previamente la derivación química. GC-MS ha sido ampliamente utilizado en la determinación de la composición de los alimentos y contaminantes y es particularmente

conveniente para los compuestos volátiles y semi volátiles (Wang *et al.*, 2013).

Ochoa (2011) evaluó el contenido de acrilamida en muestras de yuca, papa y plátano frito, siguiendo la metodología que incluyen la formación del producto de adición de bromo 2,3-dibromopropionamida para el análisis de cromatografía de gases con detector de captura de electrones CG-ECD (EPA, método 8032A) y GC-MS para el análisis de acrilamida en alimentos fritos empacados procedentes del mercado local colombiano.

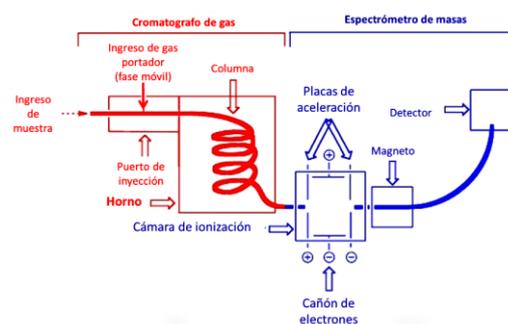


Figura 5. Esquema de un GC-MS.

2.4. Electroforesis Capilar - Espectrometría de Masas: *Capillary Electrophoresis (CE) - Mass Spectrometry (MS)*

CE ha surgido como una técnica de separación muy eficiente y se utiliza en varias formas de separación, como la zona de Electroforesis Capilar (*Capillary Zone Electrophoresis CZE*), normalmente conocido como "CE", Electro cromatografía Capilar (*Capillary Electrophoresis CEC*), Cromatografía Electrocinética Micelar (*Micellar Electrokinetic Chromatography MEKC*) y Enfoque de Iso-Eléctrico Capilar (*Capillary Iso-Electric Focusing CIEF*) (Ramautar *et al.*, 2012).

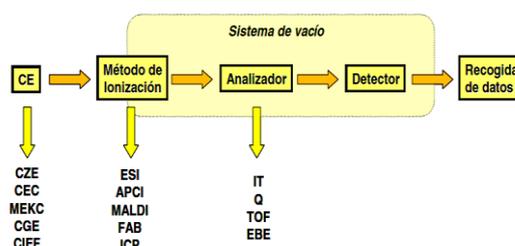


Figura 6. Esquema global de acoplamiento CE-MS (Hernández, 2005).

CE-MS es una técnica de química analítica formada por la combinación de los procesos de separación de líquidos de CE con MS (Loo *et al.*, 1989). Esto combina las ventajas de ambas técnicas para proveer alta eficiencia de separación e información de la masa molecular en un análisis simple (Cai y Henion, 1995). Tiene elevado poder de resolución y sensibilidad, requiere un volumen mínimo y puede analizar a alta velocidad.

Los iones se forman típicamente por la Ionización de *Electrospray* ESI (*Electrospray Ionization*) (Maxwell y Chen, 2008); pero también pueden ser formados por Láser Asistida por Matriz Desorción/Ionización MALDI (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*) u otras técnicas de ionización (Figura 6).

Esta es una técnica de separación potente y promisoría para metabolitos cargados, que ofrece una alta resolución de analitos, proporcionando información principalmente de compuestos polares o iónicos en fluidos biológicos (Barbas *et al.*, 2011). Representa una prometedora plataforma de micro-separación en metabolómica, debido a que la mayoría de los metabolitos primarios son polares (Britz-McKibbin, 2011). Los metabolitos son separados por CE basado en su tamaño y carga y luego selectivamente detectados utilizando MS mediante el control de los iones sobre una amplia gama de valores m/z (Figura 7), técnica que proporciona numerosas ventajas sobre otras técnicas de separación.

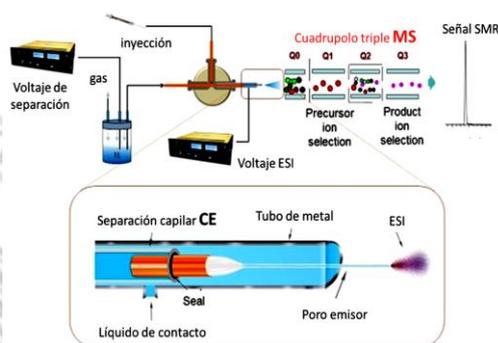


Figura 7. Esquema de un CE-MS.

Una de las ventajas significativas es un análisis de tiempo corto y requerimiento de muestras muy pequeñas con volúmenes de inyección que van desde 1 hasta 20 nL. Se ha utilizado para el análisis específicos y no específicos (*targeted* y *non-targeted*) de

metabolitos, incluyendo análisis de iones inorgánicos, ácidos orgánicos, aminoácidos, nucleótidos y nucleósidos, vitaminas, tioles, hidratos de carbono y péptidos.

2.5. Cromatografía Líquida – Espectrometría de Masas: *Liquid Chromatography (LC) - Mass Spectrometry (MS)*

Los sistemas LC-MS facilitan el análisis de las muestras que tradicionalmente han sido difíciles de analizar. A pesar de la potencia y utilidad de la GC-MS, muchos compuestos son imposibles de analizar con esta técnica. En este sentido LC-MS expande significativamente el uso analítico efectivo de MS a un número mucho mayor de compuestos orgánicos. GC y GC-MS puede utilizarse para analizar un pequeño porcentaje de los 9 millones de compuestos registrados debido a que imparten poco o ningún calor a las moléculas de analito. En cambio, los métodos basados en LC-MS pueden aplicarse a compuestos mayormente orgánicos, utilizando muestras que oscilan desde compuestos pequeños a proteínas de gran tamaño, resultando ser un método más aplicable, debido a que es adecuado para los análisis de compuestos grandes de naturaleza polar, iónica, inestables térmicamente y compuestos no volátiles. Algunos de estos compuestos pueden ser susceptibles a GC-MS por derivatización, pero LC-MS eliminan la necesidad de modificaciones químicas con consumo de tiempo. Esto permite el análisis por MS de sustancias lábiles y polares no volátiles, térmicamente lábiles o componentes no polares en su forma nativa

Cuando se configura para detectar simultáneamente un rango de masas (y dependiendo del compuesto) la sensibilidad de LC-MS puede ser comparable a aquella proporcionada por un Detector de Arreglo de Diodos DAD (*Diode-Array Detector*). Mayor sensibilidad es posible cuando los LC-MS se configuran para detectar solamente aquellas masas características de los compuestos a ser monitoreados. Por ejemplo, DAD adquiere datos sobre la Radiación Ultravioleta (UV) seleccionada y longitudes de onda (Vis) y espectros. Esta información es útil para la identificación de picos desconocidos y para la determinación de pureza de pico o para ambos. MS adquiere información de la masa mediante

la detección de iones; ofreciendo información de peso molecular y estructural. LC-MS puede utilizarse con analitos que no cuentan con cromóforos y, además, puede utilizarse como un detector altamente selectivo y sensible. Un cromatograma de MS para una masa simple a menudo produce una señal libre de interferencias, alta precisión y límite de detección mínimamente bajo (Hewlett-Packard Company, 1998). Esta técnica se usa en análisis de aflatoxinas y metabolitos tóxicos producidos por hongos en alimentos.

Muchos de los avances en LC-MS en los últimos años se han dado en el desarrollo de fuentes de iones y de técnicas que ionizan las moléculas del analito y separan los iones resultantes de la fase móvil. Se ha introducido técnicas de Ionización a Presión Atmosférica API (*Atmospheric Pressure Ionization*) que han expandido grandemente con éxito el número de compuestos a analizarse. Las técnicas comunes API (Agilent Technologies, 2001), se detallan en la Figura 8:

- Ionización *Electrospray* o Ionización Electroaerosol ESI (*Electrospray Ionization*)
- Ionización Química a Presión Atmosférica APCI (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*).
- Fotoionización a Presión Atmosférica APPI (*Atmospheric Pressure Photoionization*).

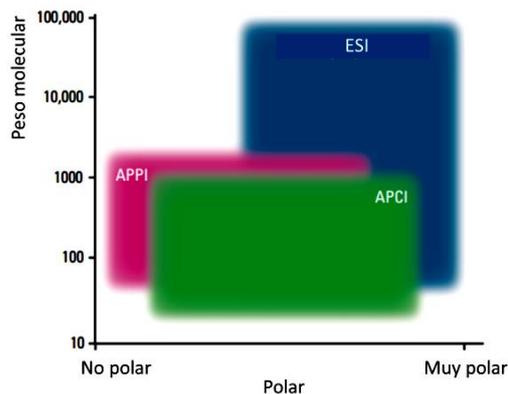


Figura 8. Aplicaciones de diferentes técnicas de ionización LC-MS (Agilent technologies, 2001).

El adelanto de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia HPLC (*High-Performance Liquid Chromatography*) y MS ha contribuido significativamente al análisis metabolómico y son usados comúnmente

para la caracterización de componentes y para obtener información estructural (Figura 9). Además, debe señalarse que LC-MS puede proporcionar una lista de valores m/z , tiempos de retención y una estimación de la abundancia relativa de los metabolitos que actualmente no se han identificado. En general, la alta resolución y medida reproducible establece la base para el posterior procesamiento y análisis de datos multivariantes. Esta tecnología metabolómica a gran escala, está ganando la atención para su uso en el diagnóstico de enfermedades humanas (Courant *et al.*; 2009), desarrollo de pruebas de diagnóstico robustas, sensibles y reproducibles, para el entendimiento de enfermedades en programas de control en todo el mundo; debido a su sensibilidad y reproducibilidad cuantitativa, además de constituirse en una herramienta esencial con potencial para monitorizar la progresión de la oncocercosis (Denery *et al.*, 2014), enfermedad parasitaria crónica causada por el gusano nematodo *Onchocerca volvulus* y transmitida por varias especies de moscas negras que han llegado a ser la segunda razón más importante de ceguera en el mundo.

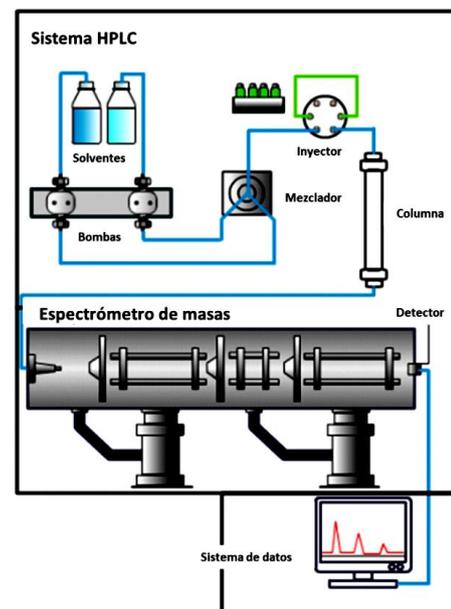


Figura 9. Diagrama LC-MS.

Considerando que el melón (*Curcumis melo* L.) puede potencialmente ser una fuente significativa de fitoquímicos proveedor del cuerpo humano de muchos beneficios para

la salud. Se ha utilizado HPLC-ESI-QTOF-MS para la caracterización de 14 extractos de 3 variedades de melón (Galia, Cantaloupe, Piel de Sapo). Un total de 56 diferentes compuestos fueron encontrados entre ellos: aminoácidos y sus derivados, nucleosidos, ácidos orgánicos, ácidos fenólicos y sus derivados, ésteres, flavonoides, ligninas y otros compuestos polares. Se utilizó Análisis de Componentes Principales (PCA) para determinar la distribución de las variedades de melón y los fitoquímicos encontrados. Según la evaluación estadística se ha llegado a identificar en las tres 3 variedades, 12 metabolitos de los tentativamente identificados (Rodríguez- Pérez *et al.*, 2013).

2.6. Cromatografía Líquida de Ultra Performance - Espectrometría de Masas: Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) - Mass Spectrometry (MS)

UPLC se basa en el principio del uso de la fase estacionaria consistente en partículas porosas menores de 2 μm , mientras que las columnas HPLC por lo general trabajan con partículas de 3 a 5 μm (Kumar *et al.*, 2012). La tecnología UPLC-MS (Figura 10) es una potente técnica en investigación molecular y también puede utilizarse para cuantificar la actividad de señalización y rutas metabólicas de manera integral y múltiple, dando como resultado una mayor capacidad de pico, mayor especificidad y capacidades de alto rendimiento (Figura 11). Debido a que su velocidad lineal tiene una gama más amplia, UPLC también permite un análisis más rápido sin pérdida de resolución.

La combinación de UPLC con MS permite identificar un número de metabolitos polares y por lo tanto aumenta el número de analitos detectados. En vista de los recientes desarrollos en las ciencias de la separación, el advenimiento de esta tecnología ha demostrado mejorar la resolución de especies de metabolitos y precisión de las mediciones de masas. Puede ser acoplado al UPLC, un Cuadrupolo-Tiempo de Vuelo con MS (Quadrupole-Time of Flight-Mass Spectrometry-Q-TOF-MS) (Figuras 12, 13, 14) para el análisis e identificación de componentes traza en mezclas complejas, el cual es un medio poderoso para obtener

niveles de precisión de medida de masa menores a 5 ppm, con resolución efectiva. Dado el poder de esta tecnología representa una prometedora plataforma de micro separación, debido a que la mayoría de los metabolitos primarios son intrínsecamente polares.

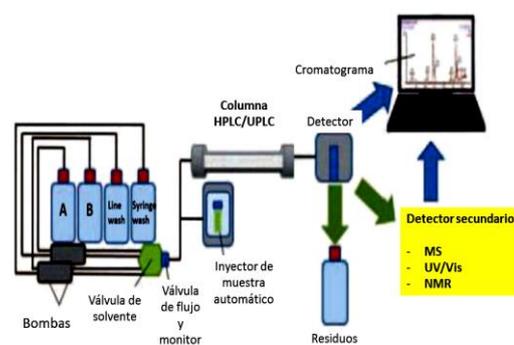


Figura 10. Sistemas alternativos HPLC/UPLC acoplado a MS / UV-Vis / NMR.

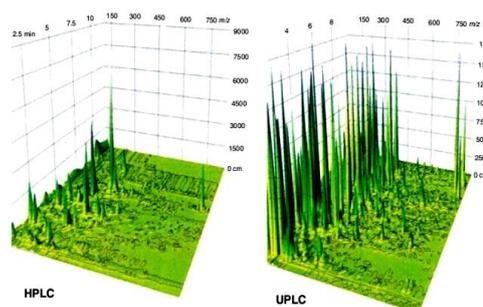


Figura 11. Diferencias entre HPLC y UPLC (Kumar *et al.*, 2012).

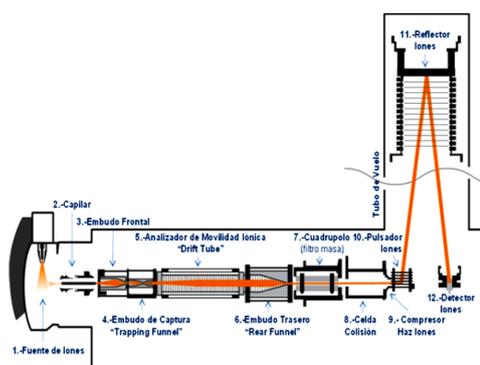


Figura 12. Esquema de un espectrómetro con Movilidad Iónica y QTOF (Ion Mobility-QTOF). Componentes del sistema QTOF: del 7 al 12. El Cuadrupolo aísla los iones precursores mediante la aplicación de 2 pares de radiofrecuencias con componentes de corriente continua.

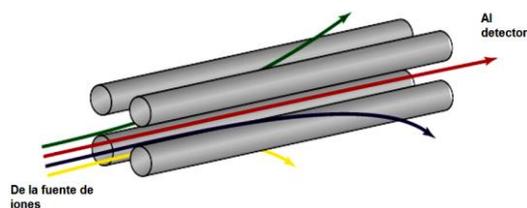


Figura 13. Analizador de Masa Quadrupolo (Agilent Technologies, 2001).

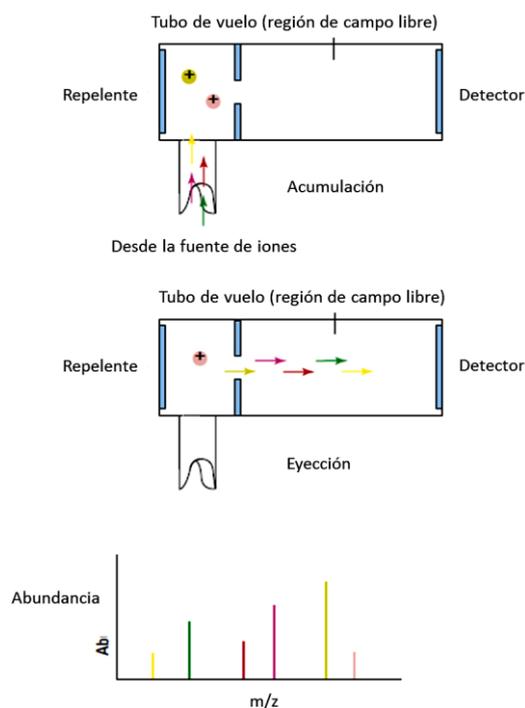


Figura 14. Analizador de Masa Tiempo de Vuelo (Agilent technologies, 2001).

Las desventajas del UPLC son que debido al aumento de la presión requiere mayor mantenimiento y reduce la vida de las columnas de este tipo; hasta el momento se ha demostrado un rendimiento similar o incluso mayor utilizando fases estacionarias de tamaño alrededor de 2 μm , sin los efectos adversos de alta presión, asimismo las fases de menores de 2 μm son generalmente no regenerables (Kumar *et al.*, 2012).

Narváez-Cuenca *et al.* (2011) utilizando papa adquirida en el mercado local de Wageningen (Holanda), identificaron y cuantificaron simultáneamente 39 compuestos fenólicos en papa, usando técnicas metabolómicas. Encontraron el ácido clorogénico en mayor proporción (25,43 \pm

0,49 mg/g m.s.), el ácido criptogénico (7,31 \pm 0,38 mg/g m.s.), ácido sinápico conjugado no hidrolizable (2,8 \pm 0,06 mg/g m.s.) y ácido neoclorogénico (2,41 \pm 0,10 mg/g ms). El ácido clorogénico ha sido reportado como una sustancia que inhibe algunos procesos relacionados con la iniciación del cáncer (Soriano y Pastore, 2012).

2.7. Espectroscopia Transformada de Fourier Infraroja: *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (FT-IR)

La técnica está basada en el análisis de una muestra con un haz infrarrojo, donde los grupos funcionales de la muestra absorben la radiación y vibran de una manera reconocida, cuyas vibraciones/absorciones pueden ser correlacionadas con especies químicas o bioquímicas. El resultado del espectro de la absorbancia infrarroja puede ser como una "huella digital" característica de la muestra bajo análisis y, por lo tanto cada sustancia química o bioquímica puede tener su propia y única huella "digital" infrarroja (Stuart, 1997).

FT-IR es una herramienta para la investigación y de diagnóstico que permite análisis extremadamente rápidos, alto rendimiento y es no destructivo para un amplio rango de tipos de muestras. Con respecto a aplicaciones biológicas su aplicación se da como CH_2 y CH_3 a partir de los ácidos grasos (espectro electromagnético 3050 - 2800 cm^{-1}), $\text{C}=\text{O}$, NH y $\text{C}-\text{N}$ a partir de proteínas y péptidos (1750-1500 cm^{-1}) y $\text{C}-\text{O}$, $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ de polisacáridos (1200 - 1900 cm^{-1}).

Asimismo FT-IR ha sido reconocido que no es tan específica ni sensible como las técnicas cromatográficas, tales como GC-TOF-MS (*Gas Chromatography/Time-of-Flight Mass Spectrometry*) (Dunn *et al.*, 2007; Underwood *et al.*, 2006) pero, si se constituye en una herramienta útil para la determinación de la huella digital metabólica, capaz de analizar: carbohidratos, aminoácidos, ácidos grasos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos, rápidamente y simultáneamente con una mínima cantidad de preparación de muestra (Dunn y Ellis, 2005.; Ellis *et al.*, 2002; Winder *et al.*, 2006).

Una de las limitaciones potenciales de esta técnica, es que la absorción de agua es muy intensa pero este problema puede ser superado por deshidratación de la muestra, sustracción de la señal de agua o usando reflectancia total atenuada (ATR) como método de muestreo (Ellis *et al.*, 2002; Ellis *et al.*, 2005; Walsh *et al.*; 2007). Alternativamente se puede usar la técnica vibracional relacionada con Espectroscopia Raman (*Raman spectroscopy*).

2.8. Tecnologías analíticas integradas

La tecnología metabolómica se aplica ampliamente en la actualidad en el campo de la biología y farmacia. NMR y la integración de MS a otras técnicas analíticas modernas han acelerado el estudio de cientos de metabolitos que son medidos simultáneamente por plataformas analíticas como GC-MS; LC-MS; NMR. La plataforma analítica de integración UPLC-MS ha reportado la mayor cantidad de picos detectados en melabómica de alimentos de 1560, seguidos de GC-MS: 91-142, CE-MS: 27-45, HPLC-UV: 40 y NMR: 16-20 (Cevallos-Cevallos *et al.*, 2009).

También existe la Cromatografía de Gas Bidimensional (*Two-Dimensional Gas Chromatography-2-D-GCxGC*) (Figura 15); 2-D-GCxGC-TOF-MS (Figura 16), y Matriz Asistida por Láser de Desorción/Ionización - Transformada de Fourier - Resonancia de Ion Ciclotrón - Espectrometría de Masas (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Fourier Transform - Ion Cyclotron Resonance - Mass Spectrometry- MALDI-FT-ICR-MS*) (Figuras 17 y 18) para obtener la concentración de los niveles de una manera fiable. 2-D-GCxGC-MS integrada, es una técnica poderosa que ha ganado cada vez más atención en las últimas dos décadas y puede proporcionar capacidad acrecentada de separación, química selectividad y sensibilidad para el análisis de muestras complejas, brindando información más precisa acerca de tiempos de retención de compuestos y espectros de masas (Mohler *et al.*, 2007).

Las muestras son inyectadas a través de una entrada estándar y separadas por la columna primaria.

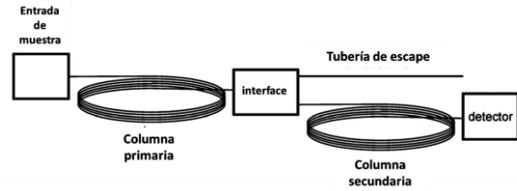


Figura 15. Construcción básica de un instrumento 2-D-GC.

Luego los componentes pasan a través de una interfaz que controla la entrada en una columna secundaria. Los componentes son detectados como procede de la elución de la columna secundaria (Seeley, 2012).

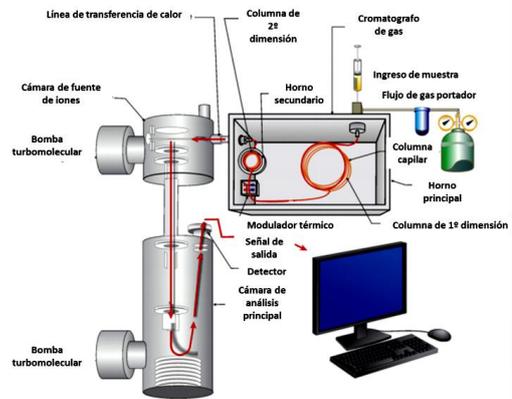


Figura 16. Sistema 2-D-GCxGC-TOF-MS.

Este sistema utiliza un modulador térmico quad-jet y un Espectrómetro de Masas de Tiempo de Vuelo de alta velocidad (Seeley, 2012).

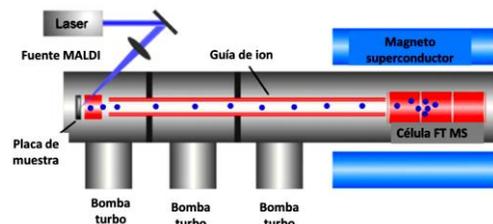


Figura 17. Principio de operación MALDI-FT-ICR-MS utilizado en análisis cuantitativo y cualitativo de compuestos de bajo peso molecular (Wang *et al.*, 2011).

Las tecnologías analíticas integradas se están convirtiendo en una piedra angular de la vida de las ciencias modernas. GCxGC-MS Bidimensional posee mucho

incremento de capacidad de separación, química selectividad y sensibilidad para la metabolómica y proporciona información más precisa acerca de tiempos de retención de metabolitos y espectros de masas (Castillo *et al.*, 2011).

GC-MS y LC-MS se han integrado para aproximar la señal metabólica integral del modelo de desnutrición en ratas y el descubrimiento de metabolitos diferenciadores (Wu *et al.*, 2010). Estos resultados han demostrado que la integración de técnicas GC-MS y LC-MS para el análisis de perfiles metabólicos no focalizados (*untargeted*) son prometedoras en nutriología.

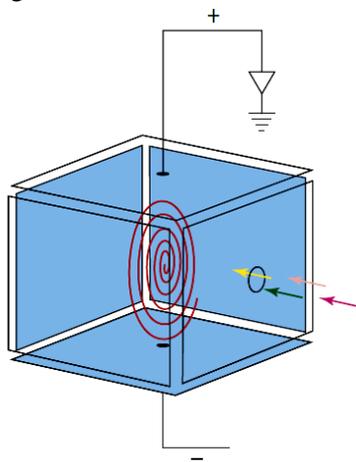


Figura 18. Analizador de Masas FT-ICR (Agilent technologies, 2001).

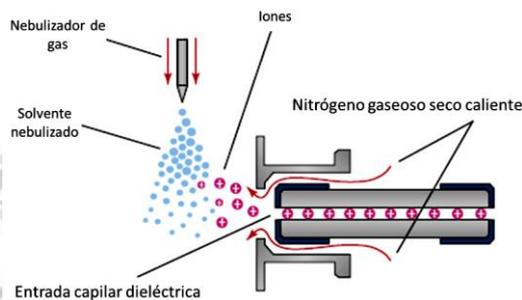


Figura 19. Electrospray ionization (ESI). Fuente: Agilent technologies (2001).

Una plataforma de innovación LC-MS-NMR se ha utilizado en la identificación de compuestos desconocidos, encontrando que, en concentraciones bajas en matrices de muestras complejas, proporciona mayor rendimiento que los métodos de inyección de flujo convencional (Lin *et al.*, 2008).

Un enfoque integrado de ionización ESI (*Electrospray Ionization*) (Figura 19), Ionización Química a Presión Atmosférica APCI (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*) (Figura 20) y Fotoionización a Presión Atmosférica APPI (*Atmospheric Pressure Photoionization*) (Figura 21) combinada con la resolución rápida LC-MS, se ha desarrollado para realizar análisis metabolómicos globales en muestras biológicas complejas (An *et al.*, 2010). Este enfoque propuesto proporciona una imagen más completa de los cambios metabólicos, verificando biomarcadores idénticos que se obtienen simultáneamente utilizando métodos diferentes de ionización.

Un nuevo hallazgo a partir del enfoque de la Interacción Hidrofílica y la Cromatografía Líquida de Ultraperformance HILIC-UPLC-MS (*Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*) ha sido investigado para la determinación del perfil metabólico global de muestras de orina de ratas generadas en un estudio experimental de hepatotoxicidad de galactosamina y la investigación concomitante del efecto protector de la glicina (Spagou *et al.*, 2011). HILIC ofrece un enfoque alternativo para separar compuestos polares pequeños en fases estacionarias polares, aumentando el alcance de las aplicaciones de la cromatografía líquida (LC) (Buszewski y Noga, 2012).

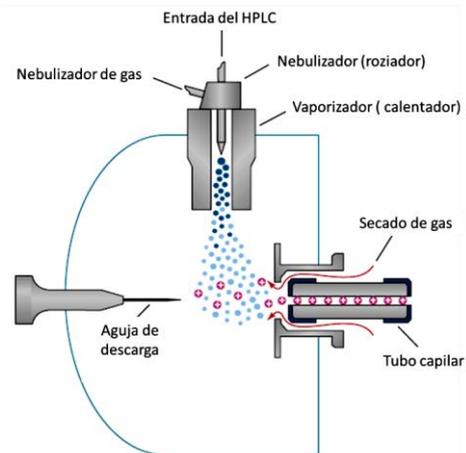


Figura 20. Fuente de iones APCI (Agilent technologies, 2001).

Asimismo, aunque NMR, GC-MS, LC-MS y UPLC-MS suelen utilizarse para el análisis a gran escala, la metabolómica no se limita solamente a estas técnicas. Otras

alternativas pueden incluir Cromatografía en Capa Fina, HPLC con UV/Absorbancia Visible, Matriz con Fotodiodos, Detectores Electroquímicos, FT-IR, MALDI-FT-ICR-MS y ensayos de naturaleza enzimática.

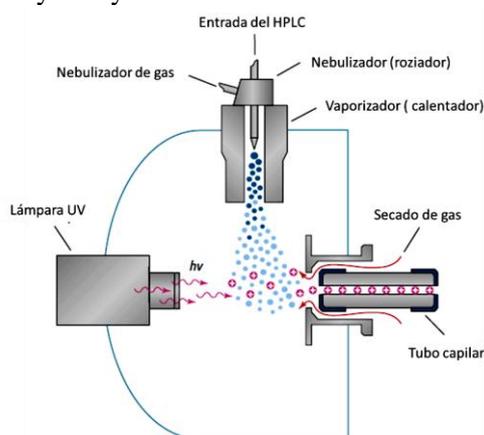


Figura 21. Fuente de iones APPI (Agilent technologies, 2001).

El uso combinado de varias técnicas o múltiples detectores pueden aumentar significativamente los límites de cuantificación de metabolitos. Así instrumentos FT-MS pueden proporcionar medidas exactas de masas en ppm y sub-ppm (Junot *et al.*, 2010). MALDI-MS tiene capacidad de moléculas pequeñas con masas molares por debajo de 1000 Da, ofreciendo un análisis rápido, alta sensibilidad, bajo consumo de muestra, alta tolerancia a sales y buffers (Van Kampem, 2011). FT-ICR-MS muestra potencial para análisis metabolómico potente de alto rendimiento (Han *et al.*, 2008). Tecnologías basadas en API/MS, especialmente aquellos con ionización por electronebulización, actualmente son muy populares (Werner *et al.*, 2008). HILIC por su retención de compuestos polares y capacidad de uso de solventes compatibles con MS, se aplican en estudios de metabolomas acuosos complejos (Cubbon *et al.*, 2010).

2.9. Identificación de los metabolitos de bajo peso molecular

La identificación de metabolitos en los sistemas biológicos puede conducir a la selección de las rutas metabólicas específicas, que pueden proporcionar una mayor significancia de los mecanismos de ciertos cambios metabólicos. Sin embargo, las herramientas bioinformáticas requeridas

para interpretar datos espectrales e identificar metabolitos de bajo peso molecular todavía están siendo desarrollados (Mendes, 2002; Kell, 2004).

Los investigadores en el campo de la genómica y proteómica, pueden acceder a bases de datos como Genbank o Swiss-Prot, para determinar rápidamente la identidad de un gen o proteína, pero actualmente no hay ninguna base de datos equivalente para análisis metabolómicos. Mientras que hay algunas bibliotecas espectrales disponibles para la comparación de datos de NMR o MS, la estructura de los metabolitos de bajo peso molecular en gran parte se determinan manualmente, el cual es un proceso lento.

3. Aplicación de la metabolómica

En sus inicios la metabolómica ha tenido impactos significativos en los campos de la biología y la medicina (Whitfield *et al.*, 2004). Posteriormente se han desarrollado: estudios de las funciones de los genes, a través de la determinación del perfil metabólico los que se han utilizado para explorar la función de estos en plantas, levaduras y animales de experimentación.

3.1 Metabolómica y nutrición

La llegada de la era post-genómica ha permitido a los investigadores indagar los efectos de los nutrientes en las funciones fisiológicas en el hombre y los animales a nivel molecular (Elliott y Ong, 2002; Ordovas y Mooser, 2004; Van Ommen, 2004).

La influencia de la nutrición en el desarrollo de enfermedades es ampliamente comprendida y es bien conocido que las enfermedades crónicas pueden tener componentes tanto dietéticos y genéticos (Go *et al.* 2003; Milner, 2003). La metabolómica está especialmente preparada para explorar las complejas relaciones entre nutrición y metabolismo e investigar el papel que juegan los componentes dietéticos en la salud y las enfermedades (Watkins *et al.*, 2001). Adicionalmente, tiene el potencial para explorar el control homeostático y cómo este balance metabólico puede ser alterado por las deficiencias o excesos de componentes de la dieta (German *et al.* 2003b). El valor potencial de la metabolómica a la nutrición

ya ha sido demostrado en estudios que han examinado el metabolismo del glucósido de etilo (Teague *et al.*, 2004) e isoflavonas (Solanky *et al.* 2003) encontradas en la dieta.

Los investigadores también han comenzado a utilizar estrategias basadas en la metabolómica para analizar amplias clases de metabolitos endógenos y en particular, los lípidos que se encuentran entre las moléculas más estudiadas dentro de las ciencias nutricionales. Ya que juegan un papel fundamental en muchos procesos fisiológicos y sus concentraciones son a menudo modificadas en enfermedades metabólicas (German *et al.* 2003a). En este sentido se ha aplicado NMR y MS acoplada a Cromatografía Líquida en investigaciones de metabolómica en nutrición (Brennan, 2014).

3.2 Metabolómica y alimentos

Marcone *et al.* (2013) reportan diversas aplicaciones en alimentos basados en tecnología de NMR e Imágenes por Resonancia Magnética MRI (*Magnetic Resonance Imaging*). MRI, es un tipo de tecnología NMR, la que se ha utilizado extensivamente en radiología médica, para obtener imágenes de diagnóstico de tejidos blandos. En ciencia de alimentos se han explorado el uso de NMR y de MRI en análisis y procesamiento de alimentos. MR *imaging* o MRI opera con un bajo campo de relajación de ^1H NMR o NMR de alto campo de proyección de imagen y ha demostrado tener potencial para predecir atributos de calidad en alimentos, así como ser un método atractivo en la producción de alimentos en línea, aspecto que puede ser de utilidad en el futuro (Thybo *et al.*, 2004). Al respecto se ha realizado análisis de composición química e identificación estructural de componentes funcionales en alimentos, determinación de la composición y formulación de materiales de embalaje, detección de autenticación de alimentos, optimización de parámetros de procesamiento de alimentos e inspección de la calidad microbiológica y fisicoquímica de alimentos. Aplicados a: vino, queso, frutas, verduras, carne, pescado, bebidas (jugo de tomate y la pulpa, té verde, café) y aceites comestibles. Combinadas con espectros-

copia FT-IR-ATR (*Attenuated Total Reflectance*) (Figura 22), HR-MAS (^1H *High Resolution - Magic Angle Spinning*), ^1H - ^1H TOCSY (*Total Correlation Spectroscopy*) y ^1H - ^{13}C HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*); secuencia de pulsos CPMG (*Carr-Purcell-Meiboom-Gill*). También análisis con Correlación Espectroscópica 1D, 2D ^1H (*COSY sequence*), LF-NMR (*Low Field - Nuclear Magnetic Resonance*) y CPMG. TD-NMR (*Time-Domain Nuclear Magnetic Resonance*) y NOESY-PRESAT (*Nuclear Overhauser Spectroscopy - Presaturation*).

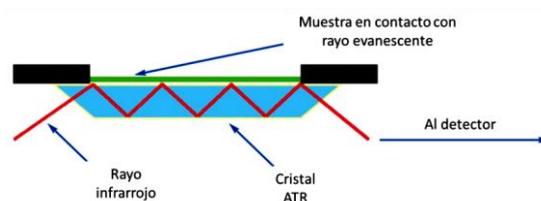


Figura 22. Sistema de Reflexión Múltiple ATR.

Wang *et al.* (2013) reportan desarrollos y aplicaciones en seguridad y calidad alimentaria utilizando LC-MS con acoplamientos: LC-QqQ-MS (QqQ *triple quadrupole*), LC-IT-MS (IT *Ion Trap*) y LC-Q-LIT-MS (Q-LIT *Quadrupole-linear ion-trap*), LC-TOF-MS y LC-Q-TOF-MS, LC-Orbitrap-MS (anализador *orbitrap*) y LC-FT-ICR-MS. También aplicaciones de GC-MS con acoplamientos GC-Q-MS, GC-QqQ-MS, GC-IT-MS, GC-TOF-MS y GC-Q-TOF-MS, GCxGC-MS. Asimismo aplicaciones de MALDI-TOF en análisis de seguridad y calidad alimentaria, MALDI-TOF-MS para análisis de tejidos y MSI (*Mass Spectrometric Imaging*).

Valdés *et al.* (2013) reportan estrategias ómicas en el análisis de los alimentos transgénicos empleando NMR en maíz, guisantes, trigo, lechuga y papa. GC-EI-Q-MS (EI-Q *electron ionization-quadrupole*) en papa, tomate, arroz, frambuesas, pepino, soya y maíz. GC-EI-TOF-MS en pepino y papa. LC-ESI-Q-MS en papa, arroz, tomate. LC-ESI-Q/TOF-MS en arroz. CE-ESI-TOF-MS en maíz y soya. CE-ESI-Q-MS en arroz, FT-ICR-MS en maíz y arroz. Multiplataforma: GC-EI-Q-MS y LC-ESI-IT-MS en vid. Multiplataforma: GC-EI-Q-

MS y LC-ESI-Q-MS en papaya. Multiplataforma: GC-EI-TOF-MS, LC-ESI-Q/TOF-MS y CE-ESI-Q/TOF-MS en tomate. Alomirah *et al.* (2000) reportan aplicaciones de MS acopladas a ESI o MALDI-TOF en péptidos y proteínas de alimentos: el leche y productos lácteos (proteína de suero, proteínas de la caseína), carne y pescado; péptidos y proteínas vegetales (cereales, semillas de leguminosas).

Oztop *et al.* (2010) utilizando NMR-MRI reportan cuantificaron de los cambios en el contenido de agua y geometría de geles de proteína de suero de leche. Thybo *et al.* (2004) utilizando MRI atributos de calidad sensorial de la textura de patatas cocidas. Létal *et al.* (2003) en rebanadas de manzana, análisis de textura durante la maduración y almacenamiento.

4. Apreciación crítica

La presencia de metabolitos pequeños en los alimentos representa productos finales de procesos regulatorios celulares e indican la respuesta de los sistemas biológicos a una variedad de influencias genéticas y ambientales. Una estrategia metabolómica implica el uso de modernas técnicas analíticas para determinar las poblaciones globales de metabolitos en las muestras biológicas y en este sentido se ha podido contrastar que se han logrado avances considerables, para medir e interpretar perfiles de metabolitos complejos. Sin embargo, no es posible analizar todos los metabolitos de bajo peso molecular con una sola plataforma analítica. Las técnicas utilizadas con mayor frecuencia para los estudios de metabolómica son espectroscopia NMR y MS (*Nuclear Magnetic Resonance* y *Mass Spectrometry*). De esta manera NMR y la integración de MS a otras técnicas analíticas modernas han acelerado el estudio de cientos de metabolitos.

Las plataformas analíticas: Cromatografía de Gases GC (*Gas Chromatography*), Cromatografía Líquida de Alta Resolución HPLC (*High-Performance Liquid Chromatography*), Cromatografía Líquida de Ultra Performance UPLC (*Ultra Performance Liquid Chromatography*), Electroforesis Capilar CE (*Capillary Electrophoresis*)

acoplados a MS y espectroscopia NMR, pueden permitir la separación, detección, caracterización y cuantificación en metabolómica de alimentos. NMR, GC-MS, LC-MS y UPLC-MS suelen utilizarse para el análisis a gran escala, pero la metabolómica no se limita solamente a estas técnicas. Existe un aspecto que es importante NMR tiene menos sensibilidad que los equipos de MS y sus acoples. Ambos tienen alta reproducibilidad. NMR utiliza en la preparación de muestras en solventes adecuadas y no hay mayor modificación interna de los metabolitos. En cambio, MS utiliza extracción de muestras en solventes adecuados y los metabolitos internos pueden ser alterados.

5. Conclusiones

Monitoreo de cientos o más metabolitos requiere de técnicas de alto rendimiento y alta calidad. No es posible analizar todos los metabolitos de bajo peso molecular con una sola plataforma analítica. La mayoría de las técnicas analíticas metabolómicas encontradas en análisis de alimentos, seguridad y calidad alimentaria son: Cromatografía de Gases GC (*Gas Chromatography*), Cromatografía Líquida de Alta Resolución HPLC (*High-Performance Liquid Chromatography*), Cromatografía Líquida de Ultra Performance UPLC (*Ultra Performance Liquid Chromatography*), Electroforesis Capilar CE (*Capillary Electrophoresis*) acoplados a espectrometría de masas MS (*Mass Spectrometry*) y espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear NMR (*Nuclear Magnetic Resonance*).

Referencias

- Aharoni, A.; Ric de Vos, C.H.; Verhoeven, H.A.; Maliepaard, C.A.; Kruppa, G.; Bino, R.; Goodenowe, D.B. 2002. Non-targeted metabolome analysis by use of Fourier transform ion cyclotron mass spectrometry. *OMICS* 6: 217-234.
- Alomirah, H.F.; Alli, I.; Konishi, Y. 2000. Applications of mass spectrometry to food proteins and peptides. *Journal of Chromatography A* 893: 1-21.
- Agilent Technologies. Innovating HP Way. Basics of LC/MS. 2001. Disponible en: <http://ccc.chem.pitt.edu/wipf/Agilent%20LC-MS%20primer.pdf>

- An, Z.; Chen, Y.; Zhang, R.; Song, Y.; Sun, J.; He, J.; Bai, J.; Dong, L.; Zhan, Q.; Abliz, Z.; 2010. Integrated ionization approach for RRLC-MS/MS-based metabolomics: finding potential biomarkers for lung cancer. *J. Proteome Res.* 9: 4071-4081.
- Barbas, C.; Moraes, E.P. Villaseñor, A. 2011. Capillary electrophoresis as a metabolomics tool for non-targeted fingerprinting of biological samples. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 55: 823-831.
- Brennan, L. 2014. NMR-based metabolomics: From sample preparation to applications in nutrition research. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 83: 42-49.
- Britz-McKibbin, P. 2011. Capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry (CE-ESI-MS)-based metabolomics. *Methods Mol. Biol.* 708: 229-246.
- Buszewski, B.; Noga, S. 2012. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—a powerful separation technique. *Anal Bioanal Chem.* 402(1): 231-247.
- Butz, P.; Hofmann, C.; Tauscher, B. 2005. Recent developments in noninvasive techniques for fresh fruit and vegetable internal quality analysis. *Journal of Food Science* 70(9): 131-141.
- Cai, J.; Henion, J. 1995. Capillary electrophoresis-mass spectrometry". *Journal of Chromatography A* 703: 667-692.
- Castillo, S.; Mattila, I.; Miettinen, J.; Orešič, M.; Hyötyläinen, T. 2011. Data analysis tool for comprehensive two-dimensional gas chromatography-time of flight mass spectrometry. *Anal. Chem.* 83(8): 3058-3067.
- Castro-Puyana, M.; Herrero, M. 2013. Metabolomics approaches based on mass spectrometry for food safety, quality and traceability. *Trends in Analytical Chemistry* 52: 74-87.
- Cevallos-Cevallos, J.M.; Reyes-De-Corcuera, J.I.; Etxeberria, E.; Danyluka, M.D.; Rodrick, G.E. 2009. Metabolomic analysis in food science: a review. *Trends in Food Science & Technology* 20: 557-566.
- Clayton, P.T. 2001. Applications of mass spectrometry in the study of inborn errors of metabolism. *J Inherit Metab Dis* 24: 139-150.
- Courant, F.; Pinel, G.; Bichon, E.; Monteau, F.; Antignac, J.P.; Le Bizec, B. 2009. Development of a metabolomic approach based on liquid chromatography-high resolution mass spectrometry to screen for clenbuterol abuse in calves. *Analyst.* 134: 1637-1646.
- Cubbon, S.; Antonio, C.; Wilson, J.; Thomas-Oates, J. 2010. Metabolomic applications of HILIC-LC-MS. *Mass Spectrom. Rev.* 29: 671-684.
- Chayaprasert, W.; Strohshine, R. 2005. Rapid sensing of internal browning in whole apples using a low-cost, low-field proton magnetic resonance sensor. *Postharvest Biology and Technology* 36(3): 291-301.
- Denery, J.R.; Nunes, A.A.; Hixon, M.S.; Dickerson, T.J.; Janda, K.D. 2014. Metabolomics-based discovery of diagnostic biomarkers for onchocerciasis. *PLoS Negl Trop Dis.* 4(10): pii: e834.
- Dunn, W.B.; Broadhurst, D.I.; Deeppak, S.M. 2007. Serum metabolomics reveals many novel metabolic markers of heart failure, including pseudouridine and 2-oxoglutarate. *Metabolomics* 3. (IP).
- Dunn, W.B.; Ellis, D.I. 2005. Metabolomics: current analytical platforms and methodologies: *TrAC. Trends Analyt. Chem.* 24(4): 285-294.
- Elliott, R.; Ong, T.J. 2002. Nutritional genomics. *BMJ* 324: 1438-1442.
- Ellis D.I.; Broadhurst, D.; Kell, D.B.; Rowland, J.J.; Goodacre, R.; 2002. Rapid and quantitative detection of the microbial spoilage of meat by Fourier transform infrared spectroscopy and machine learning. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(6): 2822-2828.
- Ellis, D.I.; Broadhurst, D.; Clarke, S.J.; Goodacre, R. 2005. Rapid identification of closely related muscle foods by vibrational spectroscopy and machine learning. *Analyst* 130(12): 1648-1654.
- Fiehn, O.; Kloska, S.; Altmann, T. 2001. Integrated studies on plant biology using multiparallel techniques. *Curr Opin Biotechnol* 12: 82-86.
- Fiehn, O. 2002. Metabolomics- the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol Biol* 48: 155-171.
- German J.B.; Roberts, M.A.; Watkins, S.M. 2003 (a). Genomics and metabolomics as markers for the interaction of diet and health: lessons from lipids. *J Nutr* 133: 2078-2083.
- Glassbrook, N.; Ryals, J. 2001. A systemic approach to biochemical profiling. *Curr Opin Plant Biol* 4: 186-190.
- Go, V.L.; Butrum, R.R.; Wong, D.A. 2003. Diet, nutrition and cancer prevention: the postgenomic era. *J Nutr* 133: 3830-3836.
- Griffin, J.L. 2004. Metabonomics: NMR spectroscopy and pattern recognition analysis of body fluids and tissues for characterization of xenobiotic toxicity and disease diagnosis. *Curr Opin Chem Biol* 7: 648-654.
- Han, X.; Gross, R.W. 2003. Global analyses of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples by ESI mass spectrometry: a bridge to lipidomics. *J Lipid Res* 44: 1071-1079.
- Han, J.; Danell, R.M.; Patel, J.R.; Gumerov, D.R.; Scarlett, C.O.; Speir, J.P.; Parker, C.E.; Rusyn, I.; Zeisel, S.; Borchers, C.H. 2008. Towards high-throughput metabolomics using ultrahigh-field Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Metabolomics* 4(2): 128-140.
- Hernández, J. 2005. Nuevas metodologías de análisis de pesticidas por electroforesis capilar. Tesis Doctoral. Servicio de publicaciones Universidad de la Laguna. Pp. 244.
- Hewlett-Packard Company, 1998. Basics of LC/MS. Disponible en: <http://www.chem.agilent.com/library/support/documents/a05296.pdf>
- Hiller, K.; Metallo, C.M.; Kelleher, J.K.; Stephanopoulos, G. 2010. Nontargeted elucidation of metabolic pathways using stable-isotope tracers and mass spectrometry. *Anal. Chem.* 82(15): 6621-6628.
- Idborg-Bjorkman, H.; Edlund, P.O.; Kvalheim, O.M.; Schuppe-Koistinen, I.; Jacobsson, S.P. 2003. Screening of biomarkers in rat urine using LC/electrospray ionisation-MS and two-way data analysis. *Anal Chem* 75: 4784-4792.

- Junot, C.; Madalinski, G.; Tabet, J.C.; Ezan, E. 2010. *Analyst* 135: 2203-2219.
- Kell, D.B. 2004. Metabolomics and systems biology: making sense of the soup. *Curr Opin Microbiol* 7: 296-307.
- Kumar, T.S.; Balammal, G.; Kumar, A.S. 2012. Ultra performance liquid chromatography: an introduction and review. *International Journal of Pharmaceutical. Research & Analysis.* 2(1): 24-31.
- Lee do, Y.; Bowen, B.P.; Northen, T.R. 2010. Mass spectrometry-based metabolomics, analysis of metabolite-protein interactions, and imaging. *BioTechniques* 49(2): 557-565.
- Létal, J.; Jiráček, D.; Šuderlová, L.; Hájek, M. 2003. MRI 'texture' analysis of MR images of apples during ripening and storage. *LWT-Food Science and Technology* 36(7): 719-727.
- Lin, Y.Q.; Schiavo, S.; Orjala, J.; Vouros, P.; Kautz, R. 2008. Microscale LC-MS-NMR platform applied to the identification of active cyanobacterial metabolites. *Anal. Chem.* 80: 8045-8054.
- Loo, J.A.; Udseth, H.R.; Smith R.D. 1989. Peptide and protein analysis by electrospray ionization-mass spectrometry and capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 179(2): 404-12.
- Mannina, L.; Segre, A. 2002. High resolution nuclear magnetic resonance: From chemical structure to food authenticity. *Grasas y Aceites* 53(1): 22-33.
- McMaster, M.; McMaster, C. 1998. GC/MS. A practical user's guide. United America, Wiley-VCH.
- Marcone, M.F.; Wang, S.; Albabish, W.; Nie, S.; Somnarain, D.; Hill, A. 2013. Diverse food-based applications of nuclear magnetic resonance (NMR) technology. *Food Research International* 5: 729-747.
- Mariette, F. 2009. Investigations of food colloids by NMR and MRI. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 14(3): 203-211.
- Maxwell, E.J.; Chen, D.D. 2008. Twenty years of interface development for capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 627 (1): 25-33.
- Mendes, P. 2002. Emerging bioinformatics for the metabolome. *Brief Bioinform* 3: 134-145.
- Milner, J.A. 2003. Incorporating basic nutrition science into health interventions for cancer prevention. *J Nutr* 133: 3820-3826.
- Mohler, R.E.; Dombek, K.M.; Hoggard, J.C.; Pierce, K.M.; Young, E.T.; Synovec, R.E. 2007. *Analyst* 132: 756-767.
- Monaci, L.; Visconti, A. 2009. Mass spectrometry-based proteomics methods for analysis of food allergens. *Trends in Analytical Chemistry* 28(5): 581-591.
- Narváez-Cuenca, C.E.; Vincken J.P.; Gruppen, H. 2011. Identification and quantification of (dihydro) hydroxycinnamic acids and their conjugates in potato by UHPLC-DAD-ESI-MSⁿ. *Food Chemistry* 130: 730-738.
- Nicholson, J.K.; Lindon, J.C.; Holmes, E. 1999. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica* 29: 1181-1189.
- Nicholson, J.K.; Connelly, J.; Lindon J.C.; Holmes, E. 2002. Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function. *Nat Rev Drug Discov* 1 153-161.
- Novoa-Carballal, R.; Fernandez-Megia, E.; Jimenez, C.; Riguera, R. 2011. NMR methods for unravelling the spectra of complex mixtures. *Natural Product Reports* 28(1): 78-98.
- Ochoa, L.M. 2011. Implementación de una metodología GC- ECD y GC-MS para la cuantificación y determinación de acrilamida en alimentos procesados a altas temperaturas. Tesis Química. Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga. Pp. 71.
- Ogrinc, N.; Kosir, I. J.; Spangenberg, J. E.; Kidric, J. 2003. The application of NMR and MS methods for detection of adulteration of wine, fruit juices, and olive oil. A review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 376(4): 424-430.
- Ordovas, J.M.; Mooser, V. 2004. Nutrigenomics and nutrigenetics. *Curr Opin Lipidol* 15: 101-108.
- Oztop, M.H.; Rosenberg, M.; Rosenberg, Y.; McCarthy, K.L.; McCarthy, M.J. 2010. Magnetic resonance imaging (MRI) and relaxation spectrum analysis as methods to investigate swelling in whey protein gels. *Journal of Food Science* 75(8): 508-515.
- Palencia, R. 2002. Enfermedades peroxisomales. Estado actual. *Bol Pediatr, Asturias, Cantabria, Castilla y León. España;* 42: 217-229.
- Pearce, K.L.; Rosenvold, K.; Andersen, H.J.; Hopkins, D.L. 2011. Water distribution and mobility in meat during the conversion of muscle to meat and ageing and the impacts on fresh meat quality attributes-A review. *Meat Science* 89(2): 111-124.
- Pham-Tuan, H.; Kashavelis, L.; Daykin, C.A.; Janssen, H.G. 2003. Method development in high-performance liquid chromatography for high throughput profiling and metabolomic studies of biofluid samples. *J Chromatogr* 789B: 283-301.
- Plumb, R.S.; Stumpf, C.L.; Gorenstein, M.V.; Castro-Perez, J.M.; Dear, G.J.; Anthony, M.; Sweatman, B.C.; Connor, S.C.; Haselden, J.N. 2002. Metabonomics: the use of electrospray mass spectrometry coupled to reversed-phase liquid chromatography shows potential for the screening of rat urine in drug development. *Rapid Commun Mass Spectrom* 16: 1991-1996.
- Plumb, R.S.; Stumpf, C.L.; Granger, J.H.; Castro-Perez, J.; Haselden, J.N.; Dear, G.J. 2003. Use of liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry and multivariate statistical analysis shows promise for the detection of drug metabolites in biological fluids. *Rapid Commun Mass Spectrom* 17: 2632-2638.
- Ramautar, R.; Heemskerk, A.A.M.; Hensbergen, P.J.; Deelder, A.M.; Busnel, J.-M.; Mayborod, O.A. 2012. CE-MS for proteomics: Advances in interface development and application. *Journal of Proteomics* 75: 3814- 3828.
- Rashed, M.S. 2001. Clinical applications of tandem mass spectrometry: ten years of diagnosis and screening for inherited metabolic diseases. *J Chromatogr* 758B: 27-48.

- Reo, N.V. 2002. NMR-based metabolomics. *Drug Chem Toxicol* 25: 375-382.
- Romero, R.; Fernández, J.; Plaza, P.; Garrido, A.; Martínez, J. 2007. Empleo de la espectrometría de masas como herramienta para la determinación de tóxicos en alimentos: hacia la seguridad alimentaria. *Rev Esp Salud Pública* 81: 461-474.
- Rodríguez-Perez, C.; Quirantes-Piné, R.; Fernández-Gutiérrez, A.; Segura-Carretero, A. 2013. Comparative characterization of phenolic and other polar compounds in Spanish melon cultivars by using high performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization quadrupole-time of flight mass spectrometry. *Food Research International* 54(2): 1519-1527.
- Seeley, J.V. 2012. Multidimensional and Comprehensive Gas Chromatography. Elsevier Inc. 7: 161-184.
- Solanky, K.S.; Bailey, N.J.; Beckwith-Hall, B.M.; Davis, A.; Bingham, S.; Holmes, E.; Nicholson, J.K.; Cassidy, A. 2003. Application of biofluid ¹H nuclear magnetic resonance-based metabonomic techniques for the analysis of the biochemical effects of dietary isoflavones on human plasma profile. *Anal Biochem* 323: 197-204.
- Soriano, R.A.; Pastore, G.M. 2012. Evaluation of the effects of anthocyanins in type 2 diabetes. *Food Research International* 46: 378-386.
- Spagou, K.; Wilson, I.D.; Masson, P.; Theodoridis, G.; Raikos, N.; Coen, M.; Holmes, E.; Lindon, J.C.; Plumb, R.S.; Nicholson, J.K.; Want, E.J. 2011. HILIC-UPLC-MS for exploratory urinary metabolic profiling in toxicological studies. *Anal. Chem.* 83(1): 382-390.
- Stuart, B. 1997. *Biological Applications of Infrared Spectroscopy*. Jhon Wiley & Sons. Chichester, UK.
- Su, X.; Han, X.; Yang, J.; Mancuso, D.J.; Chen, J.; Bickel, P.E.; Gross, R.W. 2004. Sequential ordered fatty acid oxidation and D9 desaturation are major determinants of lipid storage and utilization in differentiating adipocytes. *Biochemistry* 43: 5033-5044.
- Sundekilde, U.K.; Larsen, L.B.; Bertram, H.C. 2013. NMR-Based Milk Metabolomics. *Metabolites* 3: 204-222.
- Tarachiwin, L.; Ute, K.; Kobayashi, A.; Fukusaki. 2007. ¹H NMR based metabolic profiling in the evaluation of Japanese green tea quality. *J Agric Food Chem.* 55(23): 9330-9336.
- Teague, C.; Holmes, E.; Maibaum, E.; Nicholson, J.; Tang, H.; Chan, Q.; Elliott, P.; Wilson, I. 2004. Ethyl glucoside in human urine following dietary exposure: detection by ¹H NMR spectroscopy as a result of metabonomic screening in humans. *Analyst* 129: 259-264.
- Thybo, A.K.; Szczypinski, P.M.; Karlsson, A.H.; Dønstrup, S.; Stødkilde-Jørgensen, H.S.; Andersen, H.J. 2004. Prediction of sensory texture quality attributes of cooked potatoes by NMR-imaging (MRI) of raw potatoes in combination with different image analysis methods. *Journal of Food Engineering* 61: 91-100.
- Tomassini, A.; Capuani, G.; Delfini, M.; Miccheli, A. 2013. NMR-Based Metabolomics in Food Quality Control. *Data Handling in Science and Technology*. 28: 411-447.
- Tsugawa, H.; Bamba, T.; Shinohara, M.; Nishiumi, S.; Yoshida, M.; Fukusaki, E. 2011. *J. Biosci. Bioeng.* 112: 292-298.
- Underwood, B.R.; Broadhurst D.; Dunn W.B.; 2006. Huntington disease patients and transgenic mice have similar pro-catabolic serum metabolite profiles. *Brain* 129: 877-886.
- Valdés, A.; Simó, C.; Ibáñez, C.; García-Cañas, V. 2013. Foodomics strategies for the analysis of transgenic foods. *Trends in Analytical Chemistry* 52: 2-15.
- van Ommen, B. 2004. Nutrigenomics: exploiting systems biology in the nutrition and health area. *Nutrition* 20: 4-8.
- van Kampen, J.J.; Burgers, P.C.; de Groot, R.; Gruters, R.A.; Luider, T.M. 2011. Biomedical application of MALDI mass spectrometry for small-molecule analysis. *Mass Spectrom. Rev.* 30(1): 101-120.
- Vilen, E.M.; Lundqvist, L.C.; Jouanneau, D.; Helbert, W.; Sandstrom, C. 2010. NMR study on hydroxy protons of kappa- and kappa/mu-hybrid carrageenan oligosaccharides: Experimental evidence of hydrogen bonding and chemical exchange interactions in kappa/mu oligosaccharides. *Biomacromolecules* 11(12): 3487-3494.
- Walsh M.J.; Singh, M.N.; Pollock H.M. 2007. ATR microspectroscopy with multivariate analysis segregates grades of exfoliative cervical cytology. *Biochim. Biophys. Res. Commun* 352(1): 213-219.
- Wang, H.-Y.; Chu, X.; Zhao, Z.-X.; He, X.-S.; Guo, Y.-L. 2011. Analysis of low molecular weight compounds by MALDI-FTICR-MS. *Journal of Chromatography B* 879: 1166-1179.
- Wang, X.; Wang, S.; Cai, Z. 2013. The latest developments and applications of mass spectrometry in food-safety and quality analysis. *Trends in Analytical Chemistry* 52: 170-185.
- Watkins, S.M.; Hammock, B.D.; Newman, J.W.; German J.B. 2001. Individual metabolism should guide agriculture towards foods for improved health and nutrition. *Am J Clin Nutr* 74: 283-286.
- Watkins, S.M.; German, J.B. 2002. Toward the implantation of metabolomic assessments of human health and nutrition. *Curr Opin Biotechnol* 13: 512-516.
- Watkins, S.M.; Reifsnnyder, P.R.; Pan, H.J.; German, J.B.; Leiter, E.H. 2002. Lipid metabolome-wide effects of the PPAR α agonist rosiglitazone. *J Lipid Res* 43: 1809-1817.
- Weckwerth, W. 2003. Metabolomics in systems biology. *Annu Rev Plant Biol* 54: 669-689.
- Weckwerth, W.; Fiehn, O. 2002. Can we discover novel pathways using metabolomic analysis? *Curr Opin Biotechnol* 13: 156-160.
- Werner, E.; Heilier, J.F.; Ducruix, C.; Ezan, E.; Junot, C.; Tabet, J.C. 2008. *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 871: 143-163.
- Weston, D.J. 2010. Ambient ionization mass spectrometry: Current understanding of

- mechanistic theory; Analytical performance and application areas. *Analyst* 135: 661-668.
- Whitfield, P.D.; German, A.J.; Noble, P.J.N. 2004. Horizons in Nutritional Science. *Metabolomics: an emerging post-genomic tool for nutrition*. *British Journal of Nutrition* 92: 549-555.
- Winder, C.L.; Gordon S.V.; Dale, J.; Hewinson R.G.; Goodacre, R. 2006. Metabolic fingerprints of *Mycobacterium bovis* cluster with molecular type: implications for genotype-phenotype links. *Microbiology* 152: 2758-2765.
- Winning, H.; Roldán-Marín, E.; Dragsted, L.O.; Viereck, N.; Poulsen, M.; Sánchez-Moreno, C.; Cano, M.P.; Engelsen, S.B. 2009. An exploratory NMR nutri-metabonomic investigation reveals dimethyl sulfone as a dietary biomarker for onion intake. *Analyst* 134: 2344–2351.
- Wu, J.; An, Y.; Yao, J.; Wang, Y.; Tang, H. 2010. An optimised sample preparation method for NMR-based faecal metabonomic analysis. *Analyst* 135: 1023–1030.
- Wu, Z.; Li, M.; Zhao, C.; Zhou, J.; Chang, Y.; Li, X.; Gao, P.; Lu, X.; Li, Y.; Xu, G. 2010. Urinary metabonomics study in a rat model in response to protein-energy malnutrition by using gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-mass spectrometry. *Mol. Biosyst.* 6: 2157–2163.
- Zhang, A.; Sun, H.; Wang, P.; Han, Y.; Wang, X. 2012. Modern analytical techniques in metabolomics analysis. *Analyst* www.rsc.org/analyst: 137: 293-300.

