

CAMBIOS EN EL METABOLOMA DE *Piper bogotense* Y *Lupinus mutabilis* EN CONDICIONES DE INVERNADERO



Trabajo de Grado para optar por el título de Biólogo

Sebastián Felipe Rincón Aceldas

Director: Dr. Ericsson David Coy Barrera

Universidad Militar Nueva Granada
Facultad de Ciencias Básicas y Aplicadas
Laboratorio de Química Bioorgánica
Programa de Biología Aplicada

2017

Contenido

Listado de gráficos.....	3
Listado de figuras	5
Listado de tablas.....	5
RESUMEN	7
Capítulo 1 : CONDICIONES MEDIOAMBIENTALES, FENOTÍPICAS Y FITOQUÍMICAS DE <i>Piper bogotense</i> Y <i>Lupinus mutabilis</i>	9
Ecosistemas andinos	9
Generalidades de la familia Piperaceae y género <i>Piper</i>	11
Filogenética de la familia Piperaceae (Piperales).....	11
Distribución de la familia Piperaceae.....	11
Características morfológicas y anatómicas de la familia Piperaceae.....	11
Fitoquímica de la familia Piperaceae	12
Generalidades del género <i>Piper</i>	12
Distribución del genero <i>Piper</i>	12
Taxonomía del género <i>Piper</i>	12
Fitoquímica del género <i>Piper</i>	12
Metabolitos nitrogenados en el género <i>Piper</i>	13
Metabolitos no nitrogenados en el género <i>Piper</i>	13
<i>Piper bogotense</i>	14
Generalidades de la familia Fabaceae.....	14
Filogenética de la familia Fabaceae (Fabales).....	14
Distribución de la familia Fabaceae	15
Características morfológicas y anatómicas de la familia Fabaceae	15
Fitoquímica de la familia Fabaceae	15
Generalidades del género <i>Lupinus</i>	15
Metabolitos nitrogenados en el género <i>Lupinus</i>	17
Metabolitos no nitrogenados en el género <i>Lupinus</i>	18
<i>Lupinus mutabilis</i>	18
Metabolómica	19
Análisis de componentes principales	20

Análisis de conglomerados jerárquicos.....	21
Regresión de mínimos cuadrados ortogonales (OPLS)	22
Referencias.....	23
Capítulo 2 : DIFERENCIAS EN EL ESQUEMA DE FERTILIZACIÓN PROMUEVE VARIACIONES EN EL METABOTIPO DE LAS HOJAS DE PLÁNTULAS DE <i>Piper bogotense</i>	31
RESUMEN	31
INTRODUCCIÓN	32
MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
Obtención del material vegetal.....	33
Sustrato empleado para la siembra de las plantas	33
Preparación de disoluciones de Hoagland con diferentes concentraciones de nitrógeno	33
Efecto de la concentración de nitrógeno en el fertilizante en diferentes subestados fenológicos sobre el metaboloma de <i>Piper bogotense</i>	34
Obtención de los extractos vegetales	34
Caracterización química de los extractos.....	35
Análisis estadístico	35
Anotación de picos (identificación tentativa de los componentes mayoritarios en los extractos)	35
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
Caracterización de las semillas.....	35
Obtención de los subestados fenológicos de las plantas de <i>Piper bogotense</i>	36
Perfilado metabólico de los extractos obtenidos de <i>Piper bogotense</i>	37
.....	38
Análisis de Componentes Principales (PCA) no supervisado de los perfiles químicos de los extractos de hojas de <i>Piper bogotense</i>	38
Regresión de mínimos cuadrados parciales con análisis discriminante (OPLS-DA) supervisado por subestado fenológico.....	39
Regresión de mínimos cuadrados parciales con análisis discriminante (OPLS-DA) supervisando con variación de nitrógeno disponible.	43
CONCLUSIONES	47
REFERENCIAS.....	48
ANEXOS 2.1	55
Anexos 2.2.....	55
Capítulo 3 : DIFERENCIAS EN EL METABOLOMA DE <i>Lupinus mutabilis</i> RELACIONADAS CON EL ESQUEMA DE FERTILIZACIÓN EN DIFERENTES SUBESTADOS FENOLÓGICOS	56
RESUMEN	56

INTRODUCCIÓN	57
MATERIALES Y MÉTODOS.....	58
Obtención del material vegetal.....	58
Sustrato empleado para la siembra de las plantas	58
Preparación de disoluciones de Hoagland con diferentes concentraciones de nitrógeno	59
Efecto de la concentración de nitrógeno en el fertilizante en diferentes subestados fenológicos sobre el metaboloma de <i>Lupinus mutabilis</i>	60
Obtención de los extractos vegetales	60
Caracterización química de los extractos.....	60
Análisis estadístico	60
Anotación de picos (identificación tentativa de los componentes mayoritarios en los extractos)	61
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	61
Perfilado metabólico de <i>Lupinus mutabilis</i>	62
Regresión de mínimos cuadrados parciales con análisis discriminante (OPLS-DA) supervisado por subestado fenológico.....	65
CONCLUSIONES	68
REFERENCIAS.....	68
Anexos 3.1	72
Anexos 3.2	72
Anexos 3.3	72
Capítulo 4 : Conclusiones generales y recomendaciones	73

Listado de gráficos

Gráfica 2-1: Gradiente utilizado en el método cromatográfico de las muestras de <i>Piper bogotense</i>	35
Gráfica 2-2: Germinación de <i>Piper bogotense</i> en cámara húmeda: Las semillas de <i>Piper bogotense</i> presentan mayor porcentaje de germinación en presencia de luz.....	36
Gráfica 2-3: Perfiles metabólicos obtenidos mediante (LC-MS) de los extractos de hojas de <i>Piper bogotense</i>	37
Gráfica 2-4: Cromatograma totalizado de los perfiles químicos de los extractos de hojas de <i>Piper bogotense</i> , los números se relacionan con el número del compuesto en la tabla de anexos 2.	38
Gráfica 2-5: (a) PCA de los perfiles químicos de las muestras de <i>Piper bogotense</i> . (b) HCA de los perfiles químicos de las muestras de <i>Piper bogotense</i>	38

Gráfica 2-6: Diagrama de dispersión OPLS-DA, generado 2+3+0, usando subestados fenológicos como variable categórica. T1: Primer subestado, T2: Segundo subestado, T3: Tercer subestado. (b) Diagramas de cargas componente 1. (c) Diagrama de cargas componente 2	40
Gráfica 2-7: Diagramas de dispersión generados por OPLS-DA utilizando como variable categórica la disolución nutritiva por cada subestado fenológico, subestado (a) T1, (b) T2 y (c) T3. Diagramas generados a partir de un modelo ortogonal 2+3+0. En todos los diagramas (a-c), las agrupaciones están generadas de acuerdo a la variable categórica: disolución S1 (verde), S2 (azul), S3 (rojo), y control S0 (amarillo).....	43
Gráfica 2-8: Gráficos de cargas generados a partir del OPLS-DA del subestado fenológico T1 a lo largo de (a) Componente 1 y (b) Componente 2. Los números están relacionados con la tabla de anexos 2.	44
Gráfica 2-9: gráficos de cargas generados a partir del OPLS-DA del subestado fenológico T2 de <i>Piper bogotense</i> a lo largo de (a) Componente 1 y (b) Componente 2.....	45
Gráfica 2-10: Gráficos de cargas generados a partir del OPLS-DA del tercer subestado fenológico de <i>Piper bogotense</i>	46
Gráfica 3-1: gradiente de la fase móvil del método cromatográfico	60
Gráfica 3-2: Porcentaje de germinación de las semillas de <i>Lupinus mutabilis</i> en cámara húmeda.	61
Gráfica 3-3: Perfiles cromatográficos de los extractos de <i>Lupinus mutabilis</i>	62
Gráfica 3-4: Cromatograma totalizado mediante Pareto normalizado Los números sobre cada señal cromatográfica se relacionan con los compuestos anotados en el anexo 3.1	62
Gráfica 3-5: (a) Análisis de componentes principales (PCA) generado a partir de los perfiles cromatográficos (izquierda). (b) Análisis de conglomerados jerárquicos (HCA) (derecha).	63
Gráfica 3-6: (a) OPLS-DA generado con modelo 2+3+0, explicación del 95%. Discriminado por subestados, T1: primer subestado, T2: segundo subestado, T3: tercer subestado. (b) Componente principal. (c) Componente principal 2. Agrupaciones de acuerdo a la variable categórica: T1 (verde), T2 (azul) y T3 (rojo). Números relacionados a anexos 3.1	63
Gráfica 3-7: OPLS-DA generado con 2 componentes principales y tres ortogonales, explicación del 95%, generados utilizando como variable de supervisión la disolución de tratamiento. Subestado fenológico T1. Diagrama de cargas del componente principal número 2. En el diagrama de dispersión (a), las agrupaciones están generadas de acuerdo a la variable categórica: disolución control S0 (verde), S1 (azul), S2 (rojo), y S3 (amarillo).	65
Gráfica 3-8: OPLS-DA generado con 2 componentes principales y tres ortogonales, explicación del 95%, generados utilizando como variable de supervisión la disolución de tratamiento en el subestado T2. Diagrama de cargas del componente principal número 2. En el diagrama de dispersión (a), las agrupaciones están generadas de acuerdo a la variable categórica: disolución control S0 (verde), S1 (azul), S2 (rojo), y S3 (amarillo).....	66
Gráfica 3-9: (A) OPLS-DA generado con 2 componentes principales y tres ortogonales, explicación del 95%, generados utilizando como variable de supervisión la disolución de tratamiento en el subestado T3. (B) Diagrama de cargas del componente principal número 2. En el diagrama de dispersión (a), las agrupaciones están generadas de acuerdo a la variable categórica: disolución control S0 (verde), S1 (azul), S2 (rojo), y S3 (amarillo).	67

Listado de figuras

Figura 1-1: Distribución geográfica de la familia Piperaceae (Stivens, 2001).	11
Figura 1-2: Distribución Fabaceae (Stivens, 2001).	14
Figura 1-3: Interacción de las ciencias ómicas (Tugizimana <i>et al</i> , 2013).	19
Figura 1-4: Técnicas para la identificación de moléculas (Tugizimana <i>et al</i> , 2013).	20
Figura 1-5: Representación de un diagrama de dispersión obtenido por PCA trazado a dos componentes principales (Bro y Smilde, 2014).	21
Figura 1-6: Representación de la agrupación llevada a cabo por HCA (Francesca <i>et al</i> , 2016)..	21
Figura 1-7: Representación de la agrupación de un OPLS-DA (Bylesjö, <i>et al</i> , 2006).	22
Figura 2-1: Diseño de unidades experimentales: (1) (2) (3) (4) corresponden a las unidades experimentales; los cuadrados sombreados representan el número de plantas sembradas individualmente en cada unidad experimental.	33
Figura 2-2: Metabolitos identificados en las hojas de plántulas de <i>P. bogotense</i> que influyen la diferenciación entre subestados fenológicos.	42
Figura 2-3 : OPLS-DA de los extractos obtenidos de <i>Piper bogotense</i> discriminando por esquema de fertilización	43
Figura 2-4: Metabolitos identificados en las hojas de plántulas de <i>P. bogotense</i> que influyen la diferenciación entre tratamientos con disoluciones nutritivas.	44
Figura 3-1: Diseño experimental: (1) (2) (3) (4) corresponden a las unidades experimentales; los cuadrados sombreados representan el número de plantas sembradas individualmente en cada unidad experimental.	58

Listado de tablas

Tabla 2-1: Disoluciones nutritivas del experimento. (MaN) macronutrientes (MiN) micronutrientes. (PM) peso molecular; ([SI]) concentración stock inicial; (VSPLS) volumen del stock por litro de disolvente; (E) elemento; (CFE) concentración final del elemento; (S1) disolución sin modificaciones; (S2) disolución 50% nitrógeno disponible; (S3) disolución 25% nitrógeno disponible.	34
Tabla 2-2: Subestados fenológicos de <i>Piper bogotense</i> evaluados.	37
Tabla 2-3: Metabolitos mayoritarios presentes en los extractos obtenidos de <i>Piper bogotense</i> en diferente subestado fenológico y bajo diferente esquema de fertilización alternando la cantidad de nitrógeno disponible	55
Tabla 2-4: Porcentaje de rendimiento de los extractos etanólicos de <i>Piper bogotense</i>	55
Tabla 3-1 Disoluciones nutritivas del experimento (MaN) macronutrientes (MiN) micronutrientes. (PM) peso molecular; ([SI]) concentración stock inicial; (VSPLS) volumen del stock por litro de disolvente; (E) elemento; (CFE) concentración final del elemento; (S1)	

disolución sin modificaciones; (S2) disolución 50% nitrógeno disponible; (S3) disolución 25% nitrógeno disponible..... 59

Tabla 3-2: Tabla de compuestos registrados para las muestras de *Lupinus mutabilis* 72

Tabla 3-3: Subestados fenológicos evaluados en *Lupinus mutabilis*..... 72

Tabla 3-4: Porcentaje de rendimiento de los extractos etanólicos de *Lupinus mutabilis* 72

RESUMEN

Los ecosistemas andinos y altoandinos son parte fundamental de ciclos biogeoquímicos como el ciclo del agua y diferentes nutrientes como carbono, nitrógeno, fósforo entre otros. Estos ecosistemas se componen de una serie de escenarios (e.g., humedales) que almacenan una gran cantidad de elementos de la biodiversidad que ofrecen servicios ecosistémicos tales como abastecimiento a las comunidades próximas a estos ecosistemas, servicios de regulación, como el ciclo de los nutrientes en el suelo y captación de carbono y servicios culturales. En la diversidad vegetal encontrada en los ecosistemas andinos se pueden encontrar dos importantes géneros ampliamente distribuidos, género *Piper* y género *Lupinus*.

Las plantas del género *Piper* se encuentran ampliamente distribuidas en las regiones tropicales y subtropicales del mundo, cuyos estudios se han orientado, entre otros, a conocer su diversidad química de forma profunda, reportando compuestos de alto interés farmacéutico, cosmético, gastronómico entre otros, entre los que se destacan algunos compuestos nitrogenados. *Piper bogotense* se encuentra distribuida en regiones andinas de Colombia y Ecuador; en la literatura se ha reportado la presencia de hojas de esta especie como parte de la hojarasca del lugar donde se encuentra distribuida, reportándose también que esta especie presenta facilidad en su descomposición, desempeñando de esta forma un rol importante en la circulación de nutrientes al medio ambiente.

Del género *Lupinus*, tenemos a *Lupinus mutabilis*, distribuida ampliamente en los ecosistemas altoandinos. Las especies del género *Lupinus* poseen gran importancia en la fijación de nitrógeno atmosférico dado que en sus raíces se pueden encontrar nódulos habitados por diferentes especies bacterianas, principalmente de género *Rhizobium*, las cuales desempeñan su rol en el ecosistema como fijadoras de nitrógeno.

Dado que se conoce poco sobre el efecto que podría ejercer el cambio en la disponibilidad de nutrientes en el metaboloma de estas plantas representativas de zonas andinas, el presente trabajo se enfocó a estudiar cómo las variaciones del nitrógeno disponible promueven cambios en su metabotipo. Para ello, se obtuvieron semillas de ambas especies y se germinaron en cámara húmeda para estimar el porcentaje de germinación con fines de caracterización de las semillas; al obtener las plántulas, se pasaron a invernadero y se sembraron en materas con un sustrato realizado a partir de arena de río y tierra común en relación 1:2.

Las plantas en su fase de invernadero fueron separadas por especie y por disolución nutritiva utilizada como tratamiento; se utilizaron para cada especie tres disoluciones nutritivas en las cuales solo se cambió la concentración total de nitrógeno y una disolución sin nutrientes (Agua)

con el fin de determinar cómo cambiaba los perfiles metabólicos de ambas especies según la cantidad de nitrógeno inicial disponible en el sustrato.

En primera instancia, se determinaron los subestados fenológicos de las plantas utilizando la escala BBCH y, según esta, se les asignó un código. Cuando las plantas se desarrollaron hasta llegar al subestado fenológico determinado, se colectaron las hojas, se sometieron a liofilización y, posteriormente, se sometieron a extracción en etanol mediante ciclos de ultrasonido. Las disoluciones obtenidas se perfilaron químicamente mediante HPLC-MS con una columna Premier C-18 (4,6 mm x 150 mm, 5 µm), utilizando un método de separación en gradiente de elución con una fase móvil compuesta por TFA 0.05% en agua y acetonitrilo.

Los perfiles químicos obtenidos se sometieron un proceso de autoescalado y alineamiento para realizar el análisis estadístico multivariado en el programa SIMCA® (v 13.3, Umetrics) con fines de construcción de modelos PCA y OPLS-DA y así establecer las diferencias en la composición química de los extractos asociadas al metabotipo. Con los espectros de masas obtenidos, se procedió a la identificación tentativa de los compuestos principales en cada extracto, con el fin de encontrar los posibles marcadores asociados a cada subestado y esquema de fertilización en cada especie. De lo anterior, se encontraron cambios en los perfiles metabólicos obtenidos por cada una de las categorías evaluadas, concluyendo de esta manera que en los subestados fenológicos evaluados para cada especie y, según el esquema de fertilización, es posible detectar cambios en el fenotipo metabólico mediante análisis multivariado, haciéndose evidente que a medida que ambas especies se van desarrollando, su metabolismo se va haciendo más diverso. Para *Piper bogotense* se determinaron cambios asociados a la producción de diferentes tipos de compuestos nitrogenados en los diferentes subestados fenológicos y, para *Lupinus mutabilis*, se determinó que en subestados iniciales, suele priorizarse la producción de alcaloides, mientras que en los subestados fenológicos más avanzados se produce mayor diversidad de metabolitos como isoflavonas.

Capítulo 1 : CONDICIONES MEDIOAMBIENTALES, FENOTÍPICAS Y FITOQUÍMICAS DE *Piper bogotense* Y *Lupinus mutabilis*

Piper bogotense y *Lupinus mutabilis* son representantes de dos géneros con una amplia distribución en los ecosistemas andinos y altoandinos; además desempeñan importantes roles en la circulación de nutrientes en el ecosistema en el que se encuentran presentes. Los ecosistemas altoandinos son importantes para que se lleven de forma adecuada varios ciclos biogeoquímicos, tales como el ciclo del agua, carbono, nitrógeno, fósforo, entre otros. En estos ecosistemas se pueden encontrar gran cantidad de humedales que prestan servicios ecosistémicos a las comunidades locales como circulación de nutrientes al suelo, regulación y captación de carbono y abastecimiento de agua; también se pueden encontrar algunos servicios ecosistémicos culturales en zonas altoandinas (Caziani y Derlindati, 1999; Kandus *et al*; 2011 Vidal *et al*, 2013).

Ecosistemas andinos

La estructura biótica básica en los ecosistemas asociados a la cordillera de los Andes se divide en diferentes niveles relacionados con la altura, las cuales son bosque andino bajo, bosque andino alto y páramo. El bosque andino bajo se extiende desde los 2500 a 2800 msnm, presenta temperaturas anuales entre 12 y 14° C, los bosques altoandinos se extienden desde los 2800 a 3300 msnm, presenta temperaturas anuales de 9 a 12°C y precipitaciones medias anuales de 900 a 1100 mm. En la clasificación de Holdridge estas zonas se pueden catalogar como bosque montano bajo y bosques húmedos. Y, por último, tenemos los páramos que se encuentran después de los 3300 msnm hasta los 4500 msnm, los cuales presentan entre 700 y 2000 mm de precipitación (Pérez, 2000).

Estudios relacionados con la composición vegetal revelan la compleja interacción presente en dichos ecosistemas, ya que es posible encontrar en los ecosistemas andinos sincronización en los ciclos reproductivos de diversas especies vegetales que posiblemente se relacionan con los ciclos térmicos y diferentes interacciones simbióticas asociadas a la perseverancia de especies en ambientes hostiles (Arroyo *et al*, 1981; Nuñez *et al*, 1999).

Las comunidades vegetales presentes en estos ecosistemas desempeñan importantes roles en el ciclo de elementos fundamentales para la vida tales como el nitrógeno y carbono, gracias al denominado “efecto enfermera” que presentan algunas plantas, y de esta manera se mantienen las redes tróficas y energéticas en estos ecosistemas pobres en nutrientes (Nuñez *et al*, 1999). Teniendo en cuenta lo anterior, se hace necesario estudiar elementos del ecosistema para entender de forma más clara su interacción, la relación del nitrógeno con las plantas presentes en la zona, tomando en cuenta que además de las plantas, diversos microorganismos también se ven seriamente involucrados en estos procesos (Sarmiento y Bottner, 2002).

En los bosques andinos se puede encontrar una gran diversidad florística asociada a la biocenosis en diferentes grados; como lo son las especies vegetales presentes en estos bosques andinos y altoandinos, de las cuales se destaca la presencia de plantas del género *Piper* (Piperaceae) (Amaya-Villarreal y Renjifo, 2010; Pérez, 2000; Quijano-Abril *et al*, 2006) donde han sido reportadas a lo largo de los Andes (Quijano-Abril *et al*, 2006). Y son importantes en el ciclo de nutrientes mediante la descomposición de sus hojas en la hojarasca del lugar donde se distribuyen. La tasa de descomposición de hojarasca en el caso de *Piper bogotense* es reportada como material de fácil degradación (Nuñez, 2002). Es importante acentuar que la hojarasca en los bosques representa almacenamiento de nutrientes, entre ellos nitrógeno y fósforo (Weerakkody y Parkinson, 2006). También se reporta la presencia de plantas de género *Lupinus*, entre ellas *Lupinus mutabilis* (Gross *et al*, 1988), las cuales también desempeñan un importante rol en el ciclo de diferentes nutrientes, tales como nitrógeno, ya que gracias a las asociaciones con microorganismos presentes en sus nódulos radiculares, pueden realizar procesos de fijación de nitrógeno atmosférico (Uyanös y Karaca, 2011).

Existen reportes que sostienen que la disponibilidad de nutrientes para plantas de la familia Fabaceae, a la cual pertenece el género *Lupinus*, es fundamental para la actividad fijadora de nitrógeno en los nódulos, ya que para el caso de *Rhizobium tropici*, la cual es una bacteria fijadora de nitrógeno presente en nódulos radiculares, cuando se encuentra en escases de fósforo, disminuye drásticamente la actividad de la enzima nitrogenasa (Hernández *et al*, 2009). También se ha descrito que al aumentar la concentración de nitrógeno en el sustrato de plantas del género *Lupinus*, incrementa la producción de alcaloides en las plantas, y estas van a tener mayor crecimiento con respecto a plantas que no fueron tratadas con la misma cantidad de nitrógeno (Johnson *et al*, 1987). Para el género *Piper*, se reporta que en diferentes especies, cuando se presentan diferentes concentraciones del ión NO_3^- en el sustrato, la actividad de enzimas nitrato-reductasa puede variar de acuerdo a la disponibilidad de luz (Fredeen *et al*, 1992).

Lo anterior podría sugerir que la variación en los nutrientes disponibles en el sustrato podría promover cambios en el metaboloma de *Piper bogotense* y *Lupinus mutabilis*, las cuales son representantes de dos géneros de gran distribución en bosques andinos y altoandinos y llegan a tener importantes roles en el ciclo de nutrientes en estos ecosistemas, ya sea por fijación de nitrógeno en el caso de *Lupinus mutabilis* o por recirculación de nutrientes mediante su descomposición en hojarasca en el caso de *Piper bogotense*.

Generalidades de la familia Piperaceae y género *Piper*

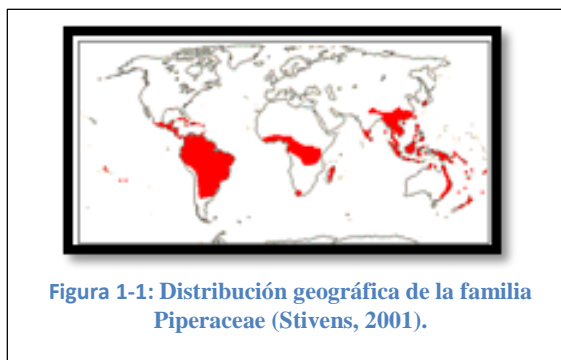
Filogenética de la familia Piperaceae (Piperales)

La familia Piperaceae se encuentra ubicada en el orden de las Piperales, junto con las familias Sauraceae, Aristolochiaceae, Lactoridaceae encontrándose filogenéticamente más relacionada con la familia Sauraceae (Tucker *et al*, 1993; Wanke *et al*, 2007).

La ausencia o presencia de perianto dentro del orden de las Piperales es una característica importante para la identificación de las familias Piperaceae y Sauraceae, las cuales, a diferencia de las familias Aristolochiaceae, Lactoridaceae y Asaroideae carecen de esta (Tucker *et al*, 1993; Jaramillo y Callejas *et al*, 2004). La familia Piperaceae tiene diferentes géneros, de los cuales se mencionan dos importantes clados, uno de ellos corresponde a la agrupación de *Piper* y *Peperomia* como grupos hermanos y el otro corresponde a *Sarcorrhachis* y *Zippelia* (Jaramillo y Callejas *et al*, 2004). O *Piper* y *Peperomia* junto a *Manekia* y *Zippelia* (Wanke *et al*, 2007).

Distribución de la familia Piperaceae

La familia Piperaceae presenta distribución en las zonas tropicales y subtropicales del mundo con plantas de diferentes hábitos y estratos, tales como estrato arbóreo, arbustivo, herbáceo, algunas especies también pueden ser epífitas y enredaderas (Figura 1-1) (Stevens, 2001).



Características morfológicas y anatómicas de la familia Piperaceae

Las especies que se encuentran agrupadas en la familia Piperaceae poseen tallos delgados con nodos característicos que en el caso de las especies trepadoras promueven la formación de raíces adventicias que les permiten escalar en diferentes sustratos y sirven de soporte para otras especies, la formación de yemas puede ser terminal o lateral (Tebbs, 1993).

Los tallos de algunas especies de esta familia poseen estelas agrupadas en diferentes formas, al igual que presentar diversidad de filotaxias, tomando como ejemplo a *Peperomia dahlstedtii* C.DC., que presenta estructura polistélica y filotaxia verticilada y a *Ottonia martiana* Miq. y *Piper diospyrifolium* Kunth., que presentan estelas con haces medulares y filotaxia alterna (Souza *et al*, 2004). Las hojas de las especies de esta familia son bastante diversas en cuanto a su forma y tamaño, pueden ser redondeadas, ovaladas, oblongas, elípticas, cordadas y en algunas ocasiones sagitadas, la venación de las hojas puede ser acrodroma,

actinodroma, broquidodroma, camptodroma o campilodroma (Tebbs, 1993). La principal característica fundamental de esta familia son sus flores que forman inflorescencias espiciformes, algunas veces largas y a veces sub-globulares, opuestas usualmente a las hojas y menos frecuentemente agrupadas como umbelas axilares. El fruto forma una drupa uni-seminada obovoide a globosa, a veces sésil, roja o amarilla, usualmente glabra y con pico corto (Celis *et al*, 2008)

Fitoquímica de la familia Piperaceae

Se han descrito diferentes metabolitos secundarios para las especies de esta familia como varios derivados de fenilalanina, lignanos y neolignanos; gran diversidad de amidas, piranos y compuestos aromáticos con diferentes sustituciones. En cuando a compuestos de extractos volátiles se han descrito variedad de monoterpenos, sesquiterpenos y fenilpropanos (Celis *et al*, 2008; Tebbs, 1993).

Generalidades del género *Piper*

Distribución del género *Piper*

El género *Piper* se encuentra ampliamente distribuido en las regiones tropicales y subtropicales del mundo, presentando reportes en los trópicos de África, Asia, Oceanía y América, (Jaramillo y Manos, 2001). Este género cuenta con aproximadamente 2000 especies distribuidas en todo el mundo, con aproximadamente 1300 de ellas ubicadas en el Neotrópico y las otras 700 ubicadas en las regiones tropicales del viejo mundo (Quijano-Abril, 2006). En la región andina se reportan gran cantidad de especies de este género con un porcentaje de endemismo de 22,46% y un número de 16 áreas donde algunas especies de *Piper* son endémicas (Quijano-Abril, 2006).

Taxonomía del género *Piper*

En el género *Piper* se pueden encontrar tres importantes clados muy bien soportados por pruebas moleculares que separan las especies en el clado del Neotrópico, Trópico Asiático y del Sur del Pacífico (Jaramillo y Manos, 2001; Jaramillo *et al*, 2008). Para el clado del Neotrópico se encuentran los subgéneros *Macrostachys* de 200 a 250 especies, *Radula* con aproximadamente 450 especies, *Peltobryon* de unas 80 a 100 especies, *Photomorphe* con alrededor de 10 especies, *Enckea* con aproximadamente 120 especies, *Ottonia* con al menos 50 especies, *P. cinereum/ P. sanctum* y *Schilleria* con al menos 200 especies (Jaramillo *et al*, 2008).

Fitoquímica del género *Piper*

En este género de plantas se han descrito gran diversidad de compuestos químicos con gran variedad de utilidades en la planta como en diferentes fines de bioprospección. Entre los más comunes descritos para este género se encuentran moléculas como amidas, propenilfenoles,

lignanós, neolignanós, terpenos, kawapironas, dihidrochalconas, flavonas, entre otros (Dyer *et al.*, 2004).

Metabolitos nitrogenados en el género *Piper*

Es posible encontrar gran diversidad de metabolitos secundarios con la presencia de nitrógeno en su estructura; el principal grupo de estas moléculas en *Piper* corresponde a las amidas, las cuales presentan bioactividad a diferentes niveles. Vale la pena mencionar que la variación en la producción de compuestos nitrogenados en las plantas puede tener diferentes orígenes; entre ellos, el pH, la temperatura, la disponibilidad de nitrógeno y disponibilidad de carbono, los reguladores de crecimiento vegetal, entre otros, que desempeñan roles importantes en la biosíntesis de estas moléculas (Ramawat, 2007).

Las amidas son compuestos formados a partir de un grupo amino y un grupo acilo provenientes de la síntesis de aminoácidos (Dewick, 2002); las cuales suelen tener pH neutro aunque pueden ser ácidos débiles. En algunos casos estos compuestos se forman a partir de un ácido y un heterociclo de cinco a seis miembros. En el caso de la piperina, se trata de ácido cinámico, donde el nitrógeno se encuentra formando un heterociclo en un anillo de seis miembros (Dyer *et al.*, 2004). Entre estos, las alcanmidas son un grupo de compuestos descritos principalmente para el género *Piper*, las cuales poseen características similares a piperina tales como la ubicación de sus grupos funcionales, y en su gran mayoría son moléculas alifáticas salvo algunos casos como la pelitorina (Okwute y Egharevba, 2013).

El grupo de las amidas abarca moléculas con actividad biológica con propiedades como pesticidas (Okwute y Egharevba, 2013); así como propiedades antiinflamatorias, siendo este el caso de alilprocatecol, el cual presenta actividad contra el desarrollo e inflamación de las úlceras gástricas (Vikash *et al.*, 2011).

Metabolitos no nitrogenados en el género *Piper*

Aunque las plantas de este género son conocidas por la producción de diversos metabolitos nitrogenados como las amidas, también se reporta la presencia de metabolitos de gran interés en el metabolismo vegetal derivados de las rutas metabólicas del mevalonato y shikimato (Dewick, 2002), tales como los terpenos (metabolitos derivados del isopreno), fitosteroles, ácidos grasos (Pérez *et al.*, 2006). También se reporta la presencia de compuestos fenólicos como flavonas y flavanonas, lignanos, neolignanós, terpenos, esteroides, piperólidos, chalconas e dihidrochalconas entre otras (Luyen. *et al.*, 2014). Entre los compuestos anteriores, se describen algunas moléculas correlacionadas con actividad antioxidante (Dasgupta y De, 2004; Swapna *et al.*, 2012; Nouri *et al.*, 2014).

Piper bogotense

Piper bogotense es una planta de estrato arbóreo, mide entre los ocho a diez metros de altura, distribuido en Colombia, Ecuador y Panamá (Trelease y Yuncker, 1950). Algunos estudios fitoquímicos reportan en esta especie la presencia de alcaloides, hidroquinonas y benzoquinonas, compuestos fenólicos y esteroides (Peña *et al.*, 2000).

Las plántulas de *Piper bogotense*, durante su proceso de crecimiento, generalmente al desenvolver las hojas cotiledonares, su tallo presenta 5 mm de altura y es común encontrar plántulas que solo poseen un cotiledón. Sus hojas en estados iniciales de desarrollo pueden ser polimórficas, y en la misma planta es posible encontrar hojas de diferentes tamaños y con diferente cantidad de nervaduras; presentan también raíz de gran tamaño con respecto al tamaño general de la plántula (Naranjo, 1998).

Se ha descrito la presencia de *Piper bogotense* en diferentes bosques altoandinos de Cundinamarca y Boyacá. Allí se ha encontrado la presencia de hojas de *Piper bogotense* en la hojarasca de estos ecosistemas donde, mediante el método de descomposición en canasta, se determinó que entre las hojas de plantas encontradas en la hojarasca, las de *Piper bogotense* destacaban por su fácil descomposición y, de esta forma, hacían aporte al suelo de diferentes nutrientes (Nuñez, 2002).

Esta planta presenta importancia también en el área de la recuperación ecológica ya que se ha descrito como perteneciente a grupos funcionales en ecosistemas andinos junto con plantas similares en función y forma, más no relacionadas genéticamente de forma obligatoria. La utilidad de los grupos funcionales es contribuir a alguna función útil en el ecosistema y que sea llevada a cabo por diferentes especies del mismo estrato y características similares como área foliar, biomasa, altura máxima, estado fenológico, entre otros (Ruiz-Molina, 2015).

Generalidades de la familia Fabaceae

Filogenética de la familia Fabaceae (Fabales)

La familia Fabaceae pertenece al orden de las Fabales, en el cual se puede notar que en sus subclados existe una gran diversidad de plantas con la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico (Soltis *et al.*, 2000), en el cual se encuentra junto con las familias Polygalaceae, Quillajaceae y Surianaceae, teniendo como grupo filogenéticamente más relacionado a Polygalaceae (Doyle *et al.*, 2000).



Figura 1-2: Distribución Fabaceae (Stivens, 2001).

En esta familia de plantas se encuentra una gran diversidad de estratos vegetativos, tales como árboles, arbustos, lianas, algunas plantas acuáticas entre otros, con diferentes ciclos reproductivos (Rundel, 1989).

Distribución de la familia Fabaceae

La Familia Fabaceae presenta distribución en gran parte del globo terráqueo, teniendo mayor prevaencia en las zonas de climas templados y zonas tropicales, pero son muy comunes en diversas áreas (Figura 1-2) (Rundel, 1989). Entre ellas ecosistemas altoandinos, donde plantas del género *Lupinus* tienen gran interés debido a su crecimiento rápido y su rol desempeñado en procesos de sucesión dado por las características anteriores (Sarmiento et al, 2003).

Características morfológicas y anatómicas de la familia Fabaceae

En la familia Fabaceae, es posible encontrar organismos con la presencia de hojas simples o compuestas, pinadas, aunque también pueden ser palmadas o bipinadas, unifoliadas o con diferente número de folíolos, en ocasiones son filódicas, presentan estípulas o espinas según el subclado (Rundel, 1989). Las flores en las plantas de la familia Fabaceae suelen ser actinomorfas o zigomorfas, bisexuales, con un único carpelo superior, pentamérico, dispuestos solos o en racimos. La principal característica fundamental de esta familia es el fruto en forma de vaina o legumbre (Polhill, 1994). Las leguminosas son usualmente vainas de un solo lóculo, con número de óvulos superior a dos, en dos filas alternas, este fruto es seco y dehiscente (Judd *et al.* 2002).

Fitoquímica de la familia Fabaceae

En esta familia es posible encontrar gran diversidad de metabolitos, entre los cuales se reportan metabolitos secundarios nitrogenados tales como alcaloides similares a la quinolizidina, pirrolizidina, indolizidina, piperidina, piridina, pirrolidina, indol simple, eritrina y a la isoquinolina simple, o alcaloides de imidazol, poliaminas, feniletilamina, tiramina y derivados de triptamina, aminoácidos no proteicos, glucósidos cianogénicos y diversos péptidos. Como también se reportan metabolitos no nitrogenados como compuestos fenólicos, tales como fenilpropanoides, flavonoides, isoflavonas, catequinas, antocianinas, taninos, lignanos, cumarinas y furanocumarinas, también se reportan policétidos (antraquinonas) y terpenoides (Wink, 2013).

Generalidades del género *Lupinus*

Las plantas del género *Lupinus* son pertenecen a la familia Fabaceae. Poseen una altura de hasta 2 metros, sus hojas presentan número impar de folíolos y sus flores se encuentran dispuestas en inflorescencias que poseen diferentes tonalidades; la familia Fabaceae tiene en Colombia una alta distribución, presentándose en gran cantidad en zonas altoandinas, principalmente en Norte de Santander, viejo Caldas, zona Cundiboyacense y las cordilleras Central y Oriental (Duran, 2011).

El género *Lupinus* se encuentra distribuido en el Norteamérica, Centroamérica y Suramérica. De las especies de este género distribuidas en el continente americano se hace la subdivisión en seis grupos caracterizados mediante métodos moleculares; dentro de estos contamos con grupos del viejo mundo, Este de Norteamérica, Este de Suramérica, Oeste de Norteamérica, México y Centroamérica y Oeste de Suramérica (Drummond, 2008; Drummond *et al.* 2012).

Las plantas de este género poseen un importante uso en el campo agronómico, ya que sus semillas poseen una gran cantidad de proteínas, lo cual confiere una buena nutrición al momento de ser usadas para alimento de ganado. En el caso de *Lupinus bogotensis*, sus semillas contienen un valor proteínico del 43%, minerales como el cobalto, fósforo y potasio, principalmente; y una cantidad del 13.5% de azúcares (Duran, 2011).

En este género de plantas, se describe gran potencial restaurador en ecosistemas con suelos alterados, ya que la simbiosis en sus raíces con rizobacterias formadoras de nódulos generan la fijación de nitrógeno atmosférico, una mejor absorción de agua y la asimilación de nutrientes por parte del suelo lo que confiere fertilidad y un mejoramiento del suelo (Duran, 2011; Gomez, 2011; Gomez *et al.* 2013).

Las rizobacterias o rizobios son bacterias que se encuentran en la parte radicular de determinadas plantas. En el caso del género *Lupinus*, estas rizobacterias se encargan de fijar el nitrógeno, en el que se ha descrito que son las rizobacterias pertenecientes al género *Rhizobium*, las cuales forman asociaciones con los pelos radiculares, donde secretan diferentes sacáridos promotores de formación de nódulos, dónde se lleva a cabo la función de fijación de nitrógeno (Madigan *et al.* 2012).

La simbiosis de rizobacterias con leguminosas es importante ya que de por sí, estas no pueden realizar la fijación de nitrógeno por su cuenta; se ha demostrado el efecto que posee la inoculación de rizobacterias en leguminosas, indicando que a mayor concentración de sales en el suelo, la simbiosis entre *Rhizobium* y la fabácea será menos efectiva, generando diversos problemas en la planta relacionados a clorosis, deficiencia de nitrógeno, disminución en el peso seco y crecimiento radicular, entre otras (Uyanös y Karaca, 2011).

Los simbiosiontes en organismos vegetales, para este caso las rizobacterias, desempeñan un rol muy importante durante y según el estadio fenológico en el cual realicen la asociación simbiótica, dado que, por lo general, contribuyen al desempeño óptimo de procesos metabólicos del huésped (Madigan *et al.*, 2012).

Metabolitos nitrogenados en el género *Lupinus*

En el género *Lupinus*, se reporta una gran cantidad de metabolitos, entre los cuales destacan por su número y abundancia a los alcaloides, teniendo en cuenta que también se pueden encontrar compuestos fenólicos.

Un alcaloide es una molécula que posee un heterociclo, en cuyo caso el heteroátomo componente del mismo es un N; son de carácter básico y se describen principalmente en organismos vegetales. Estos metabolitos poseen un sabor amargo, se precipitan en presencia de metales pesados y suelen ser de importancia farmacológica; las rutas biosintéticas para la producción de alcaloides en plantas suelen ser variadas, por ejemplo, los alcaloides feniletilaminicos proceden de la ruta de aminoácidos como la fenilalanina, tirosina, y 3,4-dihidroxifenilalanina; los alcaloides pirrolidínicos pueden proceder del ácido acetoacético, aminoácidos o ácido acético; los alcaloides piperidínicos proceden de la lisina, la cual es precursora a su vez de la piperina (Ramawat, 2007).

Todas las plantas del género *Lupinus* contienen alcaloides, principalmente alcaloides quinolizidínicos (derivados de la quinolizidina), como la esparteína, aunque también producen alcaloides de piperidina como ammodendrina y *N*-acetil ammodendrina y alcaloides de indol simples como la gramina; los alcaloides con toxicidad más relevantes en el género *Lupinus* son los alcaloides quinolizidínicos, de los cuales se describen compuestos bicíclicos (grupo norlupinano), tricíclicos (grupo citosina) y tetracíclicos (grupo esparteína) (Pilegaard y Gry, 2009).

Las rutas biosintéticas de los alcaloides están incluidas en las rutas del acetato y shikimato, lo cual ocurre durante la adición del grupo amino de un aminoácido en alguno de los metabolitos producidos por las rutas biosintéticas mencionadas anteriormente; es importante mencionar la importancia que presentan los alcaloides quinolizidínicos en las plantas del género *Lupinus*, dado que se encuentran en gran cantidad y comúnmente en este género (Dewick, 2002).

Los alcaloides quinolizidínicos se derivan de la *L*-lisina, la cual se descarboxila para generar la cadaverina y, mediante la acción de una diamina-oxidasa, como cobre aminooxidasa (CuAO), forman un derivado de la cadaverina llamado 5-aminapentanal, el cual es ciclado espontáneamente por la acción de la base Schiff pirimidina, y de ahí puede sufrir reacciones tipo Aldol, hidrólisis, deaminaciones oxidativas y acoplamiento de otras estructuras para producir alcaloides quinolizidínicos (Dewick, 2002; Frick *et al*, 2017). En este proceso desempeñan importantes roles las enzimas como acetiltransferasa HMT/HL formando productos acetilados de 13 α -hidroxilupanina and 13 α -hidroximultiflorina, cuyo gen que codifica esta enzima es la *LaHMT/HLT*, descrito en *Lupinus albus* (Frick *et al*, 2017).

En la literatura se encuentra escasamente descrito cómo los factores ambientales afectan la producción de alcaloides quinolizidínicos en *Lupinus*, pero hay correlación positiva entre la cantidad de fósforo y nitrógeno en el sustrato y la producción de estos (Frick *et al.*, 2017).

Metabolitos no nitrogenados en el género *Lupinus*

Para plantas del género *Lupinus* se ha descrito la presencia de compuestos tales como flavonas, isoflavonas, compuestos hidroxicinámicos y diversos compuestos fenólicos. Los grupos de compuestos mencionados anteriormente se pueden relacionar con actividad antioxidante y se reporta que la cantidad de estos compuestos incrementa a medida que la planta se va desarrollando, cuyos cambios pueden apreciarse desde el momento de la germinación (Dueñas *et al.*, 2009). Las flavonas identificadas para este género suelen ser flavonas glucosidadas, tales como luteolína, apigenína y diosmetína (Dueñas *et al.*, 2009).

Los flavonoides son generados a partir del cinamoil-CoA de la ruta del shikimato. Posteriormente, al cinamoil-CoA se le adhieren tres unidades de malonil-CoA, y el producto de esta reacción puede llegar a sufrir diferentes reacciones tipo Aldol-Claisen para generar estilbenos, flavonas y flavononas, de las cuales son precursoras las chalconas (Dewick, 2002). En estos compuestos pueden ocurrir diferentes tipos de reacciones tales como glucosilaciones, hidroxilaciones, dimetilaciones, entre otras (Dewick, 2002).

Lupinus mutabilis

Lupinus mutabilis, perteneciente al grupo de los *Lupinus* del Oeste de Suramérica, presenta distribución en áreas altoandinas (Drummond, 2008; Drummond *et al.* 2012) y suele ser utilizada para el consumo humano bajo ciertas recomendaciones dietarias. Sus semillas también son utilizadas para el forrajeo de animales de interés agropecuario y también se ha estudiado su efecto para cultivos intercalados con otras leguminosas en periodos secos con el fin de generar forraje y evitar la pérdida del agua por evaporización del suelo y contribución al aporte de nitrógeno del suelo (Mikić *et al.* 2013).

Teniendo en cuenta el valor nutricional de sus semillas, también se ha evaluado el potencial uso de estas para suplementar el alimento de diferentes especies con potencial interés económico como *Litopenaeus vannamei*, con el fin de remplazar otro tipo de alimentos (Molina-Poveda *et al.* 2013). Es importante mencionar que existen variedades de *Lupinus mutabilis* que se presentan como candidatos aptos para consumo dado que presentan contenidos bajos de alcaloides y un valor alto en cuanto a macromoléculas importantes en la nutrición (Gross *et al.* 1988).

En zonas altoandinas de Ecuador, el cultivo y uso de esta especie representa un gran interés por parte de la población, pero uno de los principales problemas en los cultivos de *Lupinus mutabilis*

es la aparición de plagas, tales como la antracnosis, problema que se ha ido trabajando mediante la selección de fenotipos resistentes (Falconi *et al*, 2015).

En *lupinus mutabilis* se describe la presencia de los alcaloides quinolizidínicos, los cuales son un grupo de alcaloides con elevada toxicidad. Se sugiere que *Lupinus mutabilis* produce estos metabolitos con el fin de obtener defensa química contra insectos herbívoros. Recientemente se han descrito algunos genes y enzimas involucradas en la producción de alcaloides, tales como *LaHMT/HLT* que codifica para una enzima de actividad acetiltransferasa. (Frick *et al*, 2017)

Metabólica

La metabólica es una ciencia “ómica” cuyo foco de interés es el estudio cuantitativo y cualitativo de los metabolitos (metaboloma) de un organismo bajo una condición específica en un tiempo dado. Hay que tener en cuenta que el metaboloma es el total de metabolitos o moléculas pequeñas que se encuentran en una célula, tejido u organismo en un tiempo dado (Yuliana *et al*, 2011). El estudio de la metabólica cobra importancia ya que contribuye al entendimiento del metabolismo, expresión genética y, en algunos casos, permite hacer correlaciones fenotípicas cuando se integran diferentes ciencias “ómicas” como la genómica, proteómica y transcriptómica (Figura 1-3) (Liebeke *et al*, 2014).

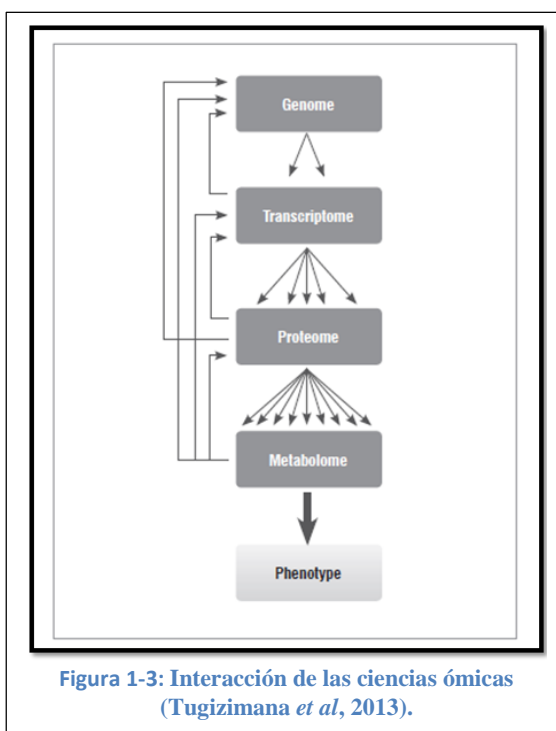


Figura 1-3: Interacción de las ciencias ómicas (Tugizimana *et al*, 2013).

Los estudios en metabólica de especies vegetales resultan de interés farmacéutico e industrial a diferentes niveles debido a la actividad biológica que pueden llegar a tener los metabolitos producidos por estas; estudios estadísticos que relacionan la actividad biológica de los productos vegetales con respecto a sus compuestos permiten hacer predicciones de la posible utilidad de estos en diferentes campos como producción de fármacos, agentes tóxicos para diferentes especies, entre otros (Yuliana *et al*, 2013).

En estudios de metabólica es común el uso de técnicas e instrumentos utilizados en química analítica tales como métodos cromatográficos, espectrométricos y otros, que permiten discriminar la naturaleza química de los productos obtenidos, como masa exacta de los metabolitos, composición elemental, información estructural de los compuestos, espectros, hidrofobicidad, tiempo de retención, entre otros (Figura 1-4) (Tugizimana *et al*, 2013) .

El perfilado metabólico es una de las formas más operativas de abordar estudios en metabolómica. Mediante esta rama de la metabolómica es posible leer/analizar/correlacionar los perfiles metabólicos de muestras estudiadas con fines cuantitativos y cualitativos, como la identificación funcional/dinámica de biomarcadores y cuantificación de los mismos, lo cual puede realizarse obteniendo información de los espectros obtenidos por espectrometría de masas o con técnicas afines (Harrigan, 2012).

Con el fin de obtener información estadística clara a partir del perfilado metabólico de algún organismo, es requerido el uso de estadística multivariada, ya que esta facilita en gran manera el estudio e interpretación de grupos de datos muy numerosos (Khatib *et al*, 2015). Los análisis más comunes para estudios metabolómicos son el análisis de componentes principales (PCA), análisis de conglomerados jerárquicos (HCA) y el análisis de mínimos cuadrados parciales ortogonales (OPLS).

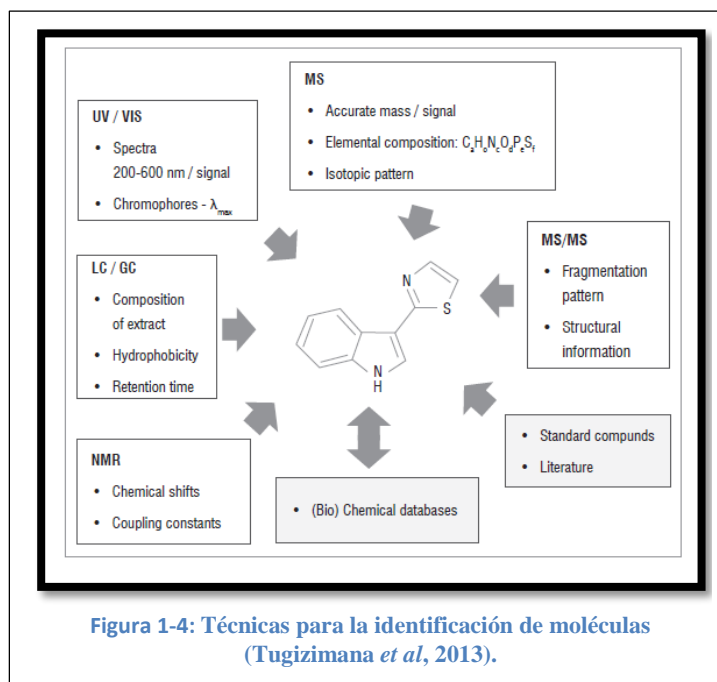


Figura 1-4: Técnicas para la identificación de moléculas (Tugizimana *et al*, 2013).

Análisis de componentes principales

El objetivo del análisis de componentes principales (PCA) es representar gráficamente la variación obtenida de grupos de datos tabulados y esquematizados en un diagrama de dispersión o mapa de puntos (*score*) que se encuentra trazado por componentes principales que explican la variación en la distribución de los grupos de datos analizados. Dicho gráfico permite obtener información de los datos mediante la ubicación de estos en el gráfico (Abdi y Williams, 2010).

El análisis de componentes principales (PCA) utiliza un cálculo matemático para la transformación de un número de variables posiblemente correlacionadas en un número menor de variables no correlacionadas (Figura 1-5) (Hussain *et al*, 2009). Dichas transformaciones dependen del tamaño de los vectores indicados en la matriz donde fueron tabulados los datos, la cual tiene un tamaño definido según el número de columnas y filas que componen la misma (Bro y Smilde, 2014). Estas transformaciones son llamadas componentes principales, donde el componente principal número uno del PCA indica la máxima variabilidad posible y cada uno de

los componentes siguientes indica la posible variabilidad del recorrido de los datos en el mapa de puntos o diagrama de dispersión (Hussain *et al*, 2009).

La transformación de los datos en el PCA se da en términos de mínimos cuadrados. En este análisis se toma el primer eje como la línea que pasa por el centro o mayor cantidad de datos y minimiza el cuadrado de la distancia de cada punto a la línea del componente principal. La línea atraviesa la

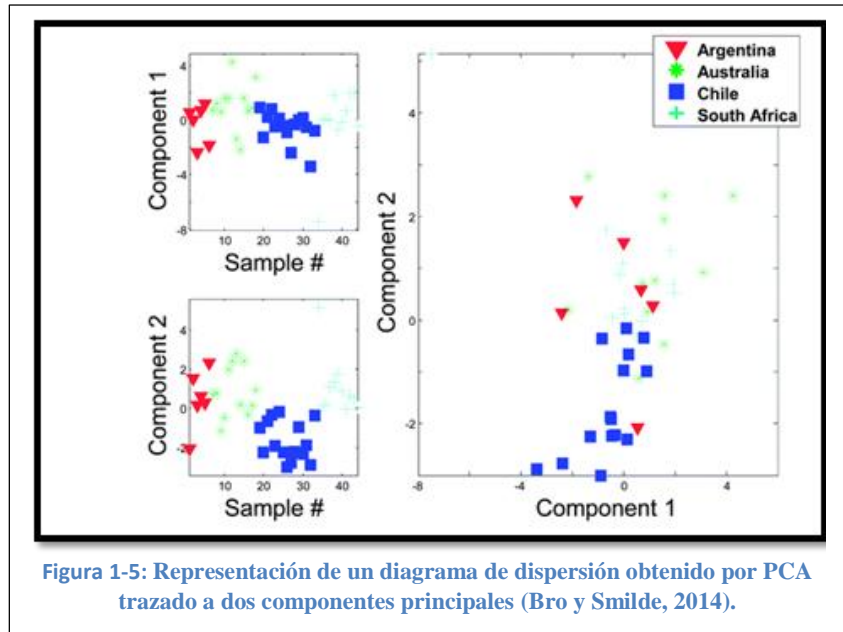


Figura 1-5: Representación de un diagrama de dispersión obtenido por PCA trazado a dos componentes principales (Bro y Smilde, 2014).

variación máxima en los datos. El segundo eje PCA también pasa a través de la variación máxima en los datos, pero lo hace de forma ortogonal al primer componente principal (Hussain *et al*, 2009).

Un análisis PCA puede utilizarse con fines exploratorios, es decir, no hay un propósito cuantitativamente bien definido con el análisis, para lo cual con mucha frecuencia solo se grafica el *score* con los dos primeros componentes principales generados, ya que a medida que se aumenta el número de componentes, la variación explicada es cada vez más pequeña, aunque no significa que no sea importante generar dicha información para diversos casos de estudio (Bro y Smilde, 2014).

Análisis de conglomerados jerárquicos

Los análisis de conglomerados jerárquicos (HCA) tienen como fin determinar de forma no supervisada la similitud entre grupos de datos mediante índices de

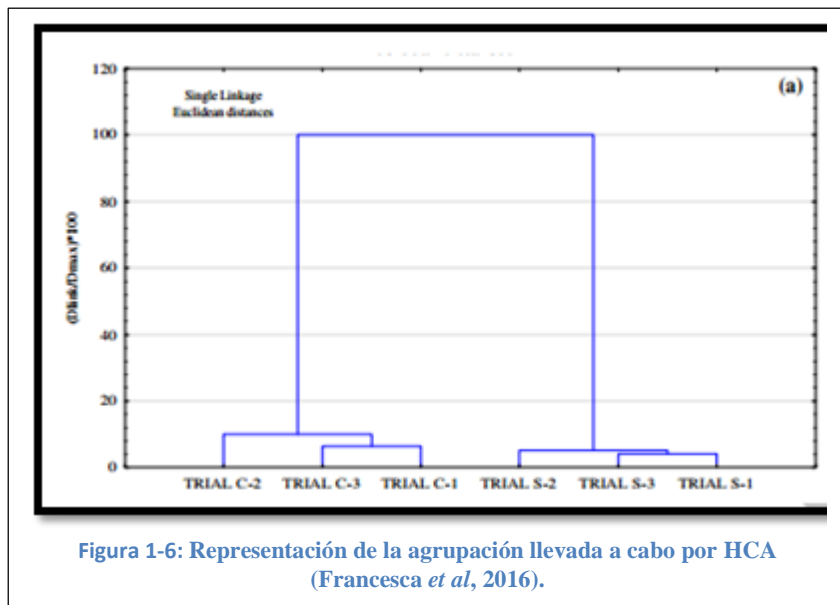


Figura 1-6: Representación de la agrupación llevada a cabo por HCA (Francesca *et al*, 2016).

similitud, lo cual permite identificar qué grupos de datos presentan mayor número de características comunes e interpretar dicha información según el caso de estudio (Figura 1-6) (Bravi *et al*, 1997).

El análisis de clústeres o conglomerados es ampliamente utilizado sin supervisión en el cual el análisis de agrupamiento que utiliza el método de Ward como regla de agrupamiento y utiliza la distancia euclidiana cuadrada como medida para establecer la agrupación (Sarbu *et al*, 2012). El análisis de conglomerados jerárquico (HCA) utiliza la medida descrita anteriormente para formar agrupaciones secuencialmente, agrupando primero los grupos de datos más similares y agrupando al final los conjuntos de datos menos similares (Goyeneche *et al*, 2014).

Regresión de mínimos cuadrados ortogonales (OPLS)

Cuando los análisis exploratorios como PCA no permiten visualizar de forma clara las diferencias o similitudes entre grupos de datos por una baja separación entre los puntos ubicados en el *score*, un análisis supervisado como el OPLS-DA permite obtener información más detallada del conjunto de datos, ya que su algoritmo le permite buscar diferencias más puntuales cuando el diseño del experimento permite realizar predicciones sobre las posibles diferencias entre el grupo de datos estudiado con respecto a otro grupo de datos (Figura 1-7) (Worley y Powers 2013).

Este análisis posee gran utilidad ya que permite separar aún más los grupos de datos debidamente categorizados que otros análisis ya que permite

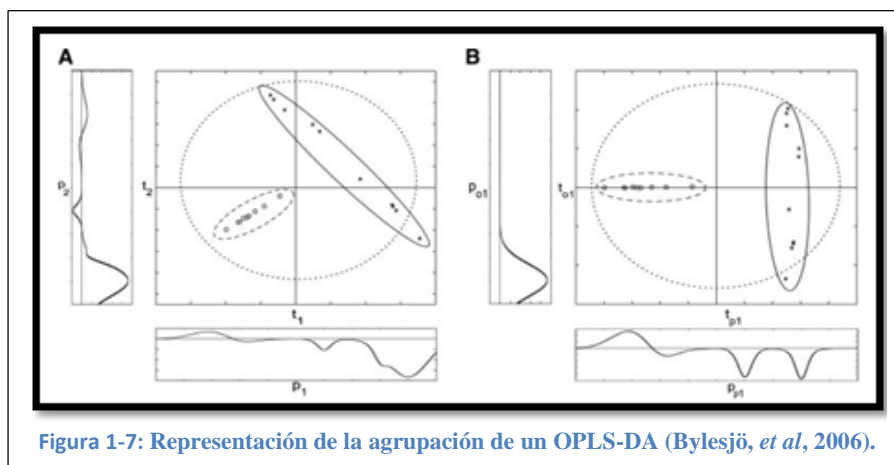


Figura 1-7: Representación de la agrupación de un OPLS-DA (Bylesjö, *et al*, 2006).

diferenciar la varianza explicada de la no explicada, la cual es dada por otro componente ortogonal a los datos analizados (Bylesjö, *et al*, 2006).

Este tipo de representación gráfica permite obtener información derivada de estudios en diferentes disciplinas de mejor manera que otros análisis basados en regresiones, por tanto es comúnmente utilizado en diferentes estudios con diferentes fines como estudios metabólicos, epidemiológicos, poblacionales, de desarrollo, productivo, ontogénico, medioambiental u otros estudios con fines predictivos (Sadeghi-Bazargani *et al*, 2011).

Referencias

- ❖ Alécio, A. C., Bolzani, V. D. S., Young, M. C. M., Kato, M. J., & Furlan, M. (1998). Antifungal amide from leaves of *Piper hispidum*. *Journal of Natural Products*, 61(5), 637-639.
- ❖ Amaya-Villarreal, Á. M., & Renjifo, L. M. (2010). Efecto del retamo espinoso (*Ulex europaeus*) sobre las aves de borde en un bosque altoandino. *Ornitología Colombiana*, 10, 11-25.
- ❖ Araújo, A. P., Teixeira, M. G., & De Almeida, D. L. (1997). Phosphorus efficiency of wild and cultivated genotypes of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under biological nitrogen fixation. *Soil Biology and Biochemistry*, 29(5-6), 951-957.
- ❖ Arroyo, M. T. K., Armesto, J. J., & Villagran, C. (1981). Plant phenological patterns in the high Andean Cordillera of central Chile. *The Journal of Ecology*, 205-223.
- ❖ Beebe, S., Toro Ch, O., Chaco´n, M. I., & Debouck, D. G. (1997). Wild-weed-crop complexes of common bean (*Phaseolus vulgaris* L., Fabaceae) in the Andes of Peru and Colombia, and their implications for conservation and breeding. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 44(1), 73-91.
- ❖ Bro, R., & Smilde, A. K. (2014). Principal component analysis. *Analytical Methods*, 6(9), 2812-2831.
- ❖ Bylesjö, M., Rantalainen, M., Cloarec, O., Nicholson, J. K., Holmes, E., & Trygg, J. (2006). OPLS discriminant analysis: combining the strengths of PLS-DA and SIMCA classification. *Journal of Chemometrics*, 20(8-10), 341-351.
- ❖ Caziani, S. M., & Derlindati, E. J. (1999). Humedales altoandinos del Noroeste de Argentina: su contribución a la biodiversidad regional. *Tópicos sobre humedales subtropicales y templados de Sudamérica*, 1-13.
- ❖ Celis, Á., Mendoza, C., Pachón, M., Cardona, J., Delgado, W., & Cuca, L. E. (2008). Extractos vegetales utilizados como biocontroladores con énfasis en la familia Piperaceae. Una revisión. *Agronomía Colombiana*, 26(1), 97.
- ❖ Chapin III, F. S. (1980). The mineral nutrition of wild plants. *Annual review of ecology and systematics*, 11(1), 233-260.
- ❖ Christiansen, I., & Graham, P. H. (2002). Variation in di-nitrogen fixation among Andean bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes grown at low and high levels of phosphorus supply. *Field crops research*, 73(2), 133-142.
- ❖ da Silva, R. V., Navickiene, H. M. D., Kato, M. J., Bolzani, V. D. S., Méda, C. I., Young, M. C. M., & Furlan, M. (2002). Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. *Phytochemistry*, 59(5), 521-527.

- ❖ Dasgupta, N., & De, B. (2004). Food Chemistry Antioxidant activity of *Piper betle* L. leaf extract in vitro, 88, 219–224. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.01.036>
- ❖ Dewick, P. M. (2002). *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. John Wiley & Sons.
- ❖ Dodson, C. D., Dyer, L. A., Searcy, J., & Wright, Z. (2000). Cenocladamide , a dihydropyridone alkaloid from *Piper cenocladum*, 53, 51–54.
- ❖ Drummond, C. S. (2008). Diversification of *Lupinus* (Leguminosae) in the western New World: Derived evolution of perennial life history and colonization of montane habitats. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 48(2), 408–421. doi:10.1016/j.ympev.2008.03.009
- ❖ Drummond, C. S., Eastwood, R. J., Miotto, S. T. S., & Hughes, C. E. (2012). Multiple continental radiations and correlates of diversification in *Lupinus* (leguminosae): Testing for key innovation with incomplete taxon sampling. *Systematic Biology*, 61(3), 443–460. doi:10.1093/sysbio/syr126
- ❖ Dueñas, M., Hernandez, T., Estrella, I., & Fernandez, D. (2009). Germination as a process to increase the polyphenol content and antioxidant activity of lupin seeds (*Lupinus angustifolius* L.). *Food Chemistry*, 117(4), 599-607.
- ❖ Duran, V. E. B. (2011). Biodiversidad Y Ecogeografía Del Género *Lupinus* L. (Leguminosae) En Colombia. *Universidad Nacional De Colombia Facultad De Ciencias Agropecuarias*, 1–118.
- ❖ Duran, V. E. B. (2011). Biodiversidad Y Ecogeografía Del Género *Lupinus* L. (Leguminosae) En Colombia. *Universidad Nacional De Colombia Facultad De Ciencias Agropecuarias*, 1–118.
- ❖ Dyer, L. A., Richards, J., & Dodson, C. D. (2004). Isolation, synthesis, and evolutionary ecology of Piper amides. In *Piper: A model genus for studies of phytochemistry, ecology, and evolution* (pp. 117-139). Springer US.
- ❖ Falconi, C. E., Visser, R. G., & van Heusden, S. (2015). Influence of plant growth stage on resistance to anthracnose in Andean lupin (*Lupinus mutabilis*). *Crop and Pasture Science*, 66(7), 729-734.
- ❖ Francesca, N., Barbera, M., Martorana, A., Saiano, F., Gaglio, R., Aponte, M., ... & Settanni, L. (2016). Optimised method for the analysis of phenolic compounds from caper (*Capparis spinosa* L.) berries and monitoring of their changes during fermentation. *Food chemistry*, 196, 1172-1179.
- ❖ Fredeen, A. L., & Field, C. B. (1992). Ammonium and nitrate uptake in gap, generalist and understory species of the genus *Piper*. *Oecologia*, 92(2), 207-214.

- ❖ Frick, K. M., Kamphuis, L. G., Siddique, K. H., Singh, K. B., & Foley, R. C. (2017). Quinolizidine alkaloid biosynthesis in lupins and prospects for grain quality improvement. *Frontiers in Plant Science*, 8.
- ❖ Gomez-Ruiz, P. (2011). Efecto de la densidad de siembra sobre las interacciones biológicas entre las leguminosas *Lupinus bogotensis* y *Vicia bengha lensis* con las nativas *Solanum oblongifolium* y *Viburnum tinoides* en parcelas experimentales de restauración ecológica del bosque altoandino. Facultad de ciencias, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia
- ❖ Gómez-Ruiz, P. A., Lindig-Cisneros, R., & Vargas-Ríos, O. (2013). Facilitation among plants: A strategy for the ecological restoration of the high-andean forest (Bogotá, D.C.-Colombia). *Ecological Engineering*, 57, 267–275. doi:10.1016/j.ecoleng.2013.04.049
- ❖ Goyeneche, R., Roura, S., & Di Scala, K. (2014). Principal component and hierarchical cluster analysis to select hurdle technologies for minimal processed radishes. *LWT-Food Science and Technology*, 57(2), 522-529.
- ❖ Gross, R., Von Baer, E., Koch, F., Marquard, R., Trugo, L., & Wink, M. (1988). Chemical composition of a new variety of the Andean lupin (*Lupinus mutabilis* cv. Inti) with low-alkaloid content. *Journal of food composition and analysis*, 1(4), 353-361.
- ❖ Harrigan, G. G., & Goodacre, R. (Eds.). (2012). *Metabolic profiling: its role in biomarker discovery and gene function analysis*. Springer Science & Business Media.
- ❖ Hernández, G., Valdés-López, O., Ramírez, M., Goffard, N., Weiller, G., Aparicio-Fabre, R., ... & Vance, C. P. (2009). Global changes in the transcript and metabolic profiles during symbiotic nitrogen fixation in phosphorus-stressed common bean plants. *Plant Physiology*, 151(3), 1221-1238.
- ❖ Horner, H. T., Wanke, S., & Samain, M. S. (2009). Evolution and systematic value of leaf crystal macropatterns in the genus *Peperomia* (Piperaceae). *International Journal of Plant Sciences*, 170(3), 343-354.
- ❖ Hussain, K., Ismail, Z., Sadikun, A., & Ibrahim, P. (2009). Evaluation of metabolic changes in fruit of *Piper sarmentosum* in various seasons by metabolomics using fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. *International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 1(2), 68-71.
- ❖ Jaramillo, M. A., & Callejas, R. (2004). Current Perspectives on the Classification and Phylogenetics of the Genus *Piper* L. In *Piper: a model genus for studies of phytochemistry, ecology, and evolution* (pp. 179-198). Springer US.
- ❖ Jaramillo, M. A., & Manos, P. S. (2001). Phylogeny and patterns of floral diversity in the genus *Piper* (Piperaceae). *American Journal of Botany*, 88(4), 706-716.

- ❖ Johnson, N. D., Liu, B., & Bentley, B. L. (1987). The effects of nitrogen fixation, soil nitrate, and defoliation on the growth, alkaloids, and nitrogen levels of *Lupinus succulentus* (Fabaceae). *Oecologia*, 74(3), 425-431.
- ❖ Judd, W. S., C. S. Campbell, E. A. Kellogg, P. F. Stevens, and M. J. Donoghue. 2002. Plant Systematics, A Phylogenetic Approach, 2nd edition. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA.
- ❖ Kandus, P., Quintana, R. D., Minotti, P. G., Oddi, J. D. P., Baigún, C., Trilla, G. G., & Ceballos, D. (2011). Ecosistemas de humedal y una perspectiva hidrogeomórfica como marco para la valoración ecológica de sus bienes y servicios. *Valoración de servicios ecosistémicos: conceptos, herramientas y aplicaciones para el ordenamiento territorial. Ediciones Inta, Buenos Aires*, 265-292.
- ❖ Lei, L., & Liang, H. (1997). Pollen morphology and its taxonomic significance of Piperaceae. *Acta Botanica Yunnanica*, 20(4), 429-433.
- ❖ Liebeke, M., Bruford, M. W., Donnelly, R. K., Ebbels, T. M., Hao, J., Kille, P., ... & Spurgeon, D. J. (2014). Identifying biochemical phenotypic differences between cryptic species. *Biology letters*, 10(9), 20140615.
- ❖ Luyen, B. T. T., Tai, B. H., Thao, N. P., Yang, S. Y., Cuong, N. M., Kwon, Y. I., ... & Kim, Y. H. (2014). A new phenylpropanoid and an alkylglycoside from *Piper retrofractum* leaves with their antioxidant and α -glucosidase inhibitory activity. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 24(17), 4120-4124.
- ❖ Ma, J., Jones, S. H., Marshall, R., Johnson, R. K., & Hecht, S. M. (2004). A DNA-Damaging Oxoaporphine Alkaloid from *Piper caninum*, 1162–1164.
- ❖ Madigan M., Martinko J., Stahl D., Clark D. (2012). Brock – Biology of microorganisms. (13th ed., pp. 724 - 728)
- ❖ Marques, J. V., Kitamura, R. O. S., Lago, J. H. G., Young, M. C. M., Guimarães, E. F., & Kato, M. J. (2007). Antifungal amides from *Piper scutifolium* and *Piper hoffmanseggianum*. *Journal of natural products*, 70(12), 2036-2039.
- ❖ Mikić, A., Čupina, B., Mihailović, V., Krstić, D., Antanasović, S., Zorić, L., ... Srebrić, M. (2013). Intercropping white (*Lupinus albus*) and Andean (*Lupinus mutabilis*) lupins with other annual cool season legumes for forage production. *South African Journal of Botany*, 89, 296–300. doi:10.1016/j.sajb.2013.06.015
- ❖ Molina-Poveda, C., Lucas, M., & Jover, M. (2013). Evaluation of the potential of Andean lupin meal (*Lupinus mutabilis* Sweet) as an alternative to fish meal in juvenile *Litopenaeus vannamei* diets. *Aquaculture*, 410-411, 148–156. doi:10.1016/j.aquaculture.2013.06.007

- ❖ Nägele, T. (2014). Linking metabolomics data to underlying metabolic regulation. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 1, 22.
- ❖ Naranjo, H. L. (1998). Correlaciones embrión/planta adulta en especies de *Piper* L.(Piperaceae). *Rev. Forest. Venez.*, 42(2), 131-139.
- ❖ Navickiene, H. M. D., Alécio, A. C., Kato, M. J., Bolzani, V. D. S., Young, M. C. M., Cavalheiro, A. J., & Furlan, M. (2000). Antifungal amides from *Piper hispidum* and *Piper tuberculatum*. *Phytochemistry*, 55(6), 621-626.
- ❖ Nouri, L., Mohammadi, A., & Karim, A. A. (2014). properties of different extracts from betel leaves. *Industrial Crops & Products*, 62, 47–52. <http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.08.015>
- ❖ Nuñez, C. I., Aizen, M. A., & Ezcurra, C. (1999). Species associations and nurse plant effects in patches of high-Andean vegetation. *Journal of Vegetation Science*, 10(3), 357-364.
- ❖ Núñez, J. P. V. (2002). Análisis del sitio de un bosque altoandino con énfasis en el mantillo. Microcuenca de la quebrada " La Vieja", Bogotá, Colombia. *Acta Biológica Colombiana*, 7(2), 60-61.
- ❖ Okwute, S. K., & Egharevba, H. O. (2013). Piperine-type amides: review of the chemical and biological characteristics. *International Journal of Chemistry*, 5(3), 99.
- ❖ Péres, V. F., Saffi, J., Melecchi, M. I. S., Abad, F. C., de Assis Jacques, R., Martinez, M. M., ... & Caramão, E. B. (2006). Comparison of soxhlet, ultrasound-assisted and pressurized liquid extraction of terpenes, fatty acids and Vitamin E from *Piper gaudichaudianum* Kunth. *Journal of Chromatography A*, 1105(1), 115-118.
- ❖ Pérez, A. (2000). La estructura ecológica principal de la Sabana de Bogotá. *Bogotá: Sociedad Geográfica de Colombia, Academia de Ciencias Geográficas. Recuperado de http://www.sogeocol.edu.co/documentos/est_eco.pdf*.
- ❖ Pilegaard K., & Gry, J. (2009). *Alkaloids in edible lupin seeds*. Nordic Council of Ministers.
- ❖ Polhill, R. M. 1994. Classification of the Leguminosae. Pages xxxv–xlvi in *Phytochemical Dictionary of the Leguminosae* (F. A. Bisby, J. Buckingham, and J. B. Harborne, eds.). Chapman and Hall, New York, NY.
- ❖ Quijano-Abril, M. A., Callejas-Posada, R., & Miranda-Esquivel, D. R. (2006). Areas of endemism and distribution patterns for Neotropical *Piper* species (Piperaceae). *Journal of Biogeography*, 33(7), 1266-1278.
- ❖ Quijano-Abril, M. A., Callejas-Posada, R., & Miranda-Esquivel, D. R. (2006). Areas of endemism and distribution patterns for Neotropical *Piper* species (Piperaceae). *Journal of Biogeography*, 33(7), 1266-1278.
- ❖ Ramawat, K. G. (Ed.). (2007). *Biotechnology: secondary metabolites*. CRC Press.

- ❖ Ruíz-Molina, J. (2015). Grupos funcionales de plantas con potencial para la restauración ecológica de manantiales de agua en la microcuenca de la Laguna de Pedro Palo y sus alrededores, Cundinamarca-Colombia (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Colombia-Sede Bogotá).
- ❖ Rundel, P. W. 1989. Ecological success in relation to plant form and function in the woody legumes. In C.H. Stirton and J.L. Zarucchi (eds.). *Advances in legume biology, Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Gardens* 29: 377-398.
- ❖ Sadeghi-Bazargani, H., Bangdiwala, S. I., Mohammad, K., Maghsoudi, H., & Mohammadi, R. (2011). Compared application of the new OPLS-DA statistical model versus partial least squares regression to manage large numbers of variables in an injury case-control study. *Scientific Research and Essays*, 6(20), 4369-4377.
- ❖ Sârbu, C., Naşcu-Briciu, R. D., Kot-Wasik, A., Gorinstein, S., Wasik, A., & Namieśnik, J. (2012). Classification and fingerprinting of kiwi and pomelo fruits by multivariate analysis of chromatographic and spectroscopic data. *Food Chemistry*, 130(4), 994-1002.
- ❖ Sarmiento, L., & Bottner, P. (2002). Carbon and nitrogen dynamics in two soils with different fallow times in the high tropical Andes: indications for fertility restoration. *Applied Soil Ecology*, 19(1), 79-89.
- ❖ Sarmiento, L., Llambí, L. D., Escalona, A., & Marquez, N. (2003). Vegetation patterns, regeneration rates and divergence in an old-field succession of the high tropical Andes. *Plant Ecology*, 166(1), 145-156.
- ❖ Soltis, D. E., P. S. Soltis, M. W. Chase, M. E. Mort, D. C. Albach, M. Zanis, V. Savolainen, W. H. Hahn, S. B. Hoot, M. F. Fay, M. Axtell, S. M. Swensen, L. M. Prince, W. J. Kress, K. C. Nixon, and J. S. Farris. (2000). Angiosperm phylogeny inferred from 18S rDNA, *rbcL*, and *atpB* sequences. *Botanical Journal of the Linnean Society* 133:381-461.
- ❖ Souza, L. A., Moscheta, I. S., & Oliveira, J. H. G. (2004). Comparative morphology and anatomy of the leaf and stem of *Peperomia dahlstedtii* C. DC., *Ottonia martiana* Miq. and *Piper diospyrifolium* Kunth (Piperaceae). *Gayana Bot*, 61(1), 6-17.
- ❖ Stevens, P.F (2001 onwards). Angiosperms Phylogeny Website. Versión 12. Julio, 2012.
- ❖ Swapna, N. L., Ammani, K., & Saripalli, H. P. (2012). Antioxidant activity of Mokkathotapapada leaves of *Piper betel* L. Cv. Kapoori. *Free Radicals and Antioxidants*, 2(4), 68-72.
- ❖ Tabopda, T. K., Ngoupayo, J., Liu, J., Mitaine-Offer, A. C., Tanoli, S. A. K., Khan, S. N., ... & Luu, B. (2008). Bioactive aristolactams from *Piper umbellatum*. *Phytochemistry*, 69(8), 1726-1731.

- ❖ Tebbs, M. C. (1993). Piperaceae. In *Flowering Plants· Dicotyledons* (pp. 516-520). Springer Berlin Heidelberg.
- ❖ Trelease, W., & Yuncker, T. G. (1950). *The Piperaceae of Northern South America* (Vol. 1). University of Illinois Press.
- ❖ Tucker, S. C. (1980). Inflorescence and flower development in the Piperaceae. I. Peperomia. *American Journal of Botany*, 686-702.
- ❖ Tucker, S. C., Douglas, A. W., & Han-Xing, L. (1993). Utility of ontogenetic and conventional characters in determining phylogenetic relationships of Saururaceae and Piperaceae (Piperales). *Systematic Botany*, 614-641.
- ❖ Tugizimana, F., Piater, L., & Dubery, I. (2013). Plant metabolomics: A new frontier in phytochemical analysis. *South African Journal of Science*, 109(5-6), 01-11.
- ❖ Uyanöz, R., & Karaca, Ü. (2011). Effects of different salt concentrations and Rhizobium inoculation (native and *Rhizobium tropici* CIAT899) on growth of dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *European Journal of Soil Biology*, 47(6), 387-391. doi:10.1016/j.ejsobi.2011.07.007
- ❖ Vidal, L. F., Delgado, J., & Andrade, G. I. (2013). Factores de la vulnerabilidad de los humedales altoandinos de Colombia al cambio climático global. *Cuadernos de Geografía: Revista Colombiana de Geografía*, 22(2), 69-85.
- ❖ Vikash, C., Shalini, T., Verma, N. K., Singh, D. P., Chaudhary, S. K., & Asha, R. (2011). Piper betel: Phytochemistry, Traditional Use and Pharmacological Activity—A Review. *International Journal of Pharmacological Research and Development*, 4(4), 216-223.
- ❖ Wanke, S., Jaramillo, M. A., Borsch, T., Samain, M. S., Quandt, D., & Neinhuis, C. (2007). Evolution of Piperales—matK gene and trnK intron sequence data reveal lineage specific resolution contrast. *Molecular phylogenetics and evolution*, 42(2), 477-497.
- ❖ Weerakkody, J., & Parkinson, D. (2006). Input, accumulation and turnover of organic matter, nitrogen and phosphorus in surface organic layers of an upper montane rainforest in Sri Lanka. *Pedobiologia*, 50(4), 377-383.
- ❖ Wink, M. (2013). Evolution of secondary metabolites in legumes (Fabaceae). *South African Journal of Botany*, 89, 164-175.
- ❖ Yuliana, N. D., Jahangir, M., Verpoorte, R., & Choi, Y. H. (2013). Metabolomics for the rapid dereplication of bioactive compounds from natural sources. *Phytochemistry reviews*, 12(2), 293-304.
- ❖ Yuliana, N. D., Khatib, A., Choi, Y. H., & Verpoorte, R. (2011). Metabolomics for bioactivity assessment of natural products. *Phytotherapy research*, 25(2), 157-169.

- ❖ Yuliana, N. D., Khatib, A., Choi, Y. H., & Verpoorte, R. (2011). Metabolomics for bioactivity assessment of natural products. *Phytotherapy research*, 25(2), 157-169.

Capítulo 2 : DIFERENCIAS EN EL ESQUEMA DE FERTILIZACIÓN PROMUEVE VARIACIONES EN EL METABOTIPO DE LAS HOJAS DE PLÁNTULAS DE *Piper bogotense*

RESUMEN

Piper bogotense (Piperaceae) es una planta que presenta distribución en ecosistemas andinos de Ecuador, Colombia y Panamá. Se ha reportado que las hojas de *Piper bogotense* son de fácil descomposición en la hojarasca, por lo que desempeñan un importante rol en la circulación de nutrientes al suelo. Así mismo, para plantas del género *Piper* se ha descrito que la actividad de la enzima nitrato reductasa puede variar según la disponibilidad de nitrógeno en el sustrato, así como cambios en el metaboloma de frutos según factores ontogénicos. Como parte del interés en los cambios metabólicos en especies andinas, en el presente trabajo se estudiaron las variaciones en el metaboloma de *Piper bogotense* en tres subestados fenológicos y según el contenido de nitrógeno disponible. Para ello, se sometieron a germinación semillas de *Piper bogotense*, las cuales fueron posteriormente sembradas en invernadero y se separaron en cuatro grupos; cada grupo fue tratado con una disolución en la cual se modificó la cantidad de nitrógeno (N estándar, ½ N, ¼ N y el control negativo). De cada grupo se colectaron las hojas de cada planta, se obtuvieron los extractos etanólicos crudos de cada muestra y se perfilaron químicamente mediante LC-MS con un equipo UFLC Shimadzu Prominence con una columna Premier C-18 (4,6 mm x 150 mm, 5 µm). Las huellas digitales de los perfiles químicos se sometieron a proceso de alineamiento y autoescalado, con el propósito de llevarlos a un análisis de todos estos datos por estadística multivariada (PCA, HCA y OPLS-DA). Este proceso permitió obtener correlaciones entre la composición química de los extractos con su respectivo subestado fenológico y tratamiento. Como parte del proceso, se realizó la anotación de picos para lograr su identificación tentativa, lo cual permitió determinar que los metabolitos, como la cumaroiltiramina, desmetilpiplartina, metoxikaempferitrina y dimethoxikaempferitrina, son representativos de cierto subestado fenológico o tratamiento alternando la cantidad de nitrógeno.

Palabras clave: Piperaceae, Metabolómica, Metabotipo, Disolución nutritiva, Análisis estadístico multivariado.

INTRODUCCIÓN

Las plantas del género *Piper* (Piperaceae) son conocidas por su distribución en las regiones tropicales del planeta y, entre ellas, algunas especies tienen ocurrencia en zonas andinas y altoandinas, dado que la producción de diversos metabolitos secundarios les confieren diferentes ventajas adaptativas en su medio ambiente como la resistencia a presiones ambientales (Scott *et al.*, 2008; Pawar and Thaker, 2007). Entre la diversidad de compuestos presentes en las plantas del género *Piper* se describen moléculas de gran importancia por su bioactividad y funciones fisiológicas como alcaloides, amidas, compuestos fenólicos (como flavonas y flavanonas, lignanos, neolignanos, chalconas y dihidrochalconas), terpenos, esteroides, piperolidos, entre otras (Luyen. *et al.*, 2014). Dichas moléculas pueden llegar a tener utilidad en diferentes campos, tales como industria alimentaria, cosmetología, perfumería, farmacología entre otras (Luyen. *et al.*, 2014; Bergo *et al.*, 2010). (Scott *et al.*, 2008; Danelutte *et al.*, 2003). En el caso particular de *Piper bogotense*, cuya distribución se da en zonas andinas de Ecuador, Colombia y Panamá (Trelease y Yuncker, 1950), se han reportado alcaloides, hidroquinonas y benzoquinonas, compuestos fenólicos y esteroides (Peña *et al.*, 2000).

En los ecosistemas en los cuales esta especie se encuentra presente, cumple funciones en la circulación de nutrientes mediante la rápida descomposición de sus hojas en la hojarasca presente en los bosques andinos donde se da su distribución (Nuñez, 2002). Cabe recalcar que para diferentes especies del género *Piper* se ha descrito que, cuando la cantidad de NO_3^- cambia en el sustrato, la actividad de enzimas nitrato-reductasa se ve afectada, ya que la actividad de estas enzimas se encuentra relacionada positivamente con la concentración de NO_3^- disponible (Fredeen *et al.*, 1992).

Por otro lado, también se han reportado cambios relacionados a la ontogenia o estado de desarrollo de plantas del género *Piper*, teniendo que para el caso de *Piper sarmentosum*, se determinó que existen diferencias en la composición química de sus frutos cuando se cosechan en meses diferentes del año; la diferencia en la composición química de este material vegetal se determinó mediante análisis quimiométricos como PCA de las huellas digitales de los espectros infrarrojos de los extractos vegetales (Hussain *et al.*, 2009).

Teniendo en cuenta que las plantas del género *Piper* presentan diferencias en su metabolismo al encontrarse en condiciones nutricionales particulares y según ontogenia, el presente trabajo se enfocó a comprender cómo la disponibilidad de nitrógeno en el sustrato promueve cambios en el metaboloma de *Piper bogotense* durante tres subestados fenológicos iniciales, lo cual contribuiría al conocimiento general sobre las interacciones y respuestas metabólicas de *Piper bogotense* en las zonas andinas donde ha sido reportada, ya que, adicionalmente se ha reportado que esta planta puede ser utilizada en estrategias de recuperación ambiental de humedales altoandinos (Ruiz-

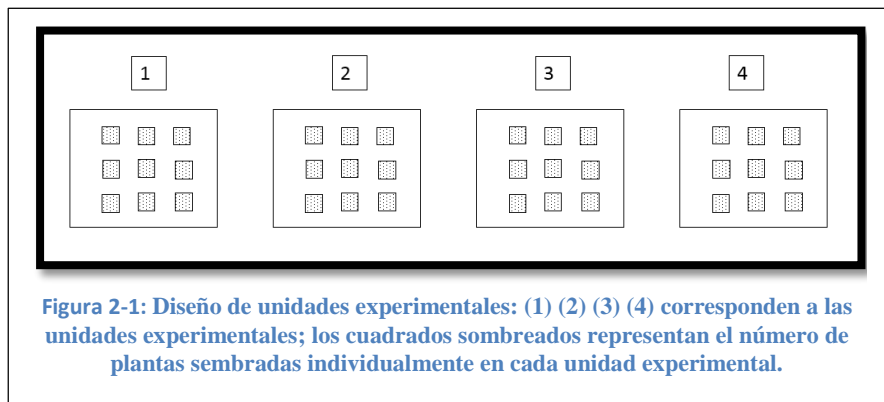
Molina, 2015). De igual manera, el hecho de entender estos cambios puede ser útil también con fines de bioprospección a diferentes niveles (Hussain *et al*, 2009).

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención del material vegetal

Las semillas de *Piper bogotense* se obtuvieron comercialmente en Geoaambiente SAS. Las semillas se sometieron a germinación en cámara húmeda. Con fines de caracterización de las semillas, se cuantificó la masa de las semillas, se determinó su fotoblastismo y se estimó su porcentaje de germinación en dichas condiciones.

Posteriormente, se sometieron a germinación las semillas necesarias para obtener un total de 36 plantas, las cuales se dividieron en cuatro grupos de nueve plantas. Cada grupo se mantuvo en unidades



experimentales separadas en un diseño experimental por bloques aleatorizados (Figura 2-1).

Sustrato empleado para la siembra de las plantas

Las plantas germinadas en cámara húmeda, al desenrollar totalmente sus hojas primordiales, se sembraron en sus respectivas unidades experimentales en materas de 200 g con un sustrato 1:1 de tierra negra y arena de río.

Preparación de disoluciones de Hoagland con diferentes concentraciones de nitrógeno

Se prepararon las disoluciones de Hoagland (Taiz y Zeiger, 2009). Las plantas de cada unidad experimental se trataron con disoluciones diferentes, en las cuales se varió el contenido de nitrógeno disponible según la tabla 2-1. Así, las plantas de la unidad experimental 1 tuvieron la concentración total de nitrógeno de la disolución de Hoagland estándar (disolución 1), las plantas de la unidad experimental 2 se trataron con una disolución que contenía el 50% del nitrógeno disponible (disolución 2), las plantas de la unidad experimental tres se trataron con una disolución que contenía el 25% de la concentración de nitrógeno disponible (disolución 3), las plantas de la

unidad experimental cuatro se trataron únicamente con agua (disolución control) durante todo el experimento, las cuales fueron tomadas como control.

Tabla 2-1: Disoluciones nutritivas del experimento. (MaN) macronutrientes (MiN) micronutrientes. (PM) peso molecular; ([SI]) concentración stock inicial; (VSPLS) volumen del stock por litro de disolvente; (E) elemento; (CFE) concentración final del elemento; (S1) disolución sin modificaciones; (S2) disolución 50% nitrógeno disponible; (S3) disolución 25% nitrógeno disponible.

MaN	PM	[SI]	VSPLS	E	[CFE]	S1	S2	S3
	g/mol	mM	mL/L H ₂ O	SM	uM	mL	mL	mL
KNO ₃	101,1	1000		6 N	16000			
				K	6000	6	3	1,5
K ₂ SO ₄	174,25	1000		6 K	6000	0	3	4,5
Ca(H ₂ PO ₄)	137,06	1000		4 Ca	4000	0	2	3
				P	2000	0	1	1,5
CaSO ₄	136,14	1000		2 S	1000	1	1	1
K(NO ₃) ₂	263,16	1000		4 Ca	4000	4	2	1
NH ₄ H ₂ PO ₄	115,08	1000		2 P	2000	2	1	0,5
MgSO ₄	246,48	1000		1 Mg	1000	1	1	1
MiN	PM	[SI]	VSPLS	E	[CFE]	S1	S2	S3
	g/mol	mM	mL/L H ₂ O	SM	uM	mL	mL	mL
KCl	74,55	25		2 Cl	50	2	2	2
HBO ₄	61,83	12,5		2 B	25	2	2	2
MnSO ₄	169,01	1		2 Mn	2	2	2	2
ZnSO ₄	287,54	1		2 Zn	2	2	2	2
CuSO ₄	249,68	0,25		2 Cu	0,5	2	2	2
H ₂ MoO ₄	161,97	0,25		2 Mo	0,5	2	2	2
FeSO ₄	278,01	64		1 Fe	1	1	1	1
Na ₂ EDTA	372,24							

Efecto de la concentración de nitrógeno en el fertilizante en diferentes subestados fenológicos sobre el metaboloma de *Piper bogotense*

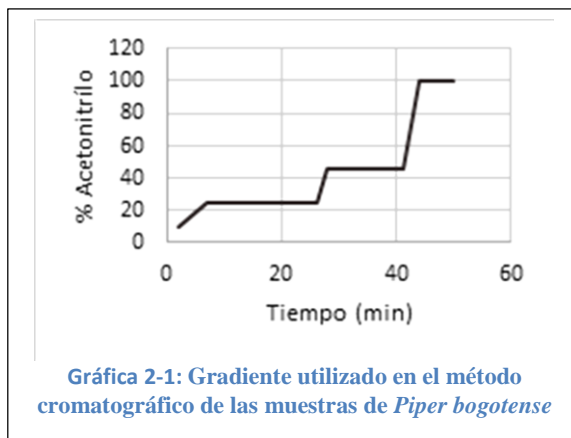
De cada unidad experimental, se realizó la colecta de tres plantas en tres periodos diferentes con el fin de reunir tres réplicas por tratamiento en cada subestado fenológico, los cuales se determinaron según Meier, 2001. Se utilizó la escala general de la BBCH, mediante la cual se establecieron los códigos correspondientes a cada uno de los estados determinados.

Obtención de los extractos vegetales

Las hojas colectadas se sometieron a proceso de liofilización, posteriormente se obtuvieron los extractos crudos mediante ciclos de ultrasonido en etanol absoluto; procedimiento realizado tres veces por muestra. Posteriormente se extrajo el etanol de la disolución obtenida. Los extractos se almacenaron en viales hasta su uso.

Caracterización química de los extractos

Se utilizó un equipo UFLC Shimadzu Prominence el cual se compone de un módulo de separación equipado con dos bombas binarias, autoinyector, horno para columna, detector de arreglo de diodos y una columna Premier C-18 (4,6 mm x 150 mm, 5 μ m). Se inyectó un volumen de muestra de 50 μ L de cada una de las muestras obtenidas, luego fueron diluidas en EtOH 96%, las muestras migraron por la columna a temperatura de 30°C, utilizando un método de separación en gradiente de elución con una fase móvil compuesta por TFA 0.05% en agua y acetonitrilo, según la Gráfica 2-1. Con los cromatogramas obtenidos se correlacionó compuesto mayoritario con su respectivo espectro de masas con el fin de determinar la posible naturaleza química del compuesto mediante análisis de sus espectros EM.



Gráfica 2-1: Gradiente utilizado en el método cromatográfico de las muestras de *Piper bogotense*

Análisis estadístico

Una vez se obtuvieron las huellas digitales para cada extracto de hojas de *Piper bogotense*, se exportaron los datos cromatográficos a formato ASCII, los cuales se alinearon mediante el software Matlab® (v R2013a); los datos fueron normalizados y escalados y posteriormente se importaron al software SIMCA (v 13.3, Umetrics) para construir los diagramas de correlación (Score Plots y Loading line Plots) mediante análisis de componentes principales (PCA) y regresión de mínimos cuadrados parciales ortogonales con análisis discriminante (OPLS-DA).

Anotación de picos (identificación tentativa de los componentes mayoritarios en los extractos)

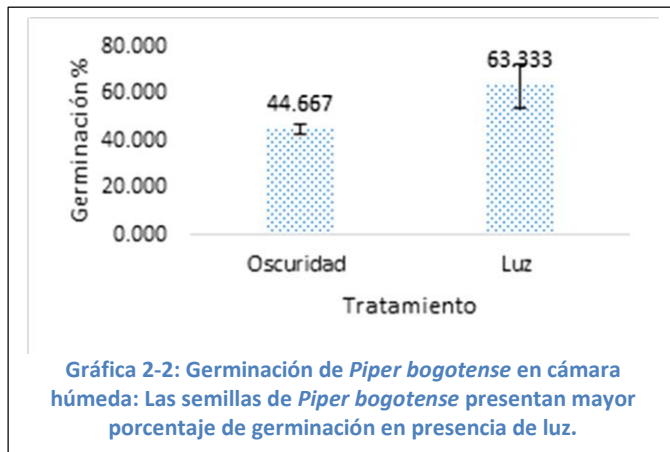
Los picos en los cromatogramas con mayor intensidad registrada por el HPLC-ESI-MS fueron anotados a partir de los valores de m/z recuperados de los respectivos espectros de masas en comparación con la base de datos <http://kanaya.naist.jp>.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización de las semillas

Las semillas de *Piper bogotense* utilizadas para este experimento presentaron una masa promedio de 1,620 mg +/- 0,131. Se determinó que las semillas de *Piper bogotense* en cámara húmeda presentan fotoblastismo nulo, ya que pueden germinar en presencia o ausencia de luz. Sin embargo, se puede apreciar una disminución en el porcentaje de germinación del 17% cuando las

semillas se encuentran en oscuridad (Gráfica 2-2). Otros estudios han reportado resultados que indican una variación en el porcentaje de germinación al someter las semillas a diferentes longitudes de onda, como es el caso de las semillas de otras especies del mismo género, como *Piper aduncum* y *Piper hispidinervum*, de las cuales se presentan reportes de mejores resultados de germinación al ser sometidas a luz blanca (Bergo *et al*, 2010).



Otro factor que incide en la germinación de las semillas de plantas del género *Piper*, como *Piper dilatatum*, *Piper hispidum*, *Piper marginatum* y *Piper peltatum*, es la presencia de nitratos en el medio de germinación, dado que en los bosques donde suelen encontrarse especies de este género, la descomposición de materia orgánica aumenta la concentración de NO_3^- en el sustrato, lo cual contribuye a la germinación de algunas especies del género *Piper*; para las especies anteriores se evaluaron concentraciones de nitrato de potasio entre 1×10^{-2} M y 1×10^{-7} M, obteniendo los porcentajes más altos de germinación para cada especie, los cuales se encontraron entre 60% y 90% (Daws *et al*, 2002).

La germinación de semillas del género *Piper* también se relaciona con la cantidad de luz que reciben; en este experimento se vio un mayor porcentaje de germinación cuando las semillas se encontraban expuestas a la luz. En la literatura se expone que en el caso de *Piper dilatatum*, *Piper hispidum*, *Piper marginatum* y *Piper peltatum*, la germinación de semillas disminuye cuando se exponen a longitudes de onda cercanas a rojo lejano y suelen tardar más tiempo en germinar (Daws *et al*, 2002).

Obtención de los subestados fenológicos de las plantas de *Piper bogotense*

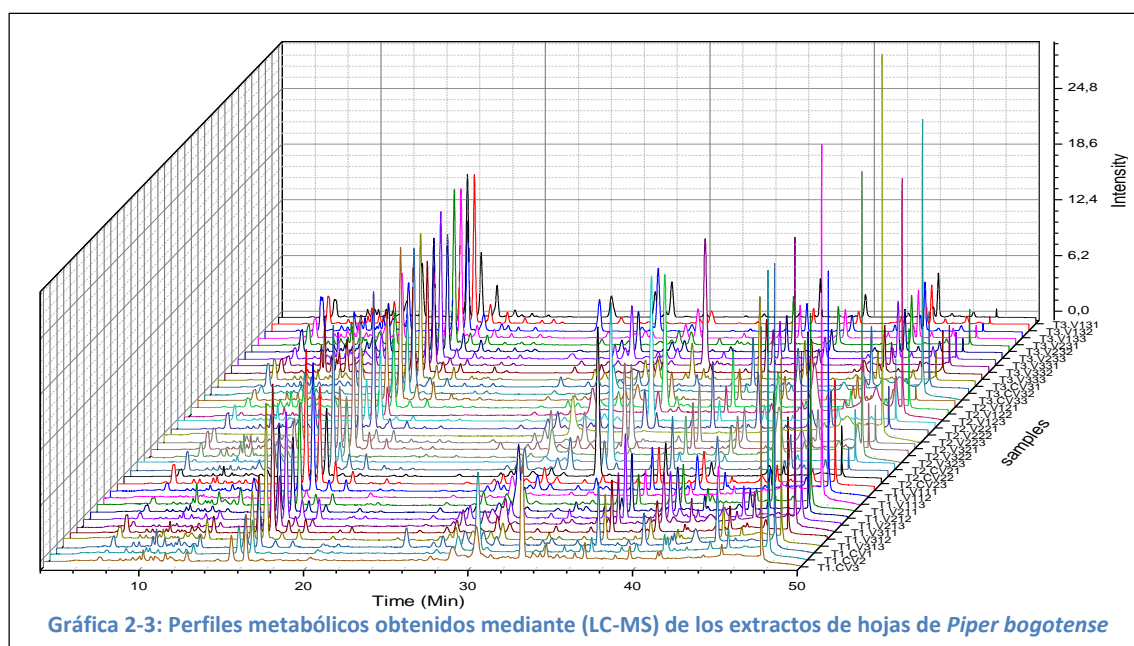
Se determinaron los siguientes subestados fenológicos de acuerdo a la escala BBCH, con el fin de determinar las diferencias en estados tempranos del desarrollo de *Piper bogotense* (tabla 2-2). Se determinaron dichos subestados fenológicos dado que *Piper bogotense* presentó un crecimiento lento en invernadero, comportamiento que puede ser explicado por la radiación del invernadero (Agati *et al*, 2012), ya que se ha reportado que este factor en plantas de sombra es motivo de estrés, o las temperaturas más altas ya que *Piper bogotense* es una planta de sombra y de climas fríos, típicos de bosques altoandinos de la sabana de Bogotá.

Tabla 2-2: Subestados fenológicos de *Piper bogotense* evaluados

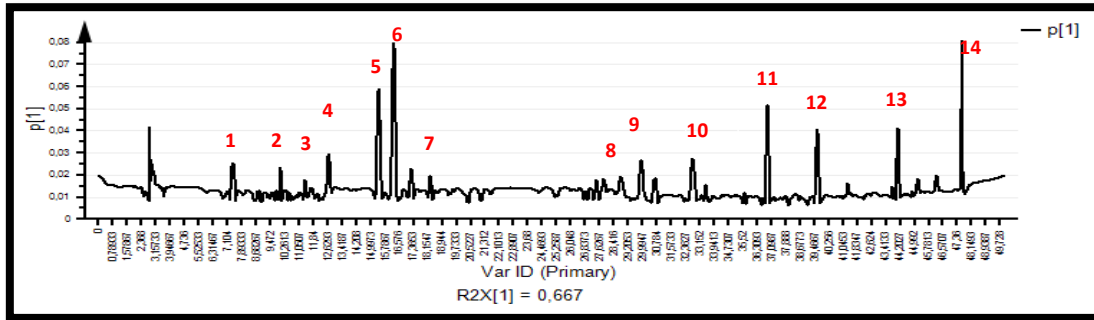
ESTADO FENOLÓGICO	ESCALA BBCH	DESCRIPCIÓN
Vegetativo	1.2	Dos hojas verdaderas
	1.4	Cuatro hojas verdaderas
	1.7	Siete hojas verdaderas

Perfilado metabólico de los extractos obtenidos de *Piper bogotense*

Los perfiles metabólicos obtenidos mediante LC-MS a partir de las plantas sometidas a los diferentes tratamientos, reveló la presencia de diferentes metabolitos secundarios, los cuales son evidenciados mediante señales (entre 7-48 min) con diferentes intensidades (correspondiente a la proporción diferencial en los extractos) y cuya presencia representan metabolitos en particular en cada cromatograma, la cual pertenece a un muestra analizada. En la gráfica 2-3 se encuentran todos los perfiles metabólicos correspondientes a los extractos analizados por LC-MS.



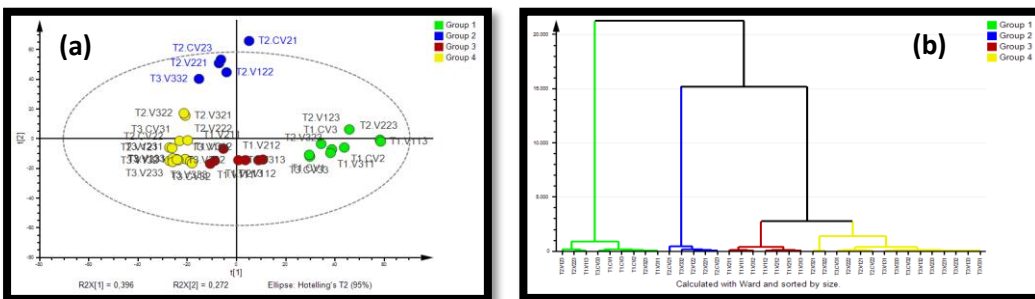
Mediante Pareto normalizado se obtuvo el cromatograma totalizado de los perfiles metabólicos obtenidos mediante (LC-MS) de los extractos de hojas de *Piper bogotense* (Gráfica 2-3), con el fin de proceder al análisis estadístico multivariado; en este gráfico se pueden apreciar los picos anotados de los cuales se realizó la identificación tentativa. En este contexto, el grupo de muestras presentó la ocurrencia de 14 compuestos mayoritarios que fueron seleccionados por su intensidad registrada en los cromatogramas. De acuerdo al método cromatográfico empleado, los compuestos migraron por la columna de acuerdo a su polaridad, por tanto, primero fueron registrados los compuestos más polares y posteriormente los menos polares.



Gráfica 2-4: Cromatograma totalizado de los perfiles químicos de los extractos de hojas de *Piper bogotense*, los números se relacionan con el número del compuesto en la tabla de anexos 2.

Análisis de Componentes Principales (PCA) no supervisado de los perfiles químicos de los extractos de hojas de *Piper bogotense*

El análisis de componentes principales (PCA) junto con el análisis de conglomerados jerárquicos (HCA) se realizó con los datos extraídos de los cromatogramas de todas las muestras analizadas mediante (LC-MS). Este análisis estadístico permitió determinar si se presentaron relaciones o similitudes en la composición metabólica de los extractos de hojas de *Piper bogotense* obtenidos en diferentes estados fenológicos y bajo diferentes esquemas de fertilización alternando la concentración total de nitrógeno disponible en la disolución nutritiva.



Gráfica 2-5: (a) PCA de los perfiles químicos de las muestras de *Piper bogotense*. (b) HCA de los perfiles químicos de las muestras de *Piper bogotense*.

En las gráficas 2-5a-b se presenta, respectivamente, el análisis de componentes principales (PCA) y análisis de conglomerados jerárquicos (HCA) de los perfiles metabólicos de todos los extractos crudos obtenidos de las hojas de *Piper bogotense* de las plantas sometidas a diferente esquema de fertilización analizada en diferentes subestados fenológicos.

El objetivo del análisis de componentes principales (PCA) es extraer información sobresaliente de un grupo de datos matriciales tabulados que permita obtener información de los datos mediante

su agrupación en el diagrama de dispersión, el cual se encuentra trazado por componentes principales ortogonales generados en el análisis. (Abdi y Williams, 2010). (Hussain *et al*, 2009). La transformación de los datos en el PCA se da en términos de un ajuste por mínimos cuadrados. En este análisis se toma el primer eje como la línea que pasa por el centro o mayor cantidad de datos y minimiza el cuadrado de la distancia de cada punto a la línea del componente principal. La línea atraviesa la variación máxima en los datos. El segundo eje PCA también pasa a través de la variación máxima en los datos, pero lo hace de forma ortogonal al primer componente principal (Hussain *et al*, 2009).

Los análisis de conglomerados jerárquicos (HCA) tienen como fin determinar de forma no supervisada la similitud entre grupos de datos mediante índices de similitud, como el índice de Jaccard, el cual permite identificar qué grupos de datos presentan mayor número de características comunes mediante el grado de similitud de los conjuntos de datos y agrupa dicha información que según el caso de estudio puede ser representada gráficamente mediante dendogramas (Bravi *et al*, 1997).

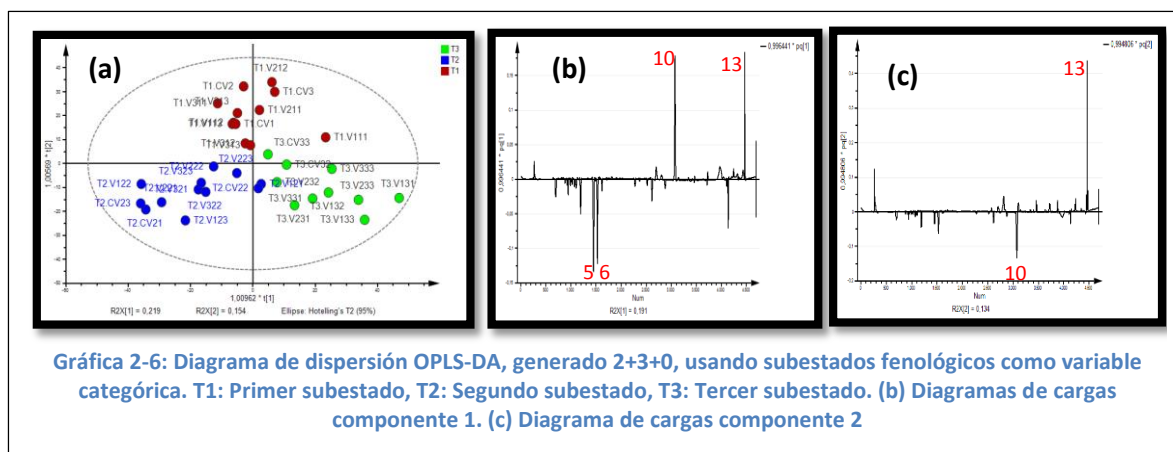
Con los análisis estadísticos mencionados anteriormente, no se evidenció una tendencia marcada entre los perfiles químicos de las muestras, ya sea por su esquema de fertilización o subestado fenológico. No obstante, es posible observar un comportamiento particular en algunos grupos del HCA dependiendo del subestado fenológico, donde se puede observar que la mayoría de muestras del grupo dos generado por el HCA (Gráfica 2-5b) corresponden a extractos obtenidos en el segundo subestado fenológico, el grupo tres está principalmente constituido por extractos obtenidos en el primer subestado fenológico evaluado y el grupo cuatro está conformado por extractos obtenidos en el tercer subestado fenológico evaluado

Regresión de mínimos cuadrados parciales con análisis discriminante (OPLS-DA) supervisado por subestado fenológico

Dado que mediante el análisis estadístico no supervisado de tipo exploratorio anterior se obtuvieron ligeras tendencias en la agrupación de muestras por subestados fenológicos (Gráficas 2-5a-b), se hizo necesario extender el análisis a un enfoque supervisado, con el cual se hallaron de forma más clara las relaciones existentes entre la composición de los extractos obtenidos.

Cuando los análisis exploratorios como PCA no permiten visualizar de manera notoria las diferencias o similitudes entre grupos de datos por una baja separación entre los puntos ubicados en el diagrama de dispersión, un análisis supervisado como el OPLS-DA permite obtener información más detallada del conjunto de datos, ya que su algoritmo le permite buscar diferencias más puntuales cuando el diseño del experimento permite realizar predicciones sobre las posibles diferencias entre el grupo de datos estudiados con respecto a otro grupo de datos (Worley y Powers 2013).

Por lo anterior, se realizó un análisis estadístico de regresión de mínimos cuadrados (OPLS-DA), utilizando como variable categórica de supervisión los subestados fenológicos en los que se colectaron las plantas, con el fin de determinar cómo era la agrupación de los datos en el diagrama de dispersión y establecer así las relaciones entre los extractos obtenidos. Esto permitió identificar qué factores, en términos de expresión de metabolitos, eran determinantes para la diferenciación de los perfiles metabólicos de las muestras obtenidas, como la producción de algún metabolito secundario característico en cada subestado fenológico.



En el diagrama de dispersión del OPLS-DA (Gráfica 2-6) se puede observar la correlación de los grupos de datos correspondientes a las muestras discriminadas por el subestado fenológico en el que fueron obtenidos los extractos (T1, T2, T3), con una dispersión notoria para los extractos de cada subestado evaluado. En este contexto, los gráficos de cargas (*loading line plots*), son herramientas que contienen la información espectral relacionada con la discriminación entre grupos de muestras de un diagrama de dispersión (*score plot*), los cuales pueden ser generados en 2D con el fin de ser interpretados en conjunto con el diagrama de puntos para establecer qué patrón en los datos numéricos se encarga de diferenciar los grupos de datos (Hedenström *et al*, 2008).

Los extractos del estado fenológico (T1) son diferenciados dada la presencia selectiva, respecto a los otros dos subestados, de una amida llamada cumaroiltiramina (**13**), del grupo de las amidas de núcleo piperumbellatámico, reportado en *Piper umbellatum* (Tabopda *et al*, 2008).

La cumaroiltiramina es una amida derivada del ácido hidroxicinámico, (HCAAs), por tanto pertenecen al grupo de los fenilpropanoides, los cuales son derivados de la ruta del shikimato, vía ácido cinámico, el cual se sintetiza a partir de la fenilalanina mediante la enzima fenilalanina amonio liasa PAL (Dewick, 2002). Los fenilpropanoides derivados del ácido hidroxicinámico han sido descritos principalmente como metabolitos secundarios inducibles en respuesta a la presencia de patógenos en la planta (Yogendra *et al*, 2015; Sanmartín, 2008). En *Solanum tuberosum*, se describió que la sobreexpresión del factor de transcripción StWEKY1 en plantas transgénicas

incrementa la producción de enzimas relacionadas con la síntesis de HCAAs tales como tiramin hidroxycinamoil transferasa (THT), fenómeno que también ocurría al inducir la infección por *Phytophthora infestans* en plantas resistentes (Yogendra *et al*, 2015).

Sin embargo, es bueno aclarar que la presencia de HCAAs presentan reportes muy detallados en cuanto a su función como metabolitos de defensa que suelen acumularse en las paredes celulares, pero también hay que tener en cuenta que los HCAAs presentan relación en diferentes procesos relacionados con el desarrollo vegetal en cuanto a división celular, reticulación de la pared celular entre otras (Moschou *et al*, 2012). Por tanto, sería de esperarse que HCAAs como la cumaroiltiramina se encuentre como componente mayoritario en los extractos crudos de hojas de *Piper bogotense* colectados en estados iniciales del desarrollo, encontrándose en mayor medida en los extractos de plantas del primer subestado fenológico que en los otros dos subestados evaluados.

Los grupos de muestras T2 y T3 se distribuyen principalmente en el área negativa del diagrama de dispersión con respecto al componente principal 2, por tal motivo el compuesto desmetilpiplartina (**10**) también es otro metabolito responsable de las diferencias entre los extractos obtenidos en T1 y los extractos T2 y T3. La desmetilpiplartina fue reportada en *Piper cenocladum*, correspondiente a una amida derivada de la piplartina. Se ha reportado que los compuestos derivados de la piplartina se encuentran en las hojas de las plantas de este género comúnmente (Dodson *et al*, 2000). La piplartina también es conocida como piperlongumina, esta molécula corresponde al grupo de las alcanidas, las caules son descritas comúnmente en el género *Piper* (Prabhu y Mulchandani, 1985).

En la literatura se reporta que algunas de las alcanidas aisladas de plantas del género *Piper* son sintetizadas con la ayuda de la enzima *N*-piperoiltransferasa, la cual actúa uniendo piperoil-CoA a la piperidina, pirrolidina, o a la isobutilamina, lo que contribuye a la formación del grupo amida; cabe resaltar que se ha descrito que la función particular de las alcanidas en la planta es contribuir en la defensa contra herbívoros (Rios y Olivos, 2014).

Por lo anterior, se sugiere que en el subestado T1 tenemos mayor expresión de la enzima (PAL) y de tiramin hidroxycinamoil transferasa (THT) (Dewick, 2002; Kettig *et al*, 2006). Dado que en este subestado encontramos la presencia selectiva de cumaroiltiramina, mientras que en los dos siguientes subestados fenológicos se incrementa la actividad de la enzima *N*-piperoiltransferasa con respecto al anterior, ya que esta enzima se relaciona con la producción de alcanidas en *Piper* como la desmetilpiplartina, derivada de la piplartina. Cabe mencionar también que la señal registrada por el compuesto desmetilpiplartina en los cromatogramas en los extractos del subestado T3 es más intensa que en el subestado T2, apoyando lo anteriormente mencionado.

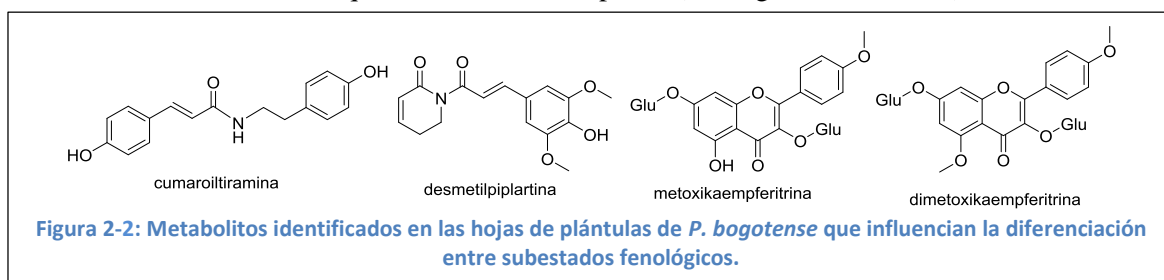
Otra diferencia con respecto a los extractos obtenidos en los subestados fenológicos T2 y T3 corresponde a la presencia en los cromatogramas de señales más intensas para los compuestos metoxikaempferitrina (5) y dimetoxikaempferitrina (6) en los extractos de plantas obtenidas en el subestado T2.

La metoxikaempferitrina y la dimetoxikaempferitrina son compuestos fenólicos derivados del kaempferol, el cual es un flavonol, por ende es producido en la ruta de la fenilalanina. En la glucosidación del kaempferol y formación de la kaempferitrina intervienen enzimas de actividad glucosiltransferasa. En especies del género *Crocus* se han identificado una de estas enzimas que se encargan de transmitir, al kaempferol y quercetina, las unidades de glucosa procedente de UDP-Glucosa al kaempferol (Trapero, 2013). En *Piper umbellatum* se ha reportado la presencia de kaempferitrina (Tabopda *et al*, 2008).

Los flavonoides en las plantas, dada su capacidad antioxidante desarrollan importantes funciones en las plantas, dado que pueden contrarrestar el efecto de los ROS producidos durante los procesos de respiración celular. Estas moléculas ofrecen protección extra a la planta contra el estrés oxidativo, el cual es un factor que puede aumentar en las plantas cuando se exponen a radiación excesiva. La glucosidación de los flavonoides ocurre en el citosol, donde la enzima UDP-glucosidasa transfiere el grupo glucósido a los flavonoides sintetizados en diferentes organelos celulares, teniendo que la síntesis de kaempferol se da principalmente en el retículo endoplasmático (Agati *et al*, 2012).

Esta agrupación de las muestras en el diagrama de dispersión (Gráfica 6) indica que existe una marcada correlación entre la composición química presente en las hojas de *Piper bogotense* y el subestado fenológico en el cual fueron colectadas. Este fenómeno se hace evidente cuando las plantas son sometidas a las mismas condiciones medioambientales, lo cual indica que para esta especie es posible realizar un acercamiento a la composición química (i.e., quimiotipo o metabotipo) según el número de folíolos presentes en la misma a las condiciones evaluadas (Hussain *et al*, 2009; Khalid *et al*, 2011).

Así mismo, cabe resaltar que la composición química de los extractos de *Piper bogotense* no depende únicamente del subestado fenológico en el cual son colectadas, también del tejido del cual se obtienen; igualmente, es de esperarse que existan variaciones en el metaboloma según las condiciones ambientales las que se encuentre la especie (Yamaguchi *et al*, 2011).



Se determinó así que el subestado fenológico bajo condiciones semicontroladas posee cambios los perfiles metabólicos de *Piper bogotense* y, por consiguiente, se obtuvieron algunos metabolitos que se encuentran en mayor proporción en diferentes subestados. Este tipo de análisis puede contribuir al hallazgo de un marcador metabólico asociado a algún fenotipo o estado fenológico en *Piper bogotense* (Pan *et al*, 2013).

Regresión de mínimos cuadrados parciales con análisis discriminante (OPLS-DA) supervisando con variación de nitrógeno disponible.

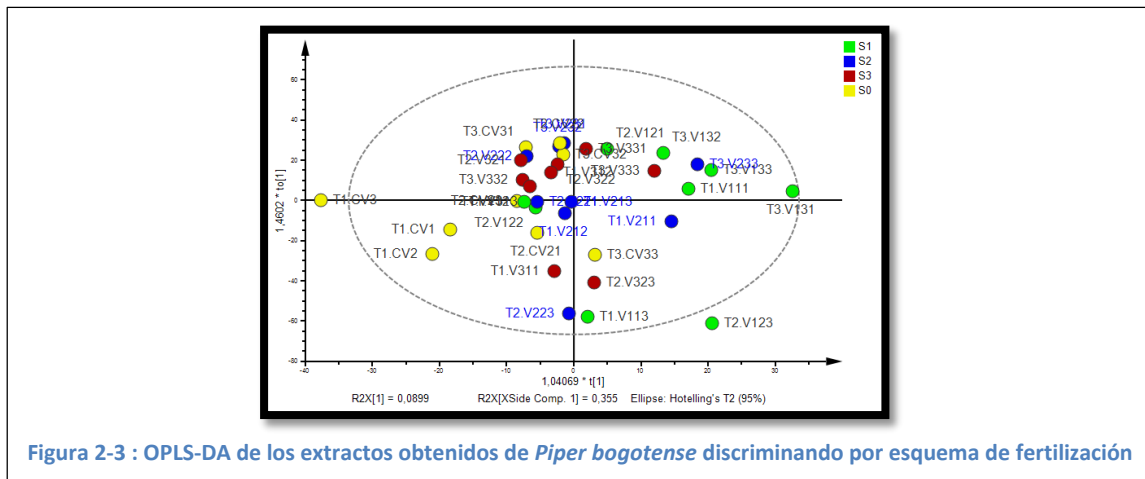
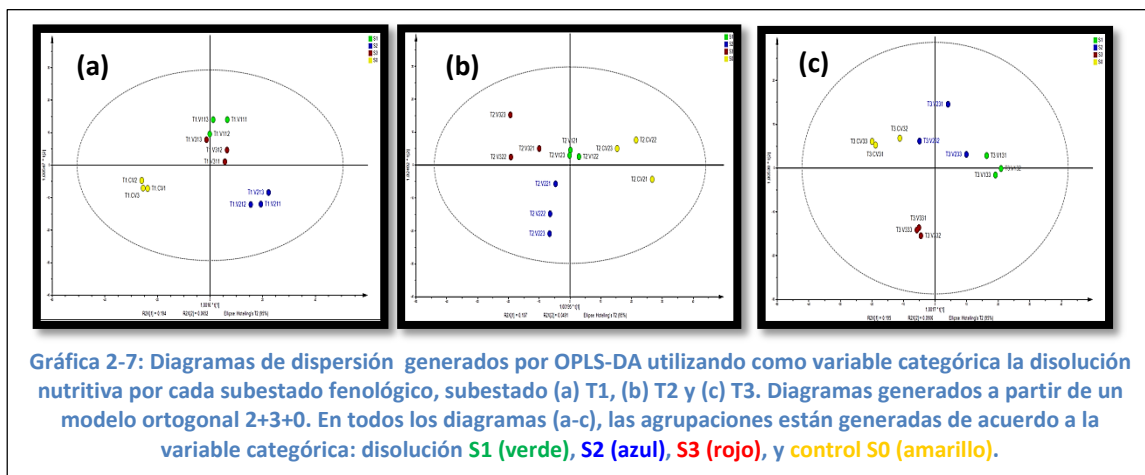


Figura 2-3 : OPLS-DA de los extractos obtenidos de *Piper bogotense* discriminando por esquema de fertilización

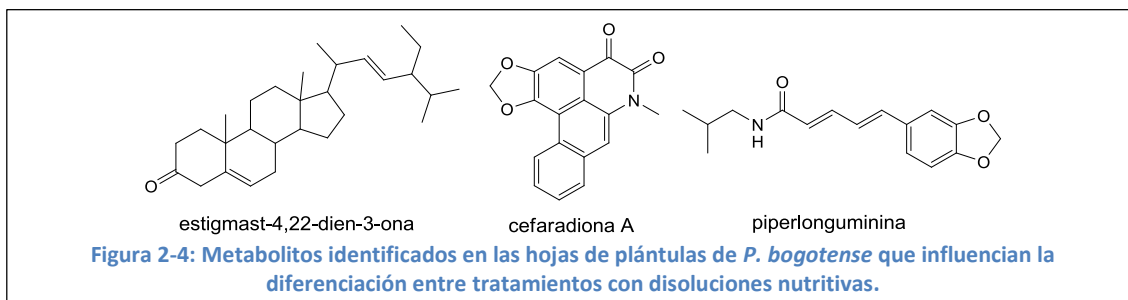
Para determinar si el esquema de fertilización, en el que se cambió la concentración de nitrógeno de cada disolución utilizada según lo explicado en la tabla 1, también influenciaba el metaboloma de *Piper bogotense*, se realizó un OPLS-DA con todas las muestras obtenidas en el experimento, cuya la discriminación se realizó acorde a la disolución nutritiva empleada para cada grupo de plantas (Gráfica 2-3).



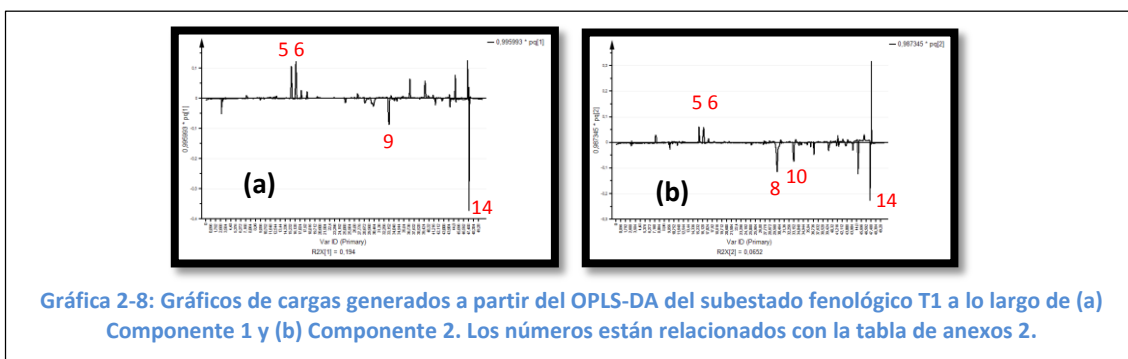
Gráfica 2-7: Diagramas de dispersión generados por OPLS-DA utilizando como variable categórica la disolución nutritiva por cada subestado fenológico, subestado (a) T1, (b) T2 y (c) T3. Diagramas generados a partir de un modelo ortogonal 2+3+0. En todos los diagramas (a-c), las agrupaciones están generadas de acuerdo a la variable categórica: disolución S1 (verde), S2 (azul), S3 (rojo), y control S0 (amarillo).

En la gráfica 2-7 se puede observar que hay una diferenciación altamente marcada entre los perfiles metabólicos de las plantas fertilizadas con las diferentes disoluciones, destacando que las plantas del primer subestado fenológico tratadas con la solución 2 (S2) y grupo control (S0)

presentaron mayor separación en el diagrama de dispersión con respecto a las plantas tratadas con las soluciones 1 (S1) y 3 (S3).



La diferencia en la composición química de los extractos de las plantas obtenidas en el subestado fenológico T1 tratadas con las disoluciones S1 y S3 y los extractos de plantas tratadas con las disoluciones S2 y S0 es influenciada por varios compuestos, principalmente por los compuestos metoxikaempferitina (5) y dimetoxikaempferitina (6), cuyas señales en los cromatogramas fueron más intensas en los extractos tratados con S1 y S3. Además, los extractos de las plantas tratadas con las disoluciones S0 y S2 presentan en mayor medida cefaradiona A (8), desmetilpaltrina (10) y cumaroiltiramina (13) (Gráfica 2-8). La cefaradiona A es un alcaloide oxaporfínico que presenta reportes de bioactividad contra levaduras, por tanto, como otros alcaloides de núcleo aporfínico obtenido de angiospermas basales, puede catalogarse como metabolito de defensa (Ma *et al.*, 2004).

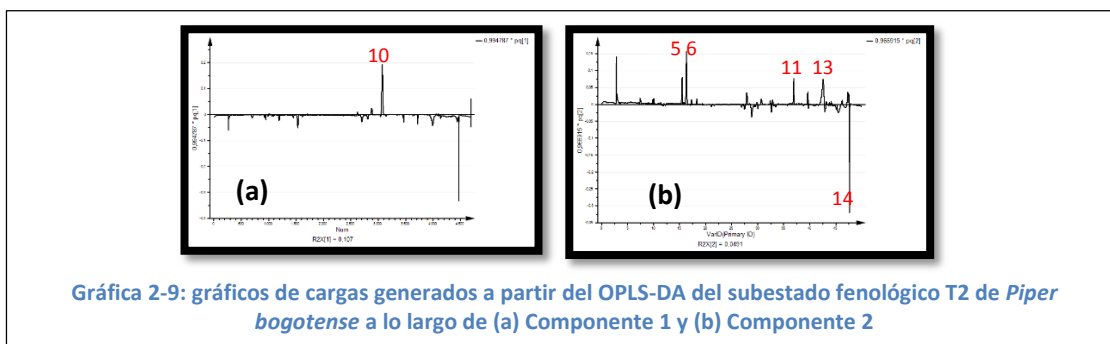


Se realizó también un OPLS-DA de los extractos obtenidos del subestado T2 (Gráfica 2-7b) con el fin de determinar las diferencias existentes entre la composición química de las plantas tratadas con las diferentes disoluciones. De dicho análisis se puede decir que entre réplicas no se presenta una agrupación muy clara excepto para los extractos de las plantas tratadas con la solución S1. No obstante, se observó que la composición química entre réplicas se mantenía constante, pero se manifestaron ligeros cambios entre tales réplicas, relacionadas con la intensidad en cada señal detectada en el cromatograma, lo que claramente influyó en la dispersión en las agrupaciones. Este hecho puede deberse a que el metaboloma de los organismos puede ser muy variable en estados del desarrollo temprano. Otras variables pueden influir como el efecto de borde, o

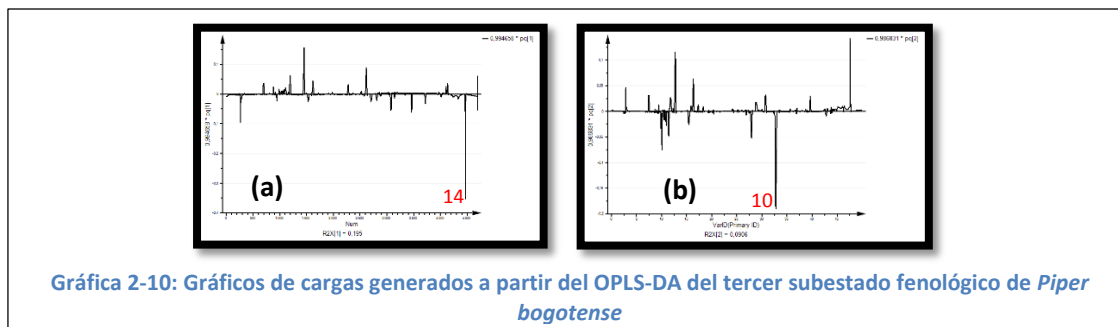
condiciones climáticas no estandarizadas puedan tener influencia en la producción de metabolitos en los organismos, además hay que tener en cuenta que la obtención de material vegetal que se puede obtener en estados del desarrollo temprano puede llegar a ser muy poco, motivo que complica la extracción y procedimientos llevados posteriormente (Kim *et al.*, 2010).

Adicionalmente, se puede indicar que las plantas tratadas con la disolución S3 y con la disolución S0 (Gráfica 2-9) en el subestado fenológico T2 presentan distribución en el diagrama de dispersión en el área negativa y en el área positiva del componente principal 1 respectivamente, por tanto se puede decir que las diferencias se deben a las señales en los cromatogramas correspondiente al compuesto desmetilpiplartina (**10**), las cuales son más intensas en los extractos de las plantas del grupo control y, la señal correspondiente a estigmastdienona (**14**), es más intensa para los extractos de las plantas tratadas con las disoluciones S2 y S3 (Gráfica 2-9).

También se observó que la distribución de las muestras tratadas con las soluciones S1, S3 y S0 se da en el área positiva del componente principal 2, mientras que las muestras tratadas con la solución S2 se encuentran en el área negativa del mismo componente. Por tal motivo se puede decir que la diferencia en la respuesta metabólica de este grupo (S2) con respecto al resto es explicada por la presencia de señales más intensas que el resto, que para este caso se ve influenciada por la expresión del compuesto estigmastdienona (**14**) (Gráfica 2-9).



De igual manera, se realizó un OPLS-DA con los extractos del subestado T3 usando como variable de supervisión la disolución con la cual fueron tratadas las plantas (Gráfica 2-7c), teniendo que los extractos de las plantas tratadas con las disoluciones S0, S1 y S2 tienden a agruparse en el área positiva del componente principal 2, mientras que las plantas tratadas con la solución S3 se agrupan en el área negativa del componente principal 2 por tal motivo se puede decir que la diferencia de este último grupo con el resto se debe a la presencia mayoritaria del derivado de piplartina (**10**) con respecto al resto.



Dado que los extractos de las plantas tratadas con la disolución S0 y S1 se encuentran ubicados en el área negativa y positiva del componente principal 1, respectivamente, se pueden atribuir las diferencias entre estos grupos de muestras a que el grupo control presentan mayor intensidad en la señal registrada por el cromatograma del compuesto **10**.

Es de fundamental importancia entender cómo las plantas utilizan el nitrógeno disponible de su ambiente dado que estas tienen la capacidad de asimilar nitrógeno inorgánico y producir moléculas fundamentales para el desarrollo del mismo organismo (Kusano *et al*, 2011). Necesariamente hay que aclarar que aunque muchas plantas tengan la capacidad de metabolizar nitrógeno inorgánico u orgánico, no todas lo pueden hacer de la misma manera, ya que dentro de la historia evolutiva de las plantas, procesos como deleciones o duplicaciones de genes han hecho que diversas regiones del DNA involucradas en importantes rutas metabólicas presenten gran cantidad de genes agrupadas con la misma función o han hecho desaparecer genes de rutas metabólicas (Chae *et al*, 2014).

Así mismo, como se encuentran agrupaciones de genes dedicados a la misma función para diferentes rutas metabólicas, también es común que una misma serie de genes involucrados en la misma ruta metabólica o con la misma función se encuentren muy distanciados en el genoma. Tomando como ejemplo tenemos que *Arabidopsis thaliana* posee agrupaciones de genes para aquellos fragmentos de DNA involucrados en el metabolismo de fenilpropanoides y de terpenos, y la mayoría de los genes especializados en el metabolismo del nitrógeno no se encuentran en agrupaciones. *Glycine max* (soja) presenta mayor número de genes agrupados para el metabolismo del nitrógeno que para el metabolismo de fenilpropanoides y de terpenos y en el caso de *Sorghum* encontramos mayor número de genes involucrados en el metabolismo de terpenos que de nitrógeno y fenilpropanoides (Chae *et al*, 2014).

La importancia que los genes se encuentren en agrupaciones o no, radica en los niveles de coexpresión para las rutas metabólicas involucradas (Chae *et al*, 2014). De lo anterior se resalta que no todas las plantas metabolizan sustancias de la misma manera ni con los mismos niveles de expresión. Por tanto, se hace necesario el estudio integrado de varias ciencias ómicas para entender de qué manera el nitrógeno puede generar cambios en la expresión fenotípica en los

organismos, ya que por sí solo un análisis metabolómico no puede dar información inambigua de cómo una condición ambiental se ve involucrada en la activación de alguna ruta metabólica (Zhao et al, 2013).

Es importante tener en cuenta también que la disponibilidad de nitrógeno en diferentes concentraciones y en compañía de otros nutrientes pueden llegar a cambiar la expresión de varias rutas metabólicas, lo que desemboca en diferencias en el metaboloma de las especies y producir la expresión de diferentes fenotipos metabólicos (Vidal y Gutiérrez, 2008; Amiour *et al*, 2012). En este estudio, basado meramente en la expresión del fenotipo metabólico de la planta, pudimos establecer algunos cambios metabolómicos relacionados con el estado fenológico de la planta y con el cambio en la concentración de nitrógeno disponible en el medio de la planta.

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se hizo evidente que en el desarrollo temprano de *Piper bogotense* se pueden identificar metabolitos que permiten correlacionar su presencia con algún carácter fenotípico, e.g., número de foliolos durante el estado de plántula. También fue posible determinar cómo cambia el perfil metabólico de *Piper bogotense* cuando se trata con diferentes cantidades de nitrógeno disponible en el medio en el cual se encuentra.

En los tres subestados estudiados, se obtuvieron diferencias en el metabotipo de las plantas. Teniendo la diferencia entre los extractos T1 con respecto a los otros subestados fenológicos, esta discriminación fue marcada por la presencia selectiva de cumaroiltiramina, la cual es una amida del grupo de los fenilpropanoides de tipo HCAAs, mientras que en T2 y T3 se dio la presencia selectiva de la desmetilpiplartina, la cual es una alcanida. Ambos proceden de la ruta metabólica del shikimato, pero se asume gracias a la diferenciación química presente en las muestras que en el subestado T1 la expresión de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) se da en mayor proporción para dar origen al ácido cinámico, el cual es precursor de los fenilpropanoides HCAAs, cuya síntesis es mediada por la enzima tiramin hidroxycinamoil transferasa (THT) y cuyos promotores están debidamente descritos en otras especies.

La diferencia en el metabotipo de los extractos T2 con respecto a los extractos T3 se determinó mediante la presencia selectiva de desmetilpiplartina en T3 y en T2 la presencia selectiva de metoxikaempferitrina y dimethoxikaempferitrina. La desmetilpiplartina es una alcanida derivada de la pipaltrina o piperlongumina, mientras que la metoxikaempferitrina y dimethoxikaempferitrina son flavonoides glicosidades que son derivados de la kaempferitrina, la cual a su vez es producida a partir del kaempferol mediante la glucosidación del kaempferol, reacción que es mediada por la enzima UDP-glucosidasa, por ende se sugiere que esta enzima presenta mayor actividad en el subestado T2 que en T3.

En cuanto a las variaciones en el metaboloma de los extractos con respecto a la solución nutritiva utilizada, se evidenció la tendencia a que las plantas tratadas con la disolución con mayor concentración de nitrógeno expresaban metoxikaempferitrina y dimetoxikaempferitrina, mientras que con S2 se vió favorecido la estigmastdienona.

REFERENCIAS

- ❖ Abdi, H., & Williams, L. J. (2010). Principal component analysis. *Wiley interdisciplinary reviews: computational statistics*, 2(4), 433-459.
- ❖ Alboresi, A., Gestin, C., Leydecker, M., Bedu, M., Meyer, C., & Truong, H. (2005). Nitrate, a signal relieving seed dormancy in *Arabidopsis*, 500–512.
- ❖ Amiour, N., Imbaud, S., Clément, G., Agier, N., Zivy, M., Valot, B., ... & Tercet-Laforgue, T. (2012). The use of metabolomics integrated with transcriptomic and proteomic studies for identifying key steps involved in the control of nitrogen metabolism in crops such as maize. *Journal of Experimental Botany*, 63(14), 5017-5033.
- ❖ Bergo, C. L., Silva, R. C., Ohlson, O. C., Biasi, L. A., & Panobianco, M. (2010). Luz e temperatura na germinação de sementes de pimenta longa (*Piper hispidinervum*) e pimenta-de-macaco (*Piper aduncum*). *Revista Brasileira de Sementes*, 32(3), 170-176.
- ❖ Bravi, G., Gancia, E., Zaliani, A., & Pegna, M. (1997). SONHICA (Simple Optimized Non-Hierarchical Cluster Analysis): A New Tool for Analysis of Molecular Conformations.
- ❖ Chae, L. (2014). Genomic Signatures of Specialized Metabolism in Plants, 510. <http://doi.org/10.1126/science.1252076>
- ❖ Chen, Y., Liao, C., & Chen, I. (2007). Lignans , an amide and anti-platelet activities from *Piper philippinum*, 68, 2101–2111. <http://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.05.003>
- ❖ Chih, K., San, J., Chai, L., & Ching, C. (2009). 4-Methoxycinnamaldehyde inhibited human respiratory syncytial virus in a human larynx carcinoma cell line. *Phytomedicine*, 16(9), 882–886. <http://doi.org/10.1016/j.phymed.2009.02.016>
- ❖ da Silva, R. V., Navickiene, H. M. D., Kato, M. J., Bolzani, V. D. S., Méda, C. I., Young, M. C. M., & Furlan, M. (2002). Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. *Phytochemistry*, 59(5), 521-527.
- ❖ Danelutte, A. P., Lago, J. H. G., Young, M. C. M., & Kato, M. J. (2003). Antifungal flavanones and prenylated hydroquinones from *Piper crassinervium* Kunth. *Phytochemistry*, 64(2), 555-559.

- ❖ Dasgupta, N., & De, B. (2004). Food Chemistry Antioxidant activity of *Piper betle* L . leaf extract in vitro, 88, 219–224. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.01.036>
- ❖ Daws, M. I., Crabtree, L. M., Kirkman, P., & Mullins, C. E. (2002). Differences in seed germination responses may promote coexistence of four sympatric *Piper* species, (Harper 1977), 258–267.
- ❖ Dewick, P. M. (2002). *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. John Wiley & Sons.
- ❖ Dodson, C. D., Dyer, L. A., Searcy, J., & Wright, Z. (2000). Cenocladamide , a dihydropyridone alkaloid from *Piper cenocladum*, 53, 51–54.
- ❖ Hedenström, M., Wiklund, S., Sundberg, B., & Edlund, U. (2008). Visualization and interpretation of OPLS models based on 2D NMR data. *Chemometrics and intelligent laboratory systems*, 92(2), 110-117.
- ❖ Hussain, K., Ismail, Z., Sadikun, A., & Ibrahim, P. (2009). Evaluation of Metabolic Changes in Fruit of *Piper Sarmentosum* in Various Seasons by Metabolomics Using Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy, 1(2), 68–71.
- ❖ Khalid, H., Zhari, I., Amirin, S., & Pazilah, I. (2011). Accelerated Stability and Chemical Kinetics of Ethanol Extracts of Fruit of *Piper sarmentosum* Using High Performance Liquid Chromatography, 10(june 2009), 403–413.
- ❖ Kim, H. K., Choi, Y. H., & Verpoorte, R. (2010). NMR-based metabolomic analysis of plants. *Nature Protocols*, 5(3), 536-549.
- ❖ Kusano, M., Fukushima, A., Redestig, H., & Saito, K. (2011). Metabolomic approaches toward understanding nitrogen metabolism in plants, 62(4), 1439–1453. <http://doi.org/10.1093/jxb/erq417>
- ❖ Luyen, B. T. T., Tai, B. H., Thao, N. P., Yang, S. Y., Cuong, N. M., Kwon, Y. I., ... & Kim, Y. H. (2014). A new phenylpropanoid and an alkylglycoside from *Piper retrofractum* leaves with their antioxidant and α -glucosidase inhibitory activity. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 24(17), 4120-4124.
- ❖ Ma, J., Jones, S. H., Marshall, R., Johnson, R. K., & Hecht, S. M. (2004). A DNA-Damaging Oxoaporphine Alkaloid from *Piper caninum*, 1162–1164.
- ❖ Nouri, L., Mohammadi, A., & Karim, A. A. (2014). properties of different extracts from betel leaves. *Industrial Crops & Products*, 62, 47–52. <http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.08.015>
- ❖ Pallardy, S. G. (2010). *Physiology of woody plants*. Academic Press.

- ❖ Pan, Q., Dai, Y., Nuringtyas, R., & Mustafa, R. (2014). Investigation of the Chemomarkers Correlated with Flower Colour in Different Organs of *Catharanthus roseus* Using NMR-based Metabolomics, (May 2013), 66–74. <http://doi.org/10.1002/pca.2464>
- ❖ Pawar, V. C., & Thaker, V. S. (2007). Evaluation of the anti-*Fusarium oxysporum* f. sp cicer and anti-*Alternaria porri* effects of some essential oils. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(8), 1099-1106.
- ❖ Ringuelet, J. A., & Viña, S. Z. (2013). *Productos naturales vegetales*. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP).
- ❖ Scott, I. M., Jensen, H. R., Philogène, B. J., & Arnason, J. T. (2008). A review of *Piper* spp.(Piperaceae) phytochemistry, insecticidal activity and mode of action. *Phytochemistry Reviews*, 7(1), 65.
- ❖ Swapna, N. L., Ammani, K., & Saripalli, H. P. (2012). Antioxidant activity of Mokkathotapapada leaves of *Piper betel* L. Cv. Kapoori. *Free Radicals and Antioxidants*, 2(4), 68-72.
- ❖ Tabopda, T. K., Ngoupayo, J., Liu, J., Mitaine-Offer, A. C., Tanoli, S. A. K., Khan, S. N., ... & Luu, B. (2008). Bioactive aristolactams from *Piper umbellatum*. *Phytochemistry*, 69(8), 1726-1731.
- ❖ Trapero Mozos, A. (2013). Isolation and characterization of enzymes involved in the biosynthesis of secondary metabolites with phytotherapeutic interest.
- ❖ Vidal, E. A., & Gutierrez, R. A. (2008). A systems view of nitrogen nutrient and metabolite responses in Arabidopsis. *Current opinion in plant biology*, 11(5), 521-529.
- ❖ Worley, B., & Powers, R. (2013). Multivariate analysis in metabolomics. *Current Metabolomics*, 1(1), 92-107.
- ❖ Yamaguchi, L. F., Freitas, G. C., Yoshida, N. C., Silva, R. A., Gaia, A. M., Silva, A. M., ... & Colombo, C. A. (2011). Chemometric analysis of ESIMS and NMR data from *Piper* species. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 22(12), 2371-2382.
- ❖ Abdi, H., & Williams, L. J. (2010). Principal component analysis. *Wiley interdisciplinary reviews: computational statistics*, 2(4), 433-459.
- ❖ Agati, G., Azzarello, E., Pollastri, S., & Tattini, M. (2012). Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. *Plant Science*, 196, 67-76.
- ❖ Alboresi, A., Gestin, C., Leydecker, M., Bedu, M., Meyer, C., & Truong, H. (2005). Nitrate, a signal relieving seed dormancy in Arabidopsis, 500–512.

- ❖ Amiour, N., Imbaud, S., Clément, G., Agier, N., Zivy, M., Valot, B., ... & Tercet-Laforgue, T. (2012). The use of metabolomics integrated with transcriptomic and proteomic studies for identifying key steps involved in the control of nitrogen metabolism in crops such as maize. *Journal of Experimental Botany*, 63(14), 5017-5033.
- ❖ Bergo, C. L., Silva, R. C., Ohlson, O. C., Biasi, L. A., & Panobianco, M. (2010). Luz e temperatura na germinação de sementes de pimenta longa (*Piper hispidinervum*) e pimenta-de-macaco (*Piper aduncum*). *Revista Brasileira de Sementes*, 32(3), 170-176.
- ❖ Bravi, G., Gancia, E., Zaliani, A., & Pegna, M. (1997). SONHICA (Simple Optimized Non-Hierarchical Cluster Analysis): A New Tool for Analysis of Molecular Conformations.
- ❖ Chae, L. (2014). Genomic Signatures of Specialized Metabolism in Plants, 510. <http://doi.org/10.1126/science.1252076>
- ❖ Chen, Y., Liao, C., & Chen, I. (2007). Lignans , an amide and anti-platelet activities from *Piper philippinum*, 68, 2101–2111. <http://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.05.003>
- ❖ Chih, K., San, J., Chai, L., & Ching, C. (2009). 4-Methoxycinnamaldehyde inhibited human respiratory syncytial virus in a human larynx carcinoma cell line. *Phytomedicine*, 16(9), 882–886. <http://doi.org/10.1016/j.phymed.2009.02.016>
- ❖ da Silva, R. V., Navickiene, H. M. D., Kato, M. J., Bolzani, V. D. S., Méda, C. I., Young, M. C. M., & Furlan, M. (2002). Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. *Phytochemistry*, 59(5), 521-527.
- ❖ Danelutte, A. P., Lago, J. H. G., Young, M. C. M., & Kato, M. J. (2003). Antifungal flavanones and prenylated hydroquinones from *Piper crassinervium* Kunth. *Phytochemistry*, 64(2), 555-559.
- ❖ Dasgupta, N., & De, B. (2004). Food Chemistry Antioxidant activity of *Piper betle* L . leaf extract in vitro, 88, 219–224. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.01.036>
- ❖ Daws, M. I., Crabtree, L. M., Kirkman, P., & Mullins, C. E. (2002). Differences in seed germination responses may promote coexistence of four sympatric *Piper* species, (Harper 1977), 258–267.
- ❖ Dewick, P. M. (2002). *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. John Wiley & Sons.
- ❖ Dodson, C. D., Dyer, L. A., Searcy, J., & Wright, Z. (2000). Cenocladamide , a dihydropyridone alkaloid from *Piper cenocladum*, 53, 51–54.

- ❖ Hedenström, M., Wiklund, S., Sundberg, B., & Edlund, U. (2008). Visualization and interpretation of OPLS models based on 2D NMR data. *Chemometrics and intelligent laboratory systems*, 92(2), 110-117.
- ❖ Hussain, K., Ismail, Z., Sadikun, A., & Ibrahim, P. (2009). Evaluation of Metabolic Changes in Fruit of *Piper Sarmentosum* in Various Seasons by Metabolomics Using Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy, 1(2), 68–71.
- ❖ Khalid, H., Zhari, I., Amirin, S., & Pazilah, I. (2011). Accelerated Stability and Chemical Kinetics of Ethanol Extracts of Fruit of *Piper sarmentosum* Using High Performance Liquid Chromatography, 10(june 2009), 403–413.
- ❖ Kim, H. K., Choi, Y. H., & Verpoorte, R. (2010). NMR-based metabolomic analysis of plants. *Nature Protocols*, 5(3), 536-549.
- ❖ Kusano, M., Fukushima, A., Redestig, H., & Saito, K. (2011). Metabolomic approaches toward understanding nitrogen metabolism in plants, 62(4), 1439–1453. <http://doi.org/10.1093/jxb/erq417>
- ❖ Luyen, B. T. T., Tai, B. H., Thao, N. P., Yang, S. Y., Cuong, N. M., Kwon, Y. I., ... & Kim, Y. H. (2014). A new phenylpropanoid and an alkylglycoside from *Piper retrofractum* leaves with their antioxidant and α -glucosidase inhibitory activity. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 24(17), 4120-4124.
- ❖ Ma, J., Jones, S. H., Marshall, R., Johnson, R. K., & Hecht, S. M. (2004). A DNA-Damaging Oxoaporphine Alkaloid from *Piper caninum*, 1162–1164.
- ❖ Matros, A., Amme, S., Kettig, B., BUCK-SORLIN, G. H., Sonnewald, U. W. E., & MOCK, H. P. (2006). Growth at elevated CO₂ concentrations leads to modified profiles of secondary metabolites in tobacco cv. SamsunNN and to increased resistance against infection with potato virus Y. *Plant, Cell & Environment*, 29(1), 126-137.
- ❖ Zhao, N., Wang, G., Norris, A., Chen, X., & Chen, F. (2013). Studying plant secondary metabolism in the age of genomics. *Critical reviews in plant sciences*, 32(6), 369-382.
- ❖ Moschou, P. N., Wu, J., Cona, A., Tavladoraki, P., Angelini, R., & Roubelakis-Angelakis, K. A. (2012). The polyamines and their catabolic products are significant players in the turnover of nitrogenous molecules in plants. *Journal of experimental botany*, 63(14), 5003-5015.
- ❖ Nouri, L., Mohammadi, A., & Karim, A. A. (2014). properties of different extracts from betel leaves. *Industrial Crops & Products*, 62, 47–52. <http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.08.015>
- ❖ Pallardy, S. G. (2010). *Physiology of woody plants*. Academic Press.

- ❖ Pan, Q., Dai, Y., Nuringtyas, R., & Mustafa, R. (2014). Investigation of the Chemomarkers Correlated with Flower Colour in Different Organs of *Catharanthus roseus* Using NMR-based Metabolomics, (May 2013), 66–74. <http://doi.org/10.1002/pca.2464>
- ❖ Pawar, V. C., & Thaker, V. S. (2007). Evaluation of the anti-*Fusarium oxysporum* f. sp cicer and anti-*Alternaria porri* effects of some essential oils. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(8), 1099-1106.
- ❖ Prabhu, B. R., & Mulchandani, N. B. (1985). Biosynthesis of piperlongumine. *Phytochemistry*, 24(11), 2589-2591.
- ❖ Ringuelet, J. A., & Viña, S. Z. (2013). *Productos naturales vegetales*. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP).
- ❖ Rios, M. Y., & Olivo, H. F. (2014). Natural and synthetic alkaloids: applications in pain therapy. *Studies in natural products chemistry*, 43, 79-121.
- ❖ Ruíz Molina, J. (2015). Grupos funcionales de plantas con potencial para la restauración ecológica de manantiales de agua en la microcuenca de la Laguna de Pedro Palo y sus alrededores, Cundinamarca-Colombia (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Colombia-Sede Bogotá).
- ❖ Sanmartín, L. Z. (2008). Nuevas aportaciones al metabolismo secundario del tomate. Identificación y estudio de moléculas implicadas en la respuesta a la infección con *Pseudomonas syringae* pv. tomato (Doctoral dissertation).
- ❖ Scott, I. M., Jensen, H. R., Philogène, B. J., & Arnason, J. T. (2008). A review of *Piper* spp. (Piperaceae) phytochemistry, insecticidal activity and mode of action. *Phytochemistry Reviews*, 7(1), 65.
- ❖ Swapna, N. L., Ammani, K., & Saripalli, H. P. (2012). Antioxidant activity of Mokkahotatapapada leaves of *Piper betel* L. Cv. Kapoori. *Free Radicals and Antioxidants*, 2(4), 68-72.
- ❖ Tabopda, T. K., Ngoupayo, J., Liu, J., Mitaine-Offer, A. C., Tanoli, S. A. K., Khan, S. N., ... & Luu, B. (2008). Bioactive aristolactams from *Piper umbellatum*. *Phytochemistry*, 69(8), 1726-1731.
- ❖ Trapero Mozos, A. (2013). Isolation and characterization of enzymes involved in the biosynthesis of secondary metabolites with phytotherapeutic interest.
- ❖ Vidal, E. A., & Gutierrez, R. A. (2008). A systems view of nitrogen nutrient and metabolite responses in *Arabidopsis*. *Current opinion in plant biology*, 11(5), 521-529.

- ❖ Worley, B., & Powers, R. (2013). Multivariate analysis in metabolomics. *Current Metabolomics*, 1(1), 92-107.
- ❖ Yamaguchi, L. F., Freitas, G. C., Yoshida, N. C., Silva, R. A., Gaia, A. M., Silva, A. M., ... & Colombo, C. A. (2011). Chemometric analysis of ESIMS and NMR data from Piper species. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 22(12), 2371-2382.
- ❖ Yogendra, K. N., Kumar, A., Sarkar, K., Li, Y., Pushpa, D., Mosa, K. A., ... & Kushalappa, A. C. (2015). Transcription factor StWRKY1 regulates phenylpropanoid metabolites conferring late blight resistance in potato. *Journal of experimental botany*, 66(22), 7377-7389.
- ❖ Zhao, N., Wang, G., Norris, A., Chen, X., & Chen, F. (2013). Studying plant secondary metabolism in the age of genomics. *Critical reviews in plant sciences*, 32(6), 369-382.

ANEXOS 2.1

Tabla 2-3: Metabolitos mayoritarios presentes en los extractos obtenidos de *Piper bogotense* en diferente subestado fenológico y bajo diferente esquema de fertilización alternando la cantidad de nitrógeno disponible

No	RT (min)	Nombre	m/z [M+H] ⁺	Muestra											
				T1			T2			T3					
				S0	S1	S2	S3	S0	S1	S2	S3	S0	S1	S2	S3
1	7,42	dihidofutoenona	339,05						X				X	X	
2	10	metoxicubebinina	463,15												X
3	11,5	yangambina	447,5	X		X		X		X	X	X		X	
4	12,75	<i>trans</i> -cafeato de metoxiapigenina glucósido	609,05					X			X	X		X	X
5	15,48	metoxikaempferitrina	593,15		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
6	16,33	dimethoxikaempferitrina	607,05	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
7	17,35	Longicaudatina	447,15		X		X						X		
8	28	cefaradiona	306,4	X		X							X	X	X
9	30,7	No identificado	1663,1	X		X			X		X			X	
10	32,6	desmetilpiplartina	304,35					X	X	X	X				
11	37	eupomatenoidina	265,55	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
12	39,7	neopellitorina	236,55	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
13	44,1	coumaroiltiramina	284,5	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
14	47,7	Stigmastdienona	411,5	X	X	X	X	X			X	X			X

Anexos 2.2

Tabla 2-4: Porcentaje de rendimiento de los extractos etanólicos de *Piper bogotense*

		% Rendimiento		
Muestra	T1	S0	5,009	
		S1	6,593	
		S2	4,062	
	T2	S3	4,87	
		S0	4,03	
		S1	8,091	
	T3	S2	5,985	
		S3	5,467	
		S0	7,521	
		T3	S1	15,033
			S2	16,347
			S3	11,22

Capítulo 3 : DIFERENCIAS EN EL METABOLOMA DE *Lupinus mutabilis* RELACIONADAS CON EL ESQUEMA DE FERTILIZACIÓN EN DIFERENTES SUBESTADOS FENOLÓGICOS

RESUMEN

Lupinus mutabilis (Fabaceae) es una planta distribuida en los ecosistemas andinos colombianos y de otras regiones de Suramérica. Siendo bien conocida por su actividad fijadora de nitrógeno al igual que por la producción de alcaloides quinolizidínicos y diversos compuestos fenólicos, se ha reportado que cambios en el metaboloma de plantas del género *Lupinus* pueden ser presentados por modificaciones en la composición de nutrientes en el sustrato, al igual que a diversificación ontogénica. Por lo anterior, se determinaron los cambios en el fenotipo metabólico (metabotipo) de las hojas de *L. mutabilis* en condiciones de invernadero durante tres subestados fenológicos y alternando la cantidad de nitrógeno en la disolución nutritiva con la cual se trataron las plantas durante el experimento (S1, S2, S3 y S0). Luego de liofilizar el material vegetal, posteriormente se obtuvieron los extractos etanólicos crudos mediante ciclos de ultrasonido y fueron analizados mediante LC-MS. Con los espectros de masas de los picos principales de los cromatogramas se realizó la respectiva anotación de los mismos. Así mismo, con el fin de conocer las variaciones en los perfiles metabólicos entre los tratamientos y estados, se realizaron análisis estadísticos multivariados sobre las huellas digitales de las muestras según las categorías evaluadas. De esta manera, se anotaron 7 compuestos, de los cuales cuatro son alcaloides y dos son isoflavonas. Se determinó que existen diferencias en la composición química de los extractos de hojas dependiendo del subestado fenológico en el cual se colectó el material ya que, en el subestado T1, los compuestos mayoritarios son alcaloides quinolizidínicos, mientras que en subestado T2 se presentan isoflavonas como compuestos mayoritarios, y en el subestado T3 nuevamente se evidencia la presencia mayoritaria de alcaloides, siendo en este último en el que se presentan en mayor medida con respecto al resto. Además de encontrar los compuestos anteriores, se da la producción de compuestos fenólicos. La disolución fertilizante también es un factor que promueve cambios en el metabotipo de *Lupinus mutabilis*.

Palabras clave: Fabaceae, PCA, OPLS-DA, Metabolómica, HPLC-MS

INTRODUCCIÓN

Lupinus mutabilis (Fabaceae), perteneciente al grupo de los *Lupinus* del Oeste de Suramérica (Drummond, 2008; Drummond *et al.* 2012; (Beebe *et al.* 1997), presentando distribución en áreas a lo largo de los Andes en ecosistemas altoandinos (Drummond, 2008; Drummond *et al.* 2012). En Colombia, *Lupinus mutabilis* y otros integrantes de la familia Fabaceae presentan una alta distribución en zonas altoandinas, principalmente en Norte de Santander, viejo Caldas, zona Cundiboyacense y las cordilleras Central y Oriental (Duran, 2011; Pérez, 2000; Arroyo *et al.*, 1981; Gross *et al.*, 1988).

Esta planta presenta alto interés agropecuario ya que sus semillas poseen alto valor nutricional para diferentes especies y además *Lupinus mutabilis* puede utilizarse en rotación de cultivos con el fin de preservar propiedades del suelo como humedad y mantener niveles de nitrógeno óptimos mediante la fijación de nitrógeno atmosférico (Gross *et al.* 1988; Mikić *et al.* 2013; Molina-Poveda *et al.* 2013). La característica de la fijación de nitrógeno atmosférico la encontramos en varias especies de la familia Fabaceae, gracias a las asociaciones simbióticas que presentan con rizobacterias, las cuales realizan la fijación de nitrógeno en los nódulos radiculares de la planta hospedera. Esto otorga a plantas de género *Lupinus* y a la familia Fabaceae potencial restaurador de suelos mediante el aporte de nitrógeno al sustrato (Duran, 2011; Gomez, 2011; Gomez *et al.* 2013).

Referente a lo anterior, se ha demostrado que cuando en el sustrato hay deficiencia en los nutrientes, la nodulación y fijación de nitrógeno se ve disminuida, particularmente hablando del caso de las deficiencias de fósforo en el sustrato (Araújo *et al.*, 1997; Christiansen y Graham, 2002). Esto puede relacionarse con la cantidad de fósforo disponible para fabricar ATP y mantener la actividad óptima de enzimas de actividad nitrogenasa, las cuales desempeñan un importante rol a la hora de fijar nitrógeno atmosférico (Olivera *et al.*, 2004).

No obstante, la disponibilidad de nutrientes solo es uno de los factores que influyen cambios en el metaboloma de las especies. Para el caso del género *Lupinus* se ha reportado que mediante la inoculación con fitopatógenos como *Colletotrichum lupini*, es posible encontrar en los perfiles metabólicos mayor cantidad de fitoalexinas como isoflavonas y diferentes glicoconjugados, con respecto a plantas que no fueron inoculadas con el fitopatógeno (Wojakowska *et al.*, 2013). Diferentes tipos de estrés ambiental, como la sequía, se ha reportado como otro factor de cambios en la producción de metabolitos en plantas del género *Lupinus*, observándose que la concentración de malato en las raíces se ve disminuida, pues dado que este es un metabolito esencial para la

asimilación de nitratos, el metabolismo del nitrógeno puede verse afectado por este tipo de estrés ambiental (Pinheiro *et al*, 2004). También se ha reportado que la ontogenia puede tener incidencia en metaboloma de las especies (Kachlicki y Stobiecki, 2012). Por todo lo expresado anteriormente, en el presente trabajo se describen y analizan los cambios en el metaboloma de *Lupinus mutabilis* durante tres subestados fenológicos diferentes al tratar las plantas con diferentes disoluciones nutritivas alternando la cantidad de nitrógeno disponible; esto con el fin de contribuir al conocimiento general del metaboloma de la especie y con fines de bioprospección, ya que en las plantas del género *Lupinus* se han descrito metabolitos de gran interés en diferentes niveles tales como alcaloides quinolizidínicos (Frick *et al*, 2017), y fitoalexinas como flavonas, isoflavonas, derivados del ácido hidroxicinámico, entre otros (Dueñas *et al*, 2009).

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención del material vegetal

Las semillas de *Lupinus mutabilis* se colectaron manualmente en el campus de la Universidad Militar Nueva Granada. Posteriormente se sometieron a germinación en cámara húmeda con fines de caracterización de las semillas. Se cuantificó la masa de las semillas, se determinó su fotoblastismo y se estimó su porcentaje de germinación en dichas condiciones.

Posteriormente, se sometieron a germinación las semillas necesarias para obtener un total de 36 plantas, las cuales se dividieron en cuatro grupos de nueve plantas. Cada grupo se mantuvo en unidades experimentales separadas en un diseño experimental por bloques aleatorizados .

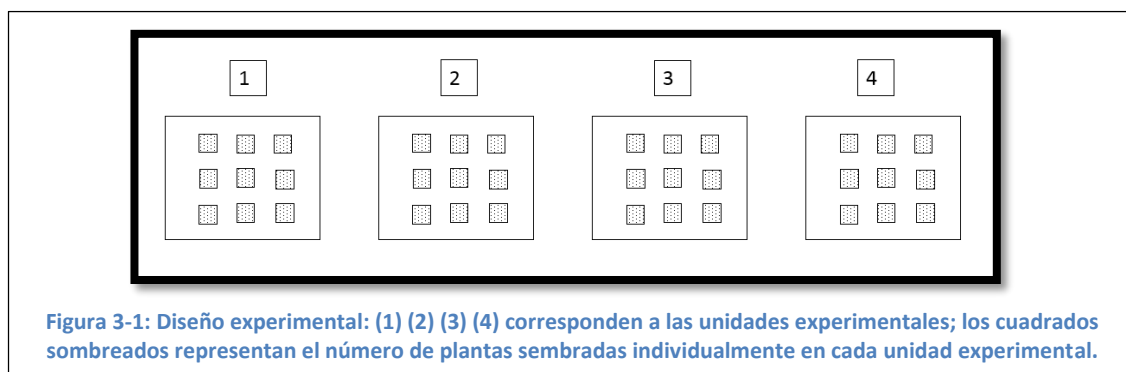


Figura 3-1: Diseño experimental: (1) (2) (3) (4) corresponden a las unidades experimentales; los cuadrados sombreados representan el número de plantas sembradas individualmente en cada unidad experimental.

Sustrato empleado para la siembra de las plantas

Las plantas germinadas en cámara húmeda, al desenrollar totalmente sus hojas primordiales, se sembraron en sus respectivas unidades experimentales en materas de 200 g con un sustrato 1:1 de tierra negra y arena de río.

Preparación de disoluciones de Hoagland con diferentes concentraciones de nitrógeno

Se prepararon las disoluciones de Hoagland (Taiz y Zeiger, 2009). Las plantas de cada unidad experimental se trataron con disoluciones diferentes, en las cuales se varió el contenido de nitrógeno disponible según la tabla 1. Así, las plantas de la unidad experimental 1 tuvieron la concentración total de nitrógeno de la disolución de Hoagland estándar (disolución 1), las plantas de la unidad experimental 2 se trataron con una disolución que contenía el 50% del nitrógeno disponible (disolución 2), las plantas de la unidad experimental tres se trataron con una disolución que contenía el 25% de la concentración de nitrógeno disponible (disolución 3), las plantas de la unidad experimental cuatro se trataron únicamente con agua (disolución control) durante todo el experimento, las cuales fueron tomadas como control.

Tabla 3-1 Disoluciones nutritivas del experimento (MaN) macronutrientes (MiN) micronutrientes. (PM) peso molecular; ([SI]) concentración stock inicial; (VSPLS) volumen del stock por litro de disolvente; (E) elemento; (CFE) concentración final del elemento; (S1) disolución sin modificaciones; (S2) disolución 50% nitrógeno disponible; (S3) disolución 25% nitrógeno disponible.

MaN	PM	[SI]	VSPLS	E	[CFE]	S1	S2	S3
	g/mol	mM	mL/L H ₂ O	SM	uM	mL	mL	mL
KNO ₃	101,1	1000		6 N	16000			
				K	6000	6	3	1,5
K ₂ SO ₄	174,25	1000		6 K	6000	0	3	4,5
Ca(H ₂ PO ₄)	137,06	1000		4 Ca	4000	0	2	3
				P	2000	0	1	1,5
CaSO ₄	136,14	1000		2 S	1000	1	1	1
K(NO ₃) ₂	263,16	1000		4 Ca	4000	4	2	1
NH ₄ H ₂ PO ₄	115,08	1000		2 P	2000	2	1	0,5
MgSO ₄	246,48	1000		1 Mg	1000	1	1	1
MiN	PM	[SI]	VSPLS	E	[CFE]	S1	S2	S3
	g/mol	mM	mL/L H ₂ O	SM	uM	mL	mL	mL
KCl	74,55	25		2 Cl	50	2	2	2
HBO ₄	61,83	12,5		2 B	25	2	2	2
MnSO ₄	169,01	1		2 Mn	2	2	2	2
ZnSO ₄	287,54	1		2 Zn	2	2	2	2
CuSO ₄	249,68	0,25		2 Cu	0,5	2	2	2
H ₂ MoO ₄	161,97	0,25		2 Mo	0,5	2	2	2
FeSO ₄	278,01			1 Fe	1	1	1	1
Na ₂ EDTA	372,24	64						

Efecto de la concentración de nitrógeno en el fertilizante en diferentes subestados fenológicos sobre el metaboloma de *Lupinus mutabilis*

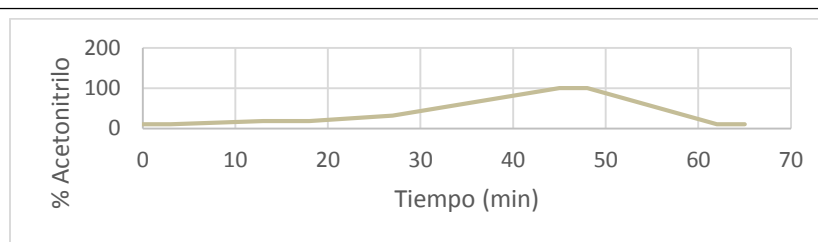
De cada unidad experimental, se realizó la colecta de tres plantas en tres periodos diferentes con el fin de reunir tres réplicas por tratamiento en cada subestado fenológico, los cuales se determinaron según Meier, 2001. Se utilizó la escala general de la BBCH, mediante la cual se establecieron los códigos correspondientes a cada uno de los estados determinados

Obtención de los extractos vegetales

Las hojas de cada planta colectada se sometieron a proceso de liofilización; posteriormente se obtuvieron los extractos crudos mediante ciclos de ultrasonido en etanol absoluto; procedimiento realizado tres veces por muestra. Las disoluciones obtenidas con el fin de retirar el disolvente. Los extractos se almacenaron en viales a temperatura ambiente hasta su uso.

Caracterización química de los extractos

Para caracterizar químicamente los extractos y obtener los perfiles metabólicos de cada uno de ellos, se utilizó un equipo UFLC Shimadzu Prominence el cual se compone de un módulo de separación equipado con dos bombas binarias, autoinyector, horno para columna, detector de arreglo de diodos y una columna Premier C-18 (9,6 mm x 150 mm, 5 μ m). Se inyectó un volumen de muestra de 10 μ L de cada una de las muestras obtenidas, las cuales fueron diluidas en EtOH 96%, las cuales migraron por la columna a temperatura de 30°C, utilizando un método de separación en gradiente de elución con una fase móvil compuesta por TFA 0.05% en agua y acetonitrilo con un flujo de 0,7ml/min. Con los cromatogramas obtenidos se correlacionó compuesto mayoritario con su respectivo espectro de masas con el fin de determinar la naturaleza química del compuesto mediante análisis de sus espectros EM.



Gráfica 3-1: gradiente de la fase móvil del método cromatográfico

Análisis estadístico

Una vez se obtuvieron las huellas digitales para cada extracto de hojas de *Lupinus mutabilis*, se exportaron los datos cromatográficos a formato ASCII, los cuales se alinearon mediante el software Matlab® (R2013a); los datos fueron normalizados y escalados y posteriormente se importaron al software SIMCA (v 13.3, Umetrics) para construir los diagramas de correlación

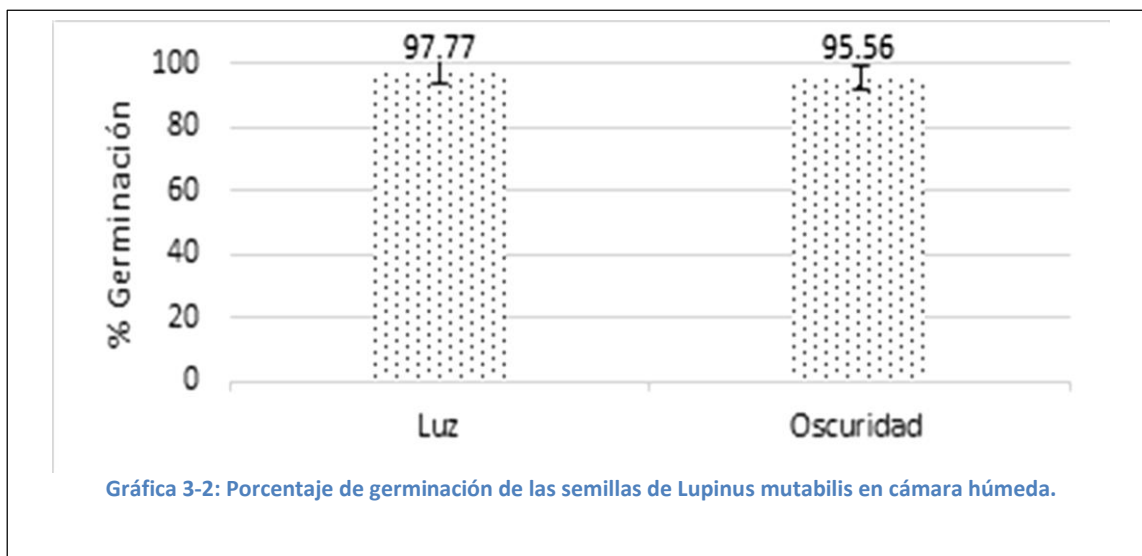
(Score Plots y Loading line Plots) mediante análisis de componentes principales (PCA) y regresión de mínimos cuadrados parciales ortogonales con análisis discriminante (OPLS-DA).

Anotación de picos (identificación tentativa de los componentes mayoritarios en los extractos)

Los picos en los cromatogramas con mayor intensidad detectada por el HPLC-ESI-MS fueron anotados a partir de los valores de m/z recuperados de los respectivos espectros de masas en comparación con la base de datos <http://kanaya.naist.jp>.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

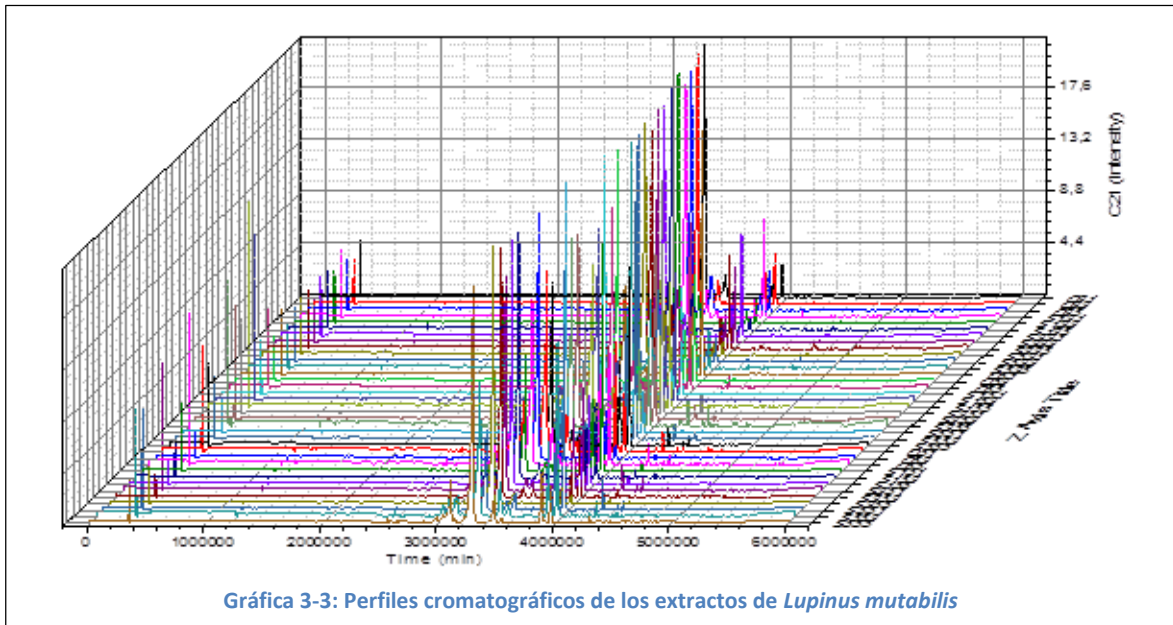
La germinación de las semillas de *Lupinus mutabilis* en este experimento no fue muy diferente al comparar el porcentaje de semillas germinadas en luz u oscuridad, por ende se puede decir que después de someter las semillas a cámara húmeda el porcentaje de germinación es alto, las semillas no presentan fotoblastismo y la desviación estándar es baja en cada caso.



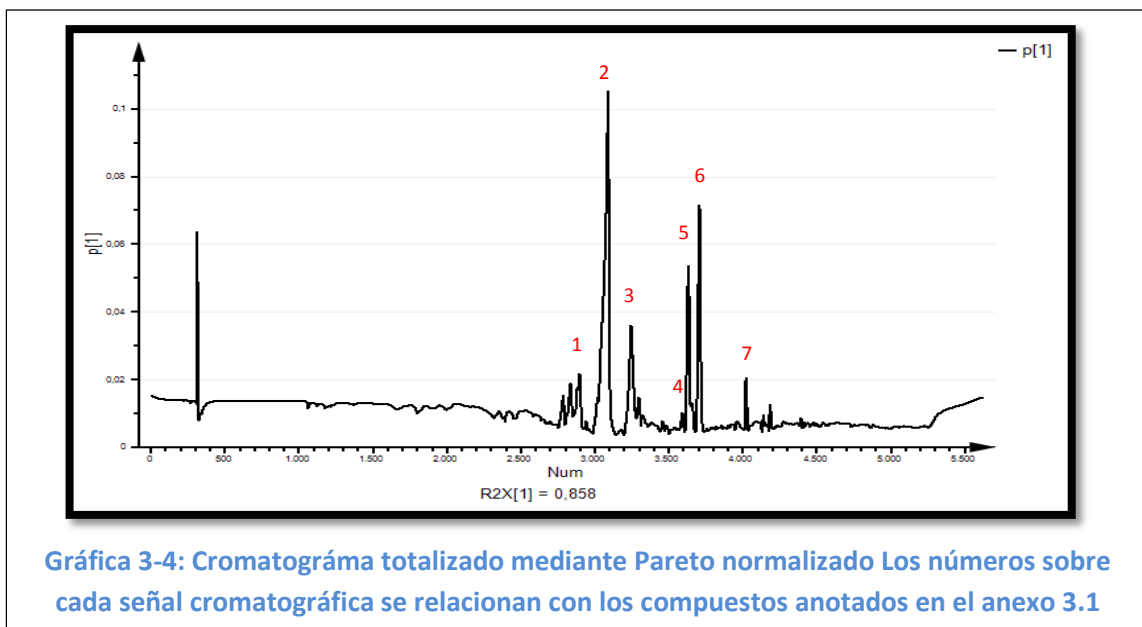
En este experimento no se observó ningún problema en la germinación de semillas, dado que al cabo de una semana se obtuvieron porcentajes de germinación superiores al 90%; lo anterior coincide con la literatura, dado que para plantas del género *Lupinus*, como *Lupinus varius*, se han hecho reportes de porcentaje de germinación superiores al 90% utilizando diferentes tratamientos (Karaguzel *et al*, 2004).

Perfilado metabólico de *Lupinus mutabilis*.

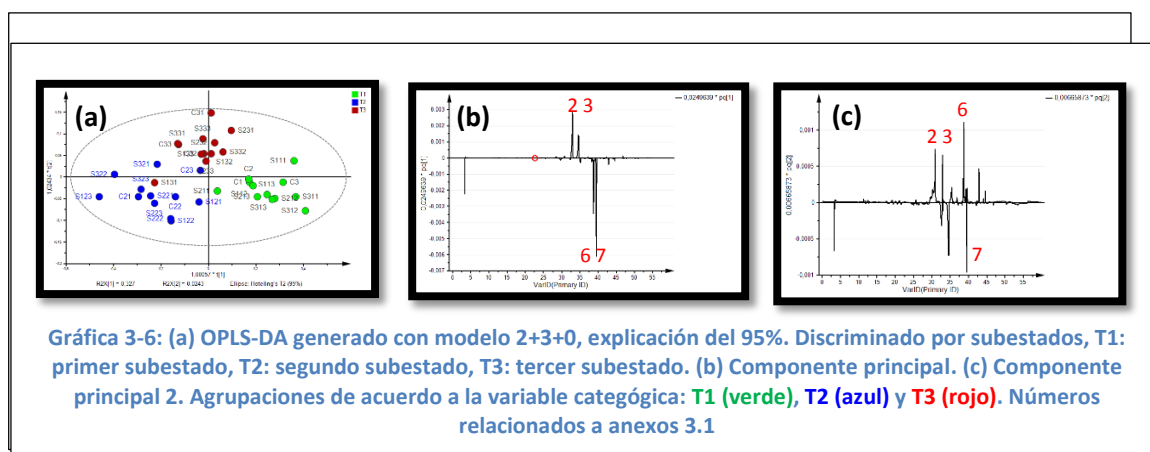
A continuación se presentan los perfiles de los extractos obtenidos a partir de las hojas de *Lupinus mutabilis*, bajo las condiciones establecidas, para determinar los cambios en la composición química bajo diferente disponibilidad de nitrógeno en la disolución nutritiva durante diferentes subestados fenológicos. La mayoría de señales presentes en los extractos durante el proceso de cromatografía se registran desde el minuto 25 a 45 (Gráficas 3-3 y 3-4).



En el cromatograma estadísticamente totalizado mediante Pareto normalizado, se puede evidenciar con mayor detalle las señales detectadas para las muestras evaluadas durante este estudio.



En el cromatograma totalizado (Gráfica 3-4) se evidenciaron los picos mayoritarios presentes en los extractos obtenidos de las hojas de *Lupinus mutabilis*. Con los espectros de masas de cada pico anotado se realizó la identificación tentativa de cada uno de ellos. Dado que los cromatogramas de los extractos obtenidos no permiten hacer inferencias claras y detalladas sobre el cambio en la composición química de las hojas de *Lupinus mutabilis* sometidas a los diferentes tratamientos, se decidió hacer un PCA para determinar las diferencias presentes en los extractos.



No obstante, el análisis no supervisado, a través de PCA junto con su respectivo análisis HCA (Gráfica 3-5), no permitieron realizar conclusiones estadísticas muy claras, pero se hace evidente que hay niveles de agrupación definidos entre los extractos. Por tanto, se procedió a realizar análisis supervisado mediante OPLS-DA para determinar las diferencias existentes en la composición química de los extractos obtenidos en los subestados fenológicos evaluados.

En el diagrama de dispersión del análisis por OPLS-DA, en el cual se analizaron todas las muestras utilizando como variable categórica de supervisión el subestado fenológico, se pudo notar que este es un factor de clasificación que permite evidenciar de forma clara las diferencias en la composición química de los extractos obtenidos a partir de las hojas de *Lupinus mutabilis* (Gráfica 3-6). La diferencia en la composición química de estos extractos procedentes del subestado fenológico T1 con respecto a los extractos del subestado fenológico T2 se puede atribuir principalmente a las señales detectadas en los cromatogramas correspondientes a hidroxicinamoiloxidehidrolupanina (2) y cinamoilxilupanina (4) en los extractos obtenidos en el subestado T1, mientras que en los extractos de hojas obtenidos en el subestado T2 se registraron las señales correspondientes a compuestos y dihidroxilupinisoflavona N (6) y barpisoflavo A (7).

Por otra parte, se aprecia así mismo la diferencia en los extractos obtenidos en el subestado T3 con respecto al resto, dado que en este se presentan señales más intensas en los cromatogramas para los compuestos hidroxicinamoiloxidehidrolupanina, cinamoiloxilupanina y la dihidroxilupinisoflavona N con respecto al resto de subestados evaluados. Por lo anterior se notó que la presencia de los alcaloides quinolizidínicos hidroxicinamoiloxidehidrolupanina y cinamoiloxilupanina y la isoflavona dihidroxilupinisoflavona N se dan con presencia selectiva en el primer y último subestado fenológico evaluado. Cabe insistir que las plantas del género *Lupinus* son ricas en alcaloides quinolizidínicos (QA), pero las especies cultivadas como *Lupinus albus*, *Lupinus mutabilis* y *Lupinus angustifolios* poseen niveles más bajos de estos metabolitos, por lo cual poseen menos resistencia a la herbivoría por parte de insectos dado que los (QA) ofrecen protección contra depredación a las plantas ya que son tóxicos para varias especies (Lee *et al*, 2007; Frick *et al*, 2017; Wink y Hartmann, 1982). La biosíntesis de todos los alcaloides quinolizidínicos se da mediante la descarboxilación de la *L*-lisina mediante la enzima ornitind Descarboxilasa (ODC), formando el intermediario cadaverina, la cual sufre una desaminación oxidativa mediante la enzima cobre amino oxidasa (CuAO) para formar 4-aminopentanal, el cual sufre una ciclación para formar delta-pirimidina, (base de Shiff); posteriormente una serie de modificaciones mediante reacciones tipo Aldol, hidrolisis, desaminaciones, entre otras, contribuyen a la formación de la estructura del alcaloide, el cual es susceptible a sufrir cambios como glucosidaciones, dehidrogenaciones, esterificaciones, entre otros cambios, lo cual se presume que ocurre a la lupanina para formar hidroxicinamoiloxidehidrolupanina y cinamoiloxilupanina (Bunsupa *et al*, 2012; Ohmiya, 1995; Frick *et al*, 2017). Se encontraron derivados de la lupanina, la cual es susceptible a diferentes cambios como hidroxilaciones, esterificaciones, dehidrogenaciones, entre otros fenómenos que resultan comunes en el metabolismo de plantas de la familia Fabaceae (Verdoorn y van Wyk, 2001). Se sabe que enzimas de actividad acetiltransferasa como las codificadas por los genes *LaHMT/HLT* y *LaAT* contribuye a formar moléculas como 13-alfa-hidroxilupanina y otros derivados, es decir, estos genes contribuyen a la modificación de los alcaloides (Frick *et al*, 2017).

Las isoflavonas, por su parte, permiten diferenciar mediante la el fenotipo metabólico, los extractos obtenidos en T2 de los obtenidos en T1. Estas isoflavonas son dihidroxilupinisoflavona N y baprisoflavona A, las cuales son sintetizadas mediante la ruta metabólica de los flavonoides, es decir, son derivados de la ruta metabólica de la fenilalanina y del malonil-CoA vía ácido cinámico, es decir que proceden de la ruta metabólica del shikimato (Dewick, 2002). Los fenilpropanoides son sintetizados a partir de los fenilpropanoides, donde la enzima chalcona-sintasa (CHS) une tres malonil-CoA a con una molécula de cinamoil-CoA; el producto de esta reacción es denominado narginin-chalcona, acción llevada a cabo mediante la enzima chalcona-isomerasa (CHI) (Dewick, 2002; Falcone-Ferreira *et al*, 2012; (Higuchi 2012). La ruta metabólica

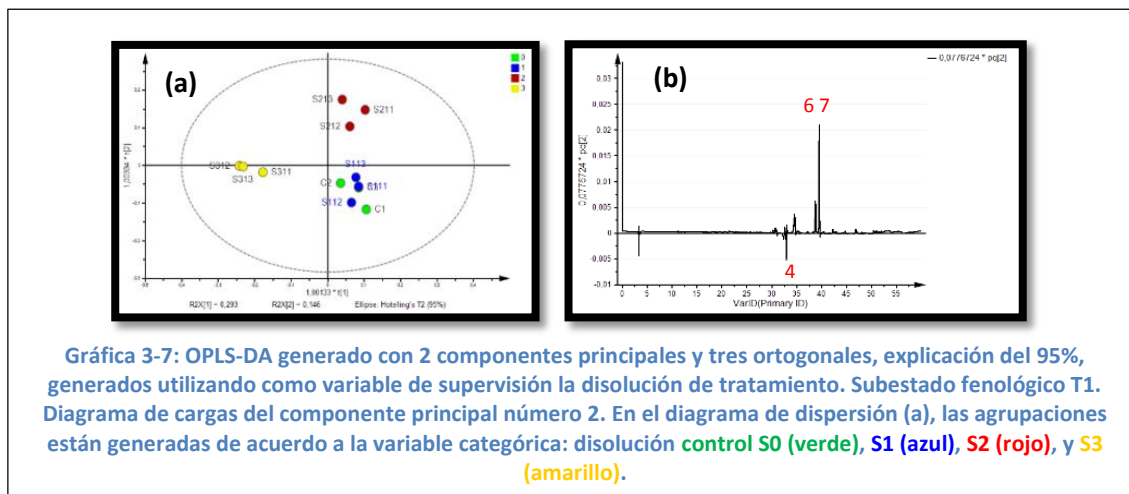
de los flavonoides suele ser muy conservada en plantas y, por ende, hay que tener en cuenta que todos los flavonoides tienen como precursor la chalcona (Dewick, 2002).

Cabe reiterar que la presencia de isoflavonas en las plantas se relaciona con la actividad de la enzima isoflavona-sintasa, enzima relacionada por el gen (*GmIFS2*). La inhibición de genes relacionados con la producción de isoflavonas se traduce en la susceptibilidad a patógenos por parte de la planta, lo cual indica que las isoflavonas representan un tipo de resistencia a la infección por diferentes microorganismos (Falcone-Ferreira *et al*, 2012). Por lo anterior, se sugiere que en el subestado T2, *Lupinus mutabilis* presenta mayor actividad de las enzimas relacionadas con la producción de flavonoides con respecto al subestado T1 y principalmente de isoflavona-sintasa ya que tenemos dos tipos diferentes de isoflavonas presentes selectivamente en el subestado T2.

La presencia de los compuestos fenólicos como flavonoides, flavonas, entre otros, además de asociarse con capacidad antioxidante, la cual presenta importancia para contrarrestar el efecto oxidativo producido por los ROS en la planta durante los procesos de producción de energía (Cotelle *et al*, 1996; Agati *et al*, 2012) pueden ayudar a comprender las rutas evolutivas y biodiversidad en diferentes clados de la familia fabaceae. Hablando del género *Lupinus*, la presencia de algunos de estos compuestos puede posicionar a una especie en el clado de las *Lupinus* del viejo mundo o del nuevo mundo (Williams *et al*, 1983).

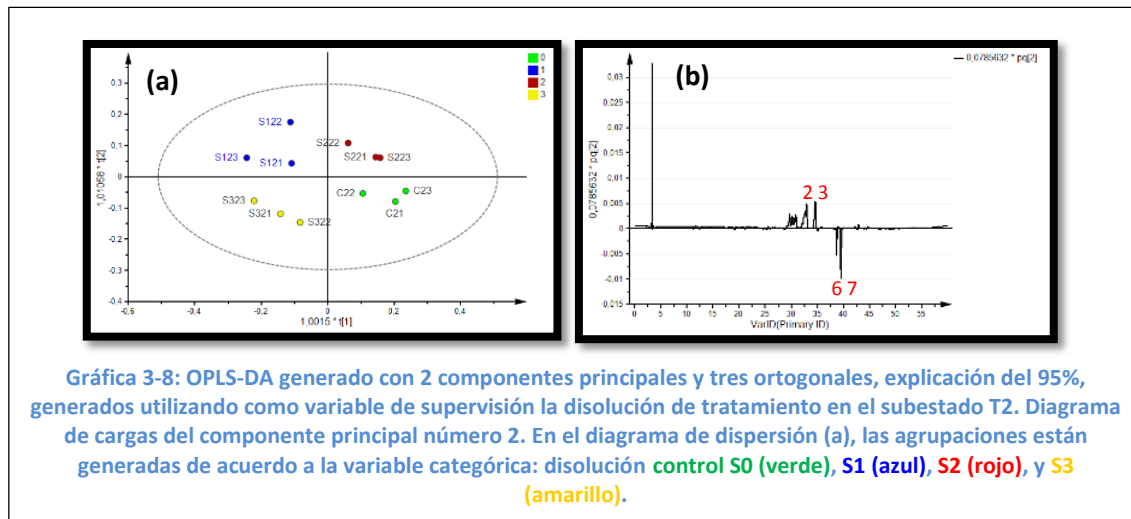
Regresión de mínimos cuadrados parciales con análisis discriminante (OPLS-DA) supervisado por subestado fenológico

Posteriormente, con el fin de evaluar cómo la cantidad de nitrógeno disponible en la disolución nutritiva promovía cambios en el perfil metabólico de *Lupinus mutabilis*, se realizaron análisis de OPLS-DA, por cada subestado estudiado, utilizando como variable categórica de supervisión la disolución nutritiva con la cual fue tratado cada grupo de plantas.

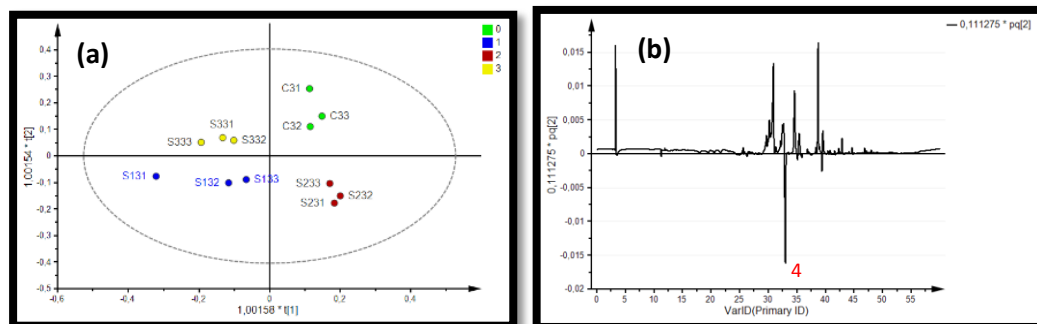


Los análisis de OPLS-DA permitieron establecer las diferencias en la composición química de cada uno de los extractos sometidos a los diferentes tratamientos. Como observaciones generales sobre los diagramas de dispersión generados, cada grupo de muestras presenta su distribución en coordenadas diferentes, por lo cual es posible decir que el uso de soluciones fertilizantes con diferente cantidad de nitrógeno total es un agente de cambio en el metaboloma de *Lupinus mutabilis*.

En el caso de los extractos obtenidos de las plantas del subestado T1 se pudo notar que los extractos de las plantas tratadas con la solución S3 son diferentes de los demás por la presencia selectiva de dihidroxilupinisoflavona N y baprisoflavona A. Las diferencias en cuanto a la composición química de los extractos obtenidos de plantas tratadas con las disoluciones S1 y S2, con respecto a los extractos de las plantas tratadas con la solución S0 y S3 obtenidos en el subestado T2, se debe a que las primeras presentaron mayor intensidad en las señales detectadas en los cromatogramas para los compuestos hidroxicinamoiloxidehidrolupanina, hidroximetoxicinnamoillupinina y cinamoiloxiupanina, mientras que los extractos tratados con las soluciones S3 y S0 presentan señales más intensas para los compuestos dihidroxilupinisoflavona N y baprisoflavona A.



El análisis generado con los extractos de las plantas colectadas en el subestado fenológico T3 indica que las diferencias en la ubicación de las muestras en el *score plot* se debe a que los extractos de las plantas tratadas con las disoluciones 1 y 2 generaron señales más intensas en los cromatogramas para el metabolito cinamoiloxiupanina (4).



Gráfica 3-9: (A) OPLS-DA generado con 2 componentes principales y tres ortogonales, explicación del 95%, generados utilizando como variable de supervisión la disolución de tratamiento en el subestado T3. (B) Diagrama de cargas del componente principal número 2. En el diagrama de dispersión (a), las agrupaciones están generadas de acuerdo a la variable categórica: disolución control S0 (verde), S1 (azul), S2 (rojo), y S3 (amarillo).

Los alcaloides mencionados anteriormente también presentan en su estructura subunidades relacionadas con el ácido hidroxicinámico, a partir de la cual se forma el hidroxicinamol-CoA, relacionado directamente con la ruta metabólica de la fenilalanina (Moglia *et al*, 2014), el cual puede estar relacionado con los compuestos químicos mencionados en este trabajo; otros estudios revelan que la enzima 13-hidroxiilupanina *O*-tigloil-transferasa puede estar involucrada directamente con la síntesis de estos alcaloides quinolizidinicos, los cuales por lo general se asocian en diferentes niveles de toxicidad para diferentes especies, entre ellas el ser humano (Wink y Hartmann, 1982; Vargas-Medina *et al*, 2016).

Vale la pena señalar el hecho que, en general, la diferencia en la composición química de los extractos analizados, de acuerdo a la concentración de nitrógeno utilizada, correspondió a, que en las plantas tratadas con las disoluciones 1 y 2, por lo general, se encontraron señales más intensas en los cromatogramas correspondientes a uno o más alcaloides de los descritos anteriormente, exceptuando el caso del primer subestado fenológico, ya que en este la diferencia entre grupos se da por dos isoflavonas.

Es importante destacar que se identificó la presencia de tigloiloxiafilina, la cual solo apareció en plantas del tercer subestado fenológico, aunque probablemente no destacó en los análisis estadísticos quizás porque la señal detectada por el compuesto no fue tan significativa como para los otros compuestos

CONCLUSIONES

El análisis estadístico multivariado es una herramienta útil a la hora de establecer cambios metabolómicos en especies vegetales, cuando los análisis exploratorios como PCA y HCA no permiten establecer relaciones o diferencias claras entre las muestras es posible recurrir a análisis supervisados como OPLS-DA, el cual permite determinar de forma más clara los cambios en la composición química de los extractos por subestado fenológico o por tratamiento.

Los diagramas de cargas de los análisis estadísticos permiten establecer con respecto a la variable independiente, en este caso el tiempo de retención de compuestos, en qué punto se registran los cambios en la composición química de las muestras, y de esta forma es posible establecer qué molécula es la responsable de la agrupación de datos en los diagramas de dispersión.

Así, se lograron identificar siete compuestos diferentes en *Lupinus mutabilis* bajo las condiciones experimentales mencionadas anteriormente, de los cuales se tiene predominancia en la producción de alcaloides relacionados con la lupanina compuestos **2** y **3** de la tabla de anexos. Estos alcaloides cobran importancia, no solo por el hecho de ser del grupo de los alcaloides quinolizidínicos, los cuales son abundantes en este género, sino porque también resultaron útiles en el análisis estadístico para determinar las diferencias en la composición química de los extractos obtenidos en los diferentes subestados fenológicos evaluados, encontrándose en mayor medida en los extractos obtenidos en el subestado T3 con respecto al resto, pero también marcando la diferencia entre los subestados T1 y T2 parcialmente, ya que las isoflavonas descritas en este trabajo contribuyeron a la diferenciación de los subestados T1 y T2.

La presencia de los metabolitos mayoritarios en cada uno de los subestados fenológicos puede ser correlacionada con la actividad de diferentes enzimas, pero teniendo en cuenta que no se realizaron métodos de cuantificación enzimática, o secuenciación de mRNA para determinar que genes estaban siendo activados en cada subestado o bajo los tratamientos aplicados, solo se pudo dar un acercamiento a las enzimas relacionadas a la síntesis de cada grupo de metabolitos.

La presencia de isoflavonas, compuestos que también son abundantemente descritos para el género *Lupinus*, contribuyeron también a establecer las diferencias en la composición química (compuestos **6** y **7** de la tabla de anexos), encontrándose en mayor proporción en los extractos de las plantas colectadas en los subestados fenológicos más avanzados en este estudio, especialmente el compuesto **7**, el cual solo se presentó en las plantas de los subestados 2 y 3.

REFERENCIAS

- ❖ Agati, G., Azzarello, E., Pollastri, S., & Tattini, M. (2012). Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. *Plant Science*, 196, 67-76.

- ❖ Araújo, A. P., Teixeira, M. G., & De Almeida, D. L. (1997). Phosphorus efficiency of wild and cultivated genotypes of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under biological nitrogen fixation. *Soil Biology and Biochemistry*, 29(5-6), 951-957.
- ❖ Arroyo, M. T. K., Armesto, J. J., & Villagran, C. (1981). Plant phenological patterns in the high Andean Cordillera of central Chile. *The Journal of Ecology*, 205-223.
- ❖ Beebe, S., Toro Ch, O., Chaco´ n, M. I., & Debouck, D. G. (1997). Wild-weed-crop complexes of common bean (*Phaseolus vulgaris* L., Fabaceae) in the Andes of Peru and Colombia, and their implications for conservation and breeding. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 44(1), 73-91.
- ❖ Bunsupa, S., Yamazaki, M., & Saito, K. (2012). Quinolizidine alkaloid biosynthesis: recent advances and future prospects. *Frontiers in plant science*, 3, 239.
- ❖ Christiansen, I., & Graham, P. H. (2002). Variation in di-nitrogen fixation among Andean bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes grown at low and high levels of phosphorus supply. *Field crops research*, 73(2), 133-142.
- ❖ Cotellet, N., Bernier, J. L., Catteau, J. P., Pommery, J., Wallet, J. C., & Gaydou, E. M. (1996). Antioxidant properties of hydroxy-flavones. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(1), 35-43.
- ❖ Dewick, P. M. (2002). *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. John Wiley & Sons.
- ❖ Drummond, C. S. (2008). Diversification of *Lupinus* (Leguminosae) in the western New World: Derived evolution of perennial life history and colonization of montane habitats. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 48(2), 408-421. doi:10.1016/j.ympev.2008.03.009
- ❖ Drummond, C. S., Eastwood, R. J., Miotto, S. T. S., & Hughes, C. E. (2012). Multiple continental radiations and correlates of diversification in *Lupinus* (leguminosae): Testing for key innovation with incomplete taxon sampling. *Systematic Biology*, 61(3), 443-460. doi:10.1093/sysbio/syr126
- ❖ Dueñas, M., Hernandez, T., Estrella, I., & Fernandez, D. (2009). Germination as a process to increase the polyphenol content and antioxidant activity of lupin seeds (*Lupinus angustifolius* L.). *Food Chemistry*, 117(4), 599-607.
- ❖ Duran, V. E. B. (2011). Biodiversidad Y Ecogeografía Del Género *Lupinus* L. (Leguminosae) En Colombia. *Universidad Nacional De Colombia Facultad De Ciencias Agropecuarias*, 1-118.
- ❖ Falcone-Ferreira, M. L., Rius, S., & Casati, P. (2012). Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Frontiers in plant science*, 3, 222.

- ❖ Frick, K. M., Kamphuis, L. G., Siddique, K. H., Singh, K. B., & Foley, R. C. (2017). Quinolizidine alkaloid biosynthesis in lupins and prospects for grain quality improvement. *Frontiers in Plant Science*, 8.
- ❖ Gross, R., Von Baer, E., Koch, F., Marquard, R., Trugo, L., & Wink, M. (1988). Chemical composition of a new variety of the Andean lupin (*Lupinus mutabilis* cv. Inti) with low-alkaloid content. *Journal of food composition and analysis*, 1(4), 353-361.
- ❖ Higuchi, T. (Ed.). (2012). *Biosynthesis and biodegradation of wood components*. Elsevier.
- ❖ Kachlicki, P., & Stobiecki, M. (2012). Isoflavones: LC-MS/MS Profiling of Isoflavone Glycosides and Other Conjugates. *Food and Nutritional Components in Focus*, (5), 280-293.
- ❖ Karaguzel, O. S. M. A. N., Cakmakci, S. A. D. I. K., Ortacesme, V. E. L. I., & Aydinoglu, B. I. L. A. L. (2004). Influence of seed coat treatments on germination and early seedling growth of *Lupinus varius* L. *Pakistan Journal of Botany*, 36(1), 65-74.
- ❖ Lee, M. J., Pate, J. S., Harris, D. J., & Atkins, C. A. (2007). Synthesis, transport and accumulation of quinolizidine alkaloids in *Lupinus albus* L. and *L. angustifolius* L. *Journal of experimental botany*, 58(5), 935-946.
- ❖ Mikić, A., Čupina, B., Mihailović, V., Krstić, D., Antanasović, S., Zorić, L., ... Srebrić, M. (2013). Intercropping white (*Lupinus albus*) and Andean (*Lupinus mutabilis*) lupins with other annual cool season legumes for forage production. *South African Journal of Botany*, 89, 296–300. doi:10.1016/j.sajb.2013.06.015
- ❖ Moglia, A., Lanteri, S., Comino, C., Hill, L., Knevitt, D., Cagliero, C., ... Martin, C. (2014). Dual Catalytic Activity of Hydroxycinnamoyl-Coenzyme A Quinate Transferase from Tomato Allows It to Moonlight in the Synthesis of Both Mono- and Dicafeoylquinic Acids. *Plant Physiology*, 166(4), 1777–1787.
- ❖ Molina-Poveda, C., Lucas, M., & Jover, M. (2013). Evaluation of the potential of Andean lupin meal (*Lupinus mutabilis* Sweet) as an alternative to fish meal in juvenile *Litopenaeus vannamei* diets. *Aquaculture*, 410-411, 148–156.
- ❖ Ohmiya, S., Saito, K., & Murakoshi, I. (1995). Lupine alkaloids. *The Alkaloids: Chemistry and Pharmacology*, 47, 1-114.
- ❖ Olivera, M., Tejera, N., Iribarne, C., Ocana, A., & Lluch, C. (2004). Growth, nitrogen fixation and ammonium assimilation in common bean (*Phaseolus vulgaris*): effect of phosphorus. *Physiologia Plantarum*, 121(3), 498-505.
- ❖ Pilegaard K., & Gry, J. (2009). *Alkaloids in edible lupin seeds*. Nordic Council of Ministers.

- ❖ Pinheiro, C., Passarinho, J. A., & Ricardo, C. P. (2004). Effect of drought and rewatering on the metabolism of *Lupinus albus* organs. *Journal of plant physiology*, 161(11), 1203-1210.
- ❖ Vargas-Medina, L., Yamaguchi, L. F., & Coy-Barrera, E. (2016). LC-ESI-HRMS-Based Chemical Characterization of *Lupinus bogotensis* Roots. *Revista Facultad de Ciencias Económicas: Investigación y Reflexión*, 12(2), 200.
- ❖ Verdoorn, G. H., & van Wyk, B. E. (1991). Co-occurrence of hydroxylated lupanines and their corresponding angelate esters In *Pearsonia* species. *Phytochemistry*, 30(11), 3631-3634.
- ❖ Williams, C. A., Demissie, A., & Harborne, J. B. (1983). Flavonoids as taxonomic markers in Old World *Lupinus* species. *Biochemical Systematics and Ecology*, 11(3), 221-231.
- ❖ Wink, M., & Hartmann, T. (1982). Enzymatic synthesis of quinolizidine alkaloid esters: a tigloyl-CoA: 13-hydroxylupanine O-tigloyltransferase from *Lupinus albus* L. *Planta*, 156(6), 560-565.
- ❖ Wojakowska, A., Muth, D., Narożna, D., Mądrzak, C., Stobiecki, M., & Kachlicki, P. (2013). Changes of phenolic secondary metabolite profiles in the reaction of narrow leaf lupin (*Lupinus angustifolius*) plants to infections with *Colletotrichum lupini* fungus or treatment with its toxin. *Metabolomics*, 9(3), 575-589.

Anexos 3.1

 Tabla 3-2: Tabla de compuestos registrados para las muestras de *Lupinus mutabilis*

No	RT (min)	Nombre	M	m/z [M+H] ⁺	mw	Muestra vegetal												
						T1			T2			T3						
						S0	S1	S2	S0	S1	S2	S0	S1	S2	S3			
1	28.8	tigloiloxiafilina	Al	347	346										x	x	x	x
2	30.90	hidroxi-cinnamoiloxidehidrolupanina	Al	411	410	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
3	31.8	hidroximetoxicinnamoillupinina	Al	346	345				x	x	x	x						
4	32.8	cinnamoiloxilupanina	Al	395	394	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
5	36.40	No identificado	-	100	-	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
6	37.27	dihidroxilupinisoflavona N	Fl	505	504	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
7	40,2	barpiso flavona A	Fl	301	300					x	x	x			x	x	x	

Anexos 3.2

 Tabla 3-3: Subestados fenológicos evaluados en *Lupinus mutabilis*

ESTADO FENOLÓGICO	ESCALA BBCH	DESCRIPCIÓN
	1.10	10 hojas verdaderas
Vegetativo	1.15	15 hojas verdaderas
	1.20	20 hojas verdaderas

Anexos 3.3

 Tabla 3-4: Porcentaje de rendimiento de los extractos etanólicos de *Lupinus mutabilis*

% Rendimiento		
	S0	11,56
T1	S1	12,043
	S2	10,954
	S3	9,65
	S0	8,034
Muestra T2	S1	10,98
	S2	10,709
	S3	10,432
	S0	11,509
T3	S1	13,768
	S2	12,323
	S3	10,491

Capítulo 4 : Conclusiones generales y recomendaciones

El perfilado metabólico es una forma de abordar estudios metabolómicos que, mediante el uso de técnicas analíticas químicas como la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS), permite la obtención de las huellas digitales asociados al estado metabólico de muestras obtenidas mediante la extracción metabólica de organismos, las cuales pueden ser utilizadas para la elaboración de análisis estadísticos, que junto a la identificación tentativa permite correlacionar marcadores metabólicos con algún rasgo (fenotipo). En este sentido, los modelos estadísticos por PCA, HCA y OPLS-DA permitieron establecer correlaciones entre las muestras obtenidas respecto a tres subestados fenológicos y a diferentes tratamientos de fertilización alternando la concentración de nitrógeno disponible tanto en *P. bogotense* como en *Lupinus mutabilis*. Como resultado, se evidenciaron por consiguiente cambios en el metaboloma de estas dos especies representantes de géneros ampliamente distribuidos en zonas andinas y altoandinas durante tres subestados fenológicos y, de forma subsecuente, también se evidenció que la variación en la concentración de nitrógeno disponible en la solución fertilizante aplicada ya sea a *Piper bogotense* o *Lupinus mutabilis* es otro factor que promueve cambios en la composición química presente en ambas especies.

Por lo tanto, *Piper bogotense* y *Lupinus mutabilis*, dadas las implicaciones ambientales que presentan en su ecosistema en la circulación de nitrógeno y nutrientes en los ecosistemas andinos y altoandinos, se demostró que presentan cambios en su respuesta metabólica al alternar la cantidad de nitrógeno disponible en la solución fertilizante. No obstante, en ambos casos se encontró que el factor más determinante a la hora de establecer variaciones en la presencia de metabolitos en las muestras analizadas fue el subestado fenológico evaluado.

Para *P. bogotense*, las variaciones estuvieron marcadas por cambios entre amidas y flavonoides glicosidados, que marcaron la diferencia entre subestados fenológicos, mientras que en las variaciones de nitrógeno disponible, se encontró la expresión de un triterpenoide, entre otros. Por su parte, para el caso de *L. mutabilis*, los cambios que marcaron la diferenciación ontogénica y las variaciones nutricionales fueron definidos por la expresión selectiva de alcaloides y/o isoflavonas. Estos resultados abren cuatro posibles escenarios futuros: 1) el aprovechamiento de estas especies en función de estos grupos de metabolitos a nivel de plántula, 2) el monitoreo durante el desarrollo inicial de estas plantas mediante los compuestos selectivamente expresados que se pueden vincular a marcadores metabólicos, 3) la asociación/correlación de eventos bioquímicos, fisiológicos moleculares y lecturas funcionales con el metabotipo registrado en plántulas de ambas especies y, 4) el entendimiento sobre la dinámica metabólica en estados iniciales en respuesta a sus restricciones ambientales en función de nutrición y desarrollo.

Dado lo anterior, se considera importante la implementación de pruebas, en el marco de fases futuras y continuación del estudio, en los cuales se pueda evaluar la expresión genética de ambas especies en el momento de la extracción de los metabolitos secundarios, y de esta forma poder correlacionar la expresión de genes relacionados con las rutas metabólicas a las cuales se asocian los metabolitos secundarios mencionados en este trabajo y, por ende, para soportar lo encontrado.