

DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE MELATONINA PRESENTES EN FRUTAS Y ZUMOS DE FRUTAS HABITUALES DE LA DIETA

Verde Rodríguez, A.

e- mail: averde@alumnos.uvigo.es

Trabajo Fin de Máster en
Biotecnología Avanzada

Tutores:

- Mercedes Gallardo Medina¹

- Jesús M. Miguez Miramontes²

¹Departamento de biología Vegetal
y Ciencias del Suelo

²Departamento de Biología
Funcional y Ciencias de la Salud
Facultad de Biología
Universidad de Vigo.

Resumen

Este estudio forma parte de un trabajo de investigación cuyo principal objetivo es la detección y cuantificación de los niveles de melatonina presentes en vegetales, más concretamente, en aquellos que forman parte de la dieta humana. Esta molécula que posee un elevado potencial antioxidante, está presente en cantidades relevantes en una amplia variedad de frutas de origen comercial y de producción local, así como en zumos obtenidos de estas frutas, lo que añade más valor funcional a su consumo que puede aportar importantes beneficios para el organismo.

INTRODUCCIÓN

La melatonina (N-acetyl-5-metoxi-triptamina) es una molécula presente en una amplia variedad de organismos, desde bacterias y levaduras, a animales (invertebrados y vertebrados), e incluso en plantas (Hardeland, 2014; Nawaz *et al.*, 2016). Su descubrimiento se produjo en 1958 por Lerner y colaboradores durante un estudio sobre la glándula pineal de mamíferos, siendo considerada durante las siguientes cuatro décadas como una hormona exclusivamente animal. Estudios posteriores adjudicaron a la melatonina un papel clave en el sistema circadiano de los vertebrados, ya que sus niveles circulantes oscilan de forma rítmica a lo largo del ciclo diario de luz: oscuridad, siendo durante la noche cuando se produce de forma casi exclusiva la síntesis de melatonina en la glándula pineal. El ritmo de melatonina se encuentra bajo el control del reloj biológico y se le considera un marcador molecular de la duración de la noche, con posibles efectos en el ajuste de los ritmos circadianos y con implicaciones fisiológicas tanto a nivel diario como estacional (Reiter, 1991). Estudios más recientes también se han centrado en las propiedades antioxidantes de la melatonina, una molécula con gran capacidad para secuestrar los radicales libres y para neutralizar sus acciones dañinas a nivel celular y tisular (Reiter *et al.*, 1994).

La presencia de melatonina en plantas no fue conocida hasta 1995 cuando Van Tassel y colaboradores la descubrieron en la planta ornamental *Ipomea nil*. Coetáneamente, aparecieron estudios que confirmaron su presencia en una gran variedad de plantas comestibles (Dubbels *et al.*, 1995; Hattori *et al.*, 1995). En la última década, la investigación sobre la presencia de melatonina en plantas y productos alimenticios de origen vegetal ha tenido un gran auge, con numerosas contribuciones al conocimiento de sus niveles y de sus posibles papeles fisiológicos, especialmente durante el crecimiento y desarrollo de plantas y como molécula protectora frente a estreses abióticos y bióticos (Arnao y Hernández-Ruiz, 2015; Reiter *et al.*, 2015).

Biosíntesis de la melatonina.

En vertebrados la ruta de síntesis de la melatonina es bien conocida y se inicia con la transformación del aminoácido L-triptófano mediante la enzima triptófano-5-hidroxilasa, dando lugar a 5-hidroxi-triptófano, el cual es inmediatamente convertido en serotonina por la acción de la enzima aminoácido aromático descarboxilasa. La serotonina es el principal precursor de la melatonina, siendo acetilada por una arilalquilamina N-acetiltransferasa para dar lugar a N-acetilserotonina, la cual es posteriormente metilada por la hidroxindol-O-metil transferasa (HIOMT) para formar la melatonina (Reiter 1991; Falcón *et al.*, 2009).

En los vegetales se ha hecho un gran esfuerzo para determinar las características bioquímicas de la síntesis de la melatonina, sugiriéndose distintas rutas posibles. Las más estudiadas son las que se representan en la Figura 1. Por un lado, la presencia de la enzima HIOMT y el alto contenido de serotonina presente en las plantas ha llevado a sugerir que la síntesis de melatonina ocurre de forma similar a la que tiene lugar en vertebrados, usando como sustrato la serotonina (Murch *et al.*, 2009; Tan *et al.*, 2012). No obstante, investigaciones recientes sugieren que existen varias vías de formación de serotonina que incluyen, además de la ya mencionada hidroxilación del L-triptófano, la descarboxilación directa de este aminoácido para formar triptamina, un compuesto que puede ser hidroxilado a serotonina y contribuir así a la formación de melatonina, o bien dar lugar a compuestos intermedios como la 5-metoxi-triptamina cuya función es todavía poco conocida. Del mismo modo, la triptamina puede ser a su vez oxidada a indol-3-acetaldehído, precursor del ácido indol-3-acético (AIA), una fitohormona con importantes funciones en el crecimiento y desarrollo de las plantas (Hardeland, 2014; Arnao y Hernández-Ruiz, 2015; Zhang *et al.*, 2015). El hecho de que el triptófano actúe como precursor de la melatonina y del AIA, ha sugerido que ambos compuestos puedan tener papeles fisiológicos similares en plantas.

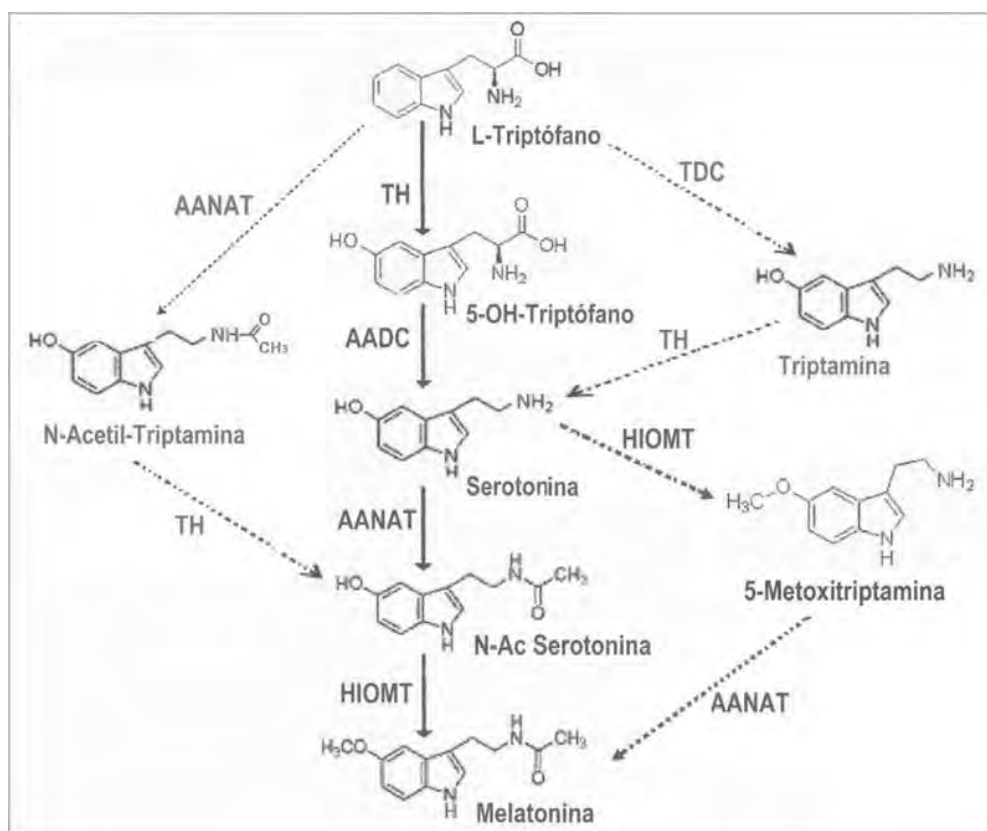


Figura 1: Esquema de la ruta de síntesis de melatonina. En el eje central se muestra el proceso habitual de síntesis que ocurre en vertebrados, mientras que las flechas punteadas laterales marcan las posibles rutas alternativas para la síntesis de esta indol que se postulan en plantas. TH: L-triptófano hidroxilasa; AADC: aminoácido aromático descarboxilasa; AANAT: arilalquilamina-N-acetil transferasa; HIOMT: hidroxindol-O-metil transferasa; TDC: Triptófano descarboxilasa.

Niveles de melatonina en plantas

La existencia de melatonina en plantas superiores es un hecho plenamente constatado y numerosos trabajos cuantificaron los niveles de este compuesto en diferentes tipos de plantas y en sus distintos tejidos (raíz, tallo, semillas, hojas, frutos, etc.). En general los resultados muestran una amplia variabilidad en el contenido de melatonina en plantas, lo que también es corroborado por niveles muy diferentes en los tejidos que las forman, oscilando desde picogramos (pg) a microgramos (μg) por gramo de tejido (Tettamani *et al.*, 2000; Arnao y Hernández-Ruiz, 2006). Según Paredes *et al.* (2009) las mayores concentraciones de melatonina en plantas superiores se encuentran en semillas y hojas, mientras que en los frutos es donde los niveles son menores.

Teniendo en cuenta la importancia de los vegetales en la dieta humana, se ha propuesto que el consumo de alimentos vegetales o sus derivados puede provocar un aumento de los niveles sanguíneos de melatonina, lo que resultaría en un efecto potencialmente beneficioso para el organismo gracias a las propiedades antioxidantes de esta molécula (García-Parrilla *et al.*, 2009; Lamont *et al.*, 2011). Por ello numerosos estudios centraron sus objetivos en el análisis de los componentes de dietas ricas en frutas y verduras caracterizadas por sus propiedades antioxidantes, como es el caso de la dieta mediterránea, demostrándose niveles elevados de melatonina en frutos secos, cereales (arroz, maíz, avena, soja, etc.), algunas frutas (fresa, cereza, manzana, tomate, uva, piña, plátano, kiwi, etc.), legumbres, semillas y hortalizas (remolacha, cebolla, pimiento, espárrago, calabaza, etc.) (Arnao y Hernández-Ruiz, 2014). También se ha detectado melatonina en productos de consumo derivados de vegetales, tales como el aceite de oliva, algunos zumos de frutas, el vino y el vinagre (Paredes *et al.*, 2009; Iriti *et al.*, 2010; Budak *et al.*, 2015). Asimismo, existen estudios en humanos y en roedores que demuestran que la ingesta de estos alimentos supone un aumento de los niveles de melatonina en el organismo (Luzia-França *et al.*, 2010; Sae-Teaw *et al.*, 2012).

A pesar de los estudios citados previamente, existen todavía numerosas incógnitas sobre la presencia y los niveles de melatonina en plantas que son objeto de consumo. En gran parte, este desconocimiento viene dado por las dificultades técnicas de cuantificar la melatonina en muestras vegetales, de gran complejidad en su composición química, lo que podría causar las fuertes diferencias en los niveles detectados en plantas. Por otro lado, la disparidad en los niveles medidos podría responder a otros factores que afectan a las plantas que consumimos, tales la época de recolección, el estado de crecimiento de la planta o de maduración los frutos, las condiciones ambientales, etc. (Tan *et al.*, 2011). Por último, en el caso de las verduras y frutos que se pueden obtener en el mercado para el consumo humano, un factor que puede influenciar las concentraciones de melatonina es el derivado de las propias condiciones de comercialización (almacenaje, temperatura, luz, etc), lo cual ha sido muy poco estudiado.

El presente trabajo forma parte de un estudio más amplio que trata de investigar la presencia de melatonina en diversos productos vegetales y frutas que forman parte de la dieta humana, incluyendo tanto los disponibles a nivel comercial para el consumidor, como aquellos que se pueden obtener directamente de los productores. En relación con ello, el estudio que se presenta tuvo por objetivo detectar y cuantificar los niveles de melatonina en diferentes frutas habituales de nuestra dieta, así como en zumos procedentes de las mismas.

Materiales y métodos

A lo largo del estudio se han utilizado distintos tipos de frutas obtenidas de establecimientos comerciales y de productores locales, en función de su disponibilidad en el momento de realizar los experimentos. Asimismo, la disponibilidad de las frutas condicionó las variedades que se utilizaron para la obtención de los zumos objeto del análisis.

Frutas

Para la determinación del contenido de melatonina en frutas se utilizaron un total de 17 variedades en estado maduro, obtenidas de superficies comerciales del área de Vigo y Pontevedra y de productores locales de la provincia de Pontevedra en el caso de las no comerciales. Las frutas fueron clasificadas en cuatro subgrupos: *a. frutos rojos* (5): fresa (origen Huelva), mora (variedad Loch ness), frambuesa (variedad Lyon), arándano (variedad Duke) y grosella roja; *b. frutas sin hueso* (4): plátano, pera (variedad Conferencia), manzana roja (variedad Starki) y manzana verde (variedad Granny Smith); *c. frutas con hueso* (5): melocotón rojo, nectarina roja, ciruela roja (variedad Red Beauty), albaricoque y níspero (variedad May lop); y *d. frutas cítricas* (3): naranja de zumo (variedad Valencia late) y limón de origen comercial y de producción casera.

Una vez en el laboratorio, las frutas fueron lavadas y secadas, separándose a continuación porciones de 10-20 g de cada tipo de fruta, de forma que en algunos casos se necesitaron varias piezas de frutas (mora, arándano, grosella o frambuesa) y en otros fue suficiente con una única pieza entera (fresa) o una porción de la misma (para cítricos y frutas con hueso y sin hueso). Seguidamente cada muestra (4 réplicas de cada tipo de fruta) fue troceada y homogenizada con 10 mL de metanol puro en un mortero de porcelana mantenido sobre hielo. El homogenado resultante se trasvasó a tubos de centrifuga que permanecieron en un baño ultrasónico (Bransonic M 3510) a 25°C durante 60 min. Transcurrido este tiempo, la suspensión fue enfriada a 4°C y los tubos se balancearon con agitación (Biosan Multibio RS-24) durante 30 min a 4°C (cámara fría). A continuación, las muestras fueron centrifugadas a 4400 rpm (Eppendorf Centrifuge 5702 R) durante 30 min. a 4°C y el sobrenadante resultante fue secado a vacío en un concentrador Speed-Vac (Eppendorf concentrator plus) a 45°C, utilizando un programa de evaporación de alcoholes. Finalmente, el extracto seco obtenido se resuspendió en 2 mL de una solución de acetonitrilo 5% acidificada (ácido fórmico 0.1N, pH final: 2,54) que se utilizó para la posterior extracción de la melatonina con cloroformo.

Zumos de frutas

En el caso de los zumos de frutas, se eligieron 14 tipos de frutas que fueron obtenidas de superficies comerciales del área de Vigo y Pontevedra (variedades comerciales) y de productores locales de Pontevedra (variedades no comerciales). Al igual que en el experimento anterior, las frutas se clasificaron en subgrupos: *a. frutos rojos* (4): fresa (origen Huelva), mora (variedad Loch Ness), frambuesa (variedad Lyon) y arándano (variedad Duke); *b. frutas sin hueso* (4): pera (variedad Conferencia), manzana roja (variedad Starki), piña (variedad Cayena Lisa), granada común (variedad Mollar); *c. frutas con hueso* (1): melocotón rojo; y *d. frutas cítricas* (5): pomelo rojo (variedad Star Ruby), mandarina (variedad Clementina), naranja de zumo (variedades de naranja comerciales y de cosecha propia) y limón fino (cosecha propia).

La extracción del zumo de las frutas se realizó en laboratorio mediante una licuadora de uso doméstico, para los frutos rojos y frutas con y sin hueso, y un exprimidor manual en el caso de los distintos frutos cítricos. Para ello, cada pieza de fruta fue lavada, secada e introducida en su totalidad en la licuadora, a excepción de la pera, melocotón, granada, piña y los cítricos en los que previamente al procesado se retiró la piel.

Se obtuvieron un total de cuatro muestras distintas de zumo a partir de ejemplares diferentes de cada tipo de fruta. Tras su elaboración, una alícuota de 10 mL de cada zumo fue centrifugada a 4.400 rpm a 4°C durante 10 minutos, con el fin de eliminar restos de pulpa que pudiesen estar presentes en el zumo. El sobrenadante obtenido se almacenó a -26°C hasta su posterior análisis.

Extracción de la melatonina

Para la determinación de melatonina en las distintas muestras de fruta o zumos de fruta fue necesaria una extracción previa, para lo que se utilizó cloroformo. Para ello se tomaron 2 mililitros de homogenado o

zumo de fruta a los que se les añadieron 8 mL de cloroformo. Los tubos se agitaron vigorosamente durante 2 minutos y se centrifugaron a 4400 rpm durante 10 minutos, a 4°C. Tras la centrifugación, se retiró la fase acuosa por aspiración, mientras que a la fase clorofórmica restante se le añadió 1 mL de NaOH 0,2 N con el fin de mejorar la limpieza de la muestra para el análisis. Seguidamente se volvió a agitar durante 1 minuto y se centrifugó a 4400 rpm durante 5 minutos. Se eliminó de nuevo la fase acuosa y se midió el volumen de la fase clorofórmica restante que fue posteriormente secado al vacío, a 45°C, durante aproximadamente 50 minutos. Los residuos secos fueron resuspendidos en 100 µL de una solución de acetonitrilo acidificado (5% de ácido fórmico 0.1N, pH 2,54) y filtrados utilizando filtros de 0,45 µm de poro (DISMIC 03JP), almacenándose a -26°C hasta su análisis.

Análisis de la melatonina mediante HPLC con detección de fluorescencia

La cuantificación de melatonina presente en las muestras de frutas y zumos de frutas se realizó mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) en fase inversa con detección de fluorescencia, siguiendo el método descrito para muestras animales por Muñoz *et al.* (2009). El sistema consistió de un HPLC compacto Hewlett-Packard serie 1100 equipado con bomba cuaternaria (módulo HP G1311A) conectada a un sistema de desgasificación en línea (módulo HP G1322A) y a una válvula de inyección de muestra (HP C13228A; 50 µL), acoplados a un detector de fluorescencia (módulo HP G131A) en el que se fijaron las longitudes de onda de 280 nm de excitación y 345 nm de emisión. La separación cromatográfica se realizó empleando una columna de fase estacionaria inversa (Supelco Supercosil LC-18-DB 15cm x 4,6mm, 5µm) que se mantuvo a una temperatura constante de 25°C controlada mediante un horno de columna (Jasco CO-4060). La fase móvil se bombeó a una tasa de flujo de 1 mL/min y consistió en una mezcla programada de dos soluciones independientes: solución A, acetonitrilo:agua (60:40 v:v) y ácido fórmico 0,1%; y solución B, agua acidificada con ácido fórmico 0,1%; que se mezclaron siguiendo la siguiente secuencia (Figura 2).

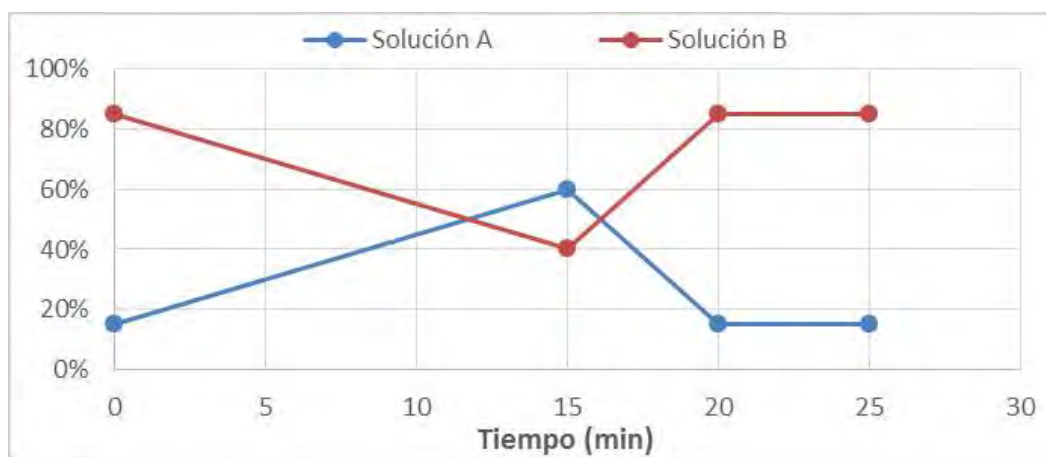


Figura 2: Secuencia de mezclado de las dos soluciones utilizadas para la separación cromatográfica en gradiente.

La señal generada por el detector fue adquirida mediante el sistema informático HP1100 ChemStation. La cuantificación de la melatonina fue realizada por comparación del área integrada del pico de melatonina en cada muestra con la de patrones de concentración conocida de melatonina pura (5 ng/ml) inyectados por triplicado al comienzo de cada día de análisis y repetidos cada 10 muestras analizadas. El límite de sensibilidad para la melatonina bajo estas condiciones fue de 1,5 pg por inyección, estimando una relación señal:ruido de 3:1. La señal generada por la melatonina mostró una respuesta lineal con la concentración en un rango amplio (0,25 ng/mL a 5 ng/mL) que incluyó los valores detectados en las muestras.

Análisis estadístico

En los casos en los que se estimó necesario, se realizó un análisis estadístico de los resultados utilizando el software SigmaStat v11.0. Los datos fueron sometidos a análisis de varianza de una vía, seguido del test de comparaciones múltiples de Student-Neuman-Keuls. En aquellos casos en los que no se cumplieron las condiciones de igualdad de varianza o de normalidad se utilizó una prueba de análisis de varianza sobre rangos (test Kruskal-Wallis). El nivel de significación se estableció a valores de $p < 0.05$.

Resultados y Discusión

Extracción y detección cromatográfica de la melatonina

Con objeto de evaluar la recuperación y la reproducibilidad del método de extracción empleado se realizaron ensayos por duplicado con diferentes concentraciones de patrones de melatonina que fueron extraídos siguiendo un proceso idéntico al descrito para las muestras. Los datos obtenidos en el análisis fueron contrastados (linealidad de la respuesta y reproducibilidad) con los obtenidos de patrones de melatonina que fueron inyectados directamente en el HPLC (Figura 3), ofreciendo resultados similares a los publicados previamente (Muñoz *et al.*, 2009). Por otro lado, en este procedimiento analítico se optó por utilizar una separación cromatográfica en gradiente con el fin de evitar las posibles interferencias en las muestras de picos de naturaleza conocida con el pico de melatonina, lo que repercutió positivamente en la reproducibilidad de las medidas.

Contenido de melatonina en frutas

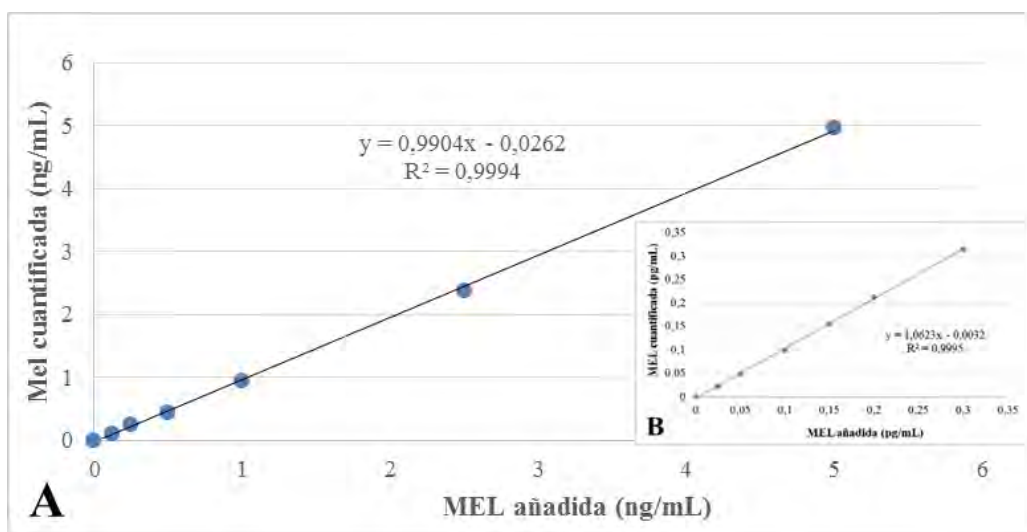


Figura 3: Linealidad de la respuesta cromatográfica. (A) patrones de concentraciones crecientes de melatonina sometidos a extracción con cloroformo. (B) patrones de melatonina de concentraciones crecientes inyectados directamente.

Los niveles de melatonina para las distintas frutas analizadas se muestran en la Figura 4. A efecto de facilitar su visualización, en la gráfica se han agrupado los frutos bajo las categorías de frutos rojos, frutas sin hueso, frutas con hueso y cítricos.

El contenido de melatonina fue muy variable entre los diferentes tipos de frutas, oscilando desde 13,48

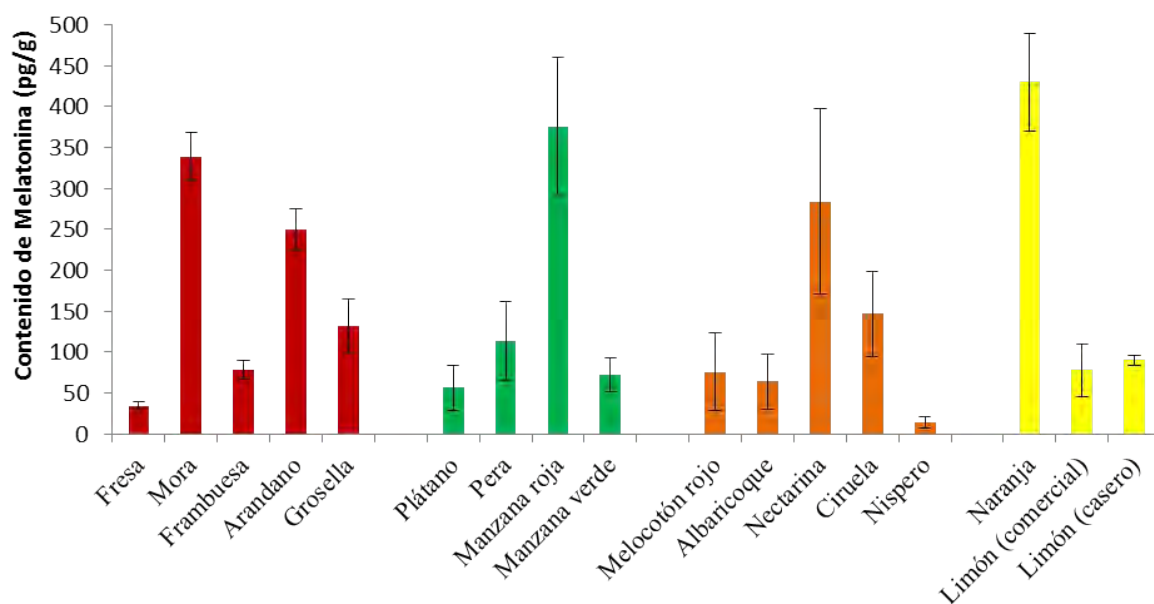


Figura 4: Contenido melatonina (pg/g) en las diferentes frutas estudiadas. Las barras representan las medias \pm EEM de 4 réplicas en todos los casos. Se usaron diferentes colores para agrupar las frutas en las siguientes categorías: frutos rojos (color rojo), frutas sin hueso (color verde), frutas con hueso (color naranja) y cítricos (color amarillo).

pg/g que presentó el níspero hasta los 430,16 pg/g de la naranja. Estos datos coinciden, en líneas generales, con los encontrados en estudios previos. Así, en el caso del plátano, en el cual hemos encontrado una concentración de 53,3 pg/g de muestra, Dubbels *et al.* (1995) cuantificaron alrededor de 47 pg/g de muestra. En otros casos, como la naranja, las concentraciones medias detectadas (430 pg/g) fueron notablemente superiores a halladas previamente por Johns *et al.* (2013) (150 pg/g), pero inferiores a las presentadas por Fernández-Pachón *et al.* (2014) (660 pg/g). Estos datos corroboran la gran variabilidad que presenta la concentración de melatonina entre frutas, así como dentro de cada tipo de fruta dependiendo del estudio.

Por otra parte y aunque la variabilidad entre réplicas fue muy elevada, destacaron por su alto contenido en melatonina la mora (338,74 pg/g) y el arándano (250,03 pg/g), para el caso de los frutos rojos, así como la manzana roja (376,06 pg/g) y la nectarina (283,80 pg/g) como representantes de sus respectivos grupos (frutas sin y con hueso). En el caso de los cítricos fue la naranja, como ya hemos comentado anteriormente la que presenta un mayor contenido. La gran variabilidad observada en los niveles de melatonina podría ser debida en gran parte a la diversidad existente en los ejemplares de cada tipo de fruta analizados, ya que aunque todas ellos fueron de origen comercial, salvo el limón casero, es muy probable que procediesen de plantas distintas y con distinto grado de maduración del fruto en el momento de recolección. Otros factores que podrían estar detrás de estas variaciones son la época de recolección, las condiciones de cultivo o el tipo de sustrato empleado en el cultivo (Tettamani *et al.*, 2000; Arnao y Hernández, 2006; Tan *et al.* 2011), e incluso factores relativos a la comercialización de los frutas (tiempo de almacenamiento, temperatura, humedad, etc).

Contenido de melatonina en los zumos de frutas

La Figura 5 muestra el contenido de melatonina presente en zumos obtenidos a partir de algunas de las frutas relacionadas en el apartado anterior, así como de otras diferentes a las incluidas en el análisis previo. De manera similar a la fruta entera, los niveles cuantificados en los distintos zumos fueron muy variables, destacando en este caso los bajos niveles de melatonina detectados en el zumo de mora (5.97 pg/mL), así como los elevados niveles medidos en el de frambuesa (53,72 pg/mL).

En el grupo de los cítricos se hicieron determinaciones en una amplia variedad de los mismos, ya que

su consumo en zumos es más acusado. En este grupo destacan los altos niveles alcanzados por el zumo de limón (44,54 pg/mL), el pomelo rojo (43,08 pg/mL) y la mandarina (34,05 pg/mL). Cabe destacar también que el zumo de la naranja comercial fue el que presentó los niveles más bajos (8,52 pg/mL), en contraste con la naranja de producción local que tuvo niveles 3 veces superiores (20,99 pg/mL). Por otra parte también se obtuvieron altos niveles de melatonina en el zumo de manzana (45,71pg/mL) y granada (43,41 pg/mL), frutas a las que se le atribuyen grandes concentraciones de antioxidantes (Iriti *et al.*, 2010).

En general la variabilidad presente en los zumos fue menor que la detectada en la fruta entera, lo que

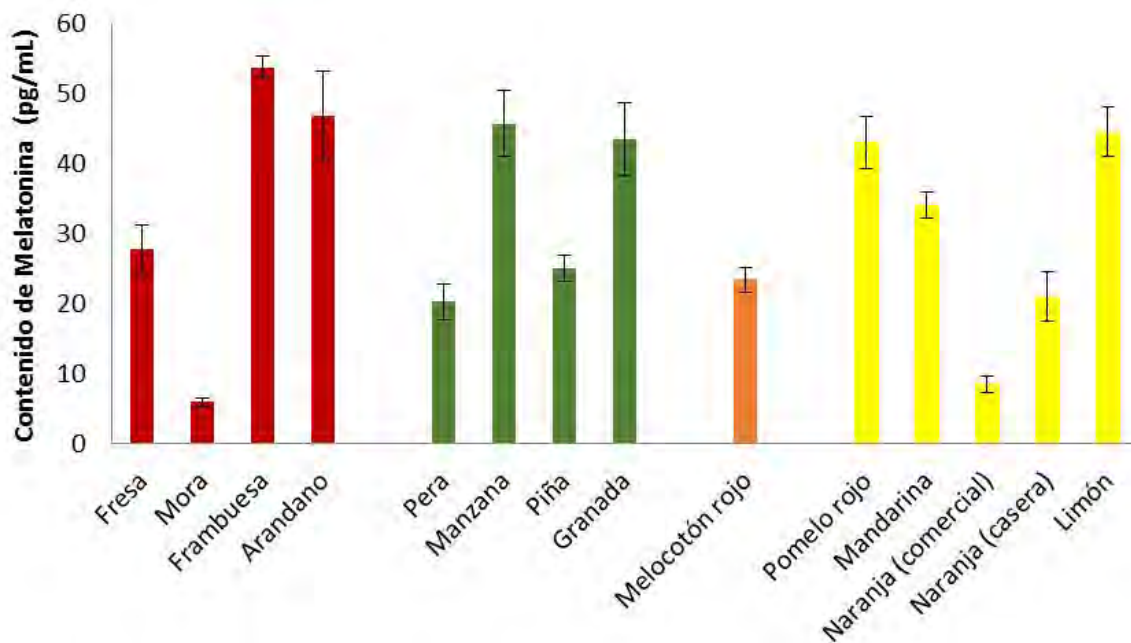


Figura 5: Contenido de melatonina (pg/mL) en los distintos zumos de frutas estudiados. Las barras representan la media \pm error estándar de la media (E.E.M.) de 4 réplicas. Se usaron diferentes colores para agrupar las frutas en las siguientes categorías: frutos rojos (color rojo), frutas sin hueso (color verde), frutas con hueso (color naranja) y cítricos (color amarillo).

contrasta con un contenido aparentemente mayor de melatonina en esta última. Por ejemplo, en el caso extremo de la mora se obtuvo una concentración de melatonina en la fruta de 338 pg/g de muestra, mientras que en el zumo se obtuvieron 5,9 pg/mL de zumo. Estas variaciones pudieron deberse a que el proceso de licuado de la fruta para obtener zumo, no fuese tan eficaz para la extracción de melatonina como la preparación de un homogenado por métodos mecánicos (desmenuzamiento del fruto entero en mortero y posterior inmersión en un baño de ultrasonidos), lo que pudo favorecer la fractura de las células vegetales y la extracción de la melatonina en el solvente orgánico. En este sentido también hemos constatado que una pequeña parte de la melatonina del fruto a partir del cual se obtuvo el zumo, quedó depositada en los restos de pulpa y de la piel que fueron desechados, lo que no sucedió en el análisis de las frutas enteras. De forma similar estudios realizados en uvas mostraron que los niveles más altos de melatonina se encontraron en las pieles y semillas de las uvas (Vitalini *et al.*, 2011), las cuales habitualmente no son aprovechadas en la elaboración de zumos.

Conclusiones

- Se ha confirmado la presencia de melatonina en una amplia variedad de frutas y en zumos naturales, observándose una gran variabilidad en los niveles detectados entre los tipos de frutas e incluso dentro del mismo tipo de fruta.

- Las concentraciones de melatonina medidas en las frutas enteras fueron aparentemente superiores a las de los zumos de frutas, lo que podría estar motivado por una mayor eficiencia del proceso de extracción seguido con la fruta entera en relación con el zumo.
- Estos resultados demuestran que el consumo de frutas supone un aporte significativo de melatonina al organismo. Debido a las características antioxidantes de esta molécula, su presencia en frutas puede contribuir a las propiedades beneficiosas que tienen estos alimentos para la salud humana.

Bibliografía

- Arnao, M.B., Hernández-Ruiz, J. (2014). Melatonin: plant growth regulator and/or biostimulator during stress? *Trends Plant Sci.* 19: 789–797.
- Arnao, M.B., Hernández-Ruiz, J. (2006). The physiological function of melatonin in plants. *Plant Sign. Behav.* 1: 89-95.
- Arnao, M.B., Hernández-Ruiz, J. (2015). Functions of melatonin in plants: a review. *L. J. Pineal Res.* 59: 133-150.
- Budak, H., Khan, Z., Kantar, M. (2015). History and current status of wheat miRNAs using next-generation sequencing and their roles in development and stress. *Brief. Funct. Genomics* 14: 189-19.
- Dubbels, R., Reiter, R.J., Klenke, E., Goebel, A., Schnakenberg, E., Ehlers, C., Schiwara, H.W., Schloot, W. (1995). Melatonin in edible plants identified by radioimmunoassay and high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Pineal Res.* 18: 28-31.
- Falcón, J., Besseau, L., Fuentès, M., Sauzet, S., Magnanou, E., & Boeuf, G. (2009). Structural and functional evolution of the pineal melatonin system in vertebrates. *Annals New York Academy Sci*, 1163: 101-111.
- Fernández-Pachón, M.S., Medina, S., Herrero-Martín, G., Cerrillo, I., Berná, G., Escudero-López, B., Ferreres, F., Martín, F., García-Parrilla, M. C., Gil-Izquierdo, A. (2014). Alcoholic fermentation induces melatonin synthesis in orange juice. *J. Pineal Res.* 56: 31-38.
- García-Parrilla, M.C., Cantos, E., Troncoso, A.M. (2009). Analysis of melatonin in foods. *J. Food Comp. Anal.* 22: 177-183.
- Hardeland, R. (2014). Melatonin in plants and other phototrophs: advances and gaps concerning the diversity of functions. *J. Exp. Bot.* 66: 627-646.
- Hattori, A., Migitaka, H., Iigo, M. (1995). Identification of melatonin in plants and its effects on plasma melatonin levels and binding to melatonin receptors in vertebrates. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 35: 627–634.
- Iriti, M., Varoni, E.M., Vitalini, S. (2010). Melatonin in traditional mediterranean diets. *J. Pineal Res.* 49:101-105.
- Johns, N. P., Johns, J., Parasuphatana, S. Plaimée, P., Sae-Teaw, M. (2013). Dietary intake of melatonin from tropical fruit altered urinary excretion of 6-sulfatoxymelatonin in healthy volunteers. *J. Sci. Food Agr.* 61: 913-919.
- Lamont, K.T., Somers, S., Lacerda, L., Opie, L.H., Lecour, S. (2011). Is red wine a SAFE sip away from cardioprotection? Mechanism involved in resveratrol-and melatonin-induced cardioprotection. *J. Pineal Res.* 50: 374-380.
- Lerner, A.B., Case, J.D., Takahashi, Y. (1958). Isolation of melatonin, a pineal factor that lightens melanocytes. *J. Am. Chem. Soc.* 80: 2057-2058.
- Luzia-França, E., Conde-Maynié, J., Conde-Correa, V., Rodrigues-Pereira, U.C., Batalini, C., Bucalen- Ferrari, C.K., Honorio-França, A.C. (2010). Immunodulatory effects of herbal plants plus melatonin on human blood phagocytes. *Int. J. Phytomelatonin* 2: 354-362.

- Muñoz, J.L.P., Ceinos, R.M., Soengas, J.L., Míguez, J.M. (2009). A simple and sensitive method for determination of melatonin in plasma, bile and intestinal tissues by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. B* 977: 2173-2177.
- Murch, S. J., Alan, A. R., Cao, J., & Saxena, P. K. (2009). Melatonin and serotonin in flowers and fruits of *Datura metel* L. *J. pineal res.* 47: 277-283.
- Nawaz, M. A., Huang, Y., Bie, Z., Ahmed, W., Reiter, R. J., Niu, M., Hameed, S. (2015). Melatonin: current status and future perspectives in plant science. *Front plant sci.* 6.
- Paredes, S.D., Korkmaz, A., Manchester, L.C., Tan, D.X., Reiter, R.J. (2009). Phytomelatonin: a review. *J. Exp. Bot.* 60: 57-69.
- Reiter, R.J. (1991). Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr. Rev.* 12: 151-180.
- Reiter, R.J., Tan, D.X., Poeggeler, B., Menendez-Pelaez, A., Chen, L., Saarela, S. (1994). Melatonin as a free radical scavenger: Implications for aging and age-related diseases. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 719: 1-12.
- Sae-Teaw, M., Jonhs, J., Johns, N.P., Subongkot, S. (2012). Serum melatonin levels and antioxidant capacities after consumption of pineapple, orange, or banana by healthy male volunteers. *J. Pineal Res.* 55: 58-64.
- Tan, D.X., Hardeland, R., Manchester, L.C., Korkmaz, A., Ma, S., Rosales-Corral, S., Reiter, R.J. (2011). Functional roles of melatonin in plants, and perspectives in nutritional and agricultural science. *J. Exp. Bot.* 20: 1-21.
- Tan, H., Qurashi, A., Poidevin, M., Nelson, D.L., Li, H., Jin, P. (2012). Retrotransposon activation contributes to fragile X premutation rCGG-mediated neurodegeneration. *Hum. Mol. Genet.* 21: 57-65.
- Tettamani, C., Cerabolini, B., Gerola, P., Conti, A. (2000). Melatonin identification in medicinal plants. *Acta Phytother.* 3: 137-144.
- Van Tassel, D., Roberts, N., O'Neill, S. (1995). Melatonin from higher plants: isolation and identification of N-acetyl-5-methoxytryptamine. *Plant Phys.* 108:101.
- Vitalini, S., Gardana, C., Zanzotto, A., Simonetti, P., Faoro, F., Fico, G., Iriti, M. (2011). Melatonin occurrence in grapevine (*Vitis vinifera* L.) berry tissues. *Journal of Pineal Research.* *J. Pineal Res.* 51: 311-337.
- Zhang B, Yu Q, Jia C, Wang Y, Xiao C, Dong Y, Xu N, Wang L, Li M. (2015). The actin-related protein Sac1 is required for morphogenesis and cell wall integrity in *Candida albicans*. *Fungal Genet. Bio.* 81: 261-270.