



INSTITUTO NACIONAL
DE VITIVINICULTURA



Ministerio de Agroindustria
Presidencia de la Nación

Monitoreo de melatonina desde la vid hasta el vino

IBAM, UNCuyo CONICET

Lic. Federico J. V. Gomez

Lic. María Fernanda Silva



Monitoreo de melatonina desde la vid hasta el vino

Federico José Vicente Gomez¹ , Ismael Gatica-Hernandez¹ ,
María Fernanda Silva¹ Soledad Cerutti ²
CONICET

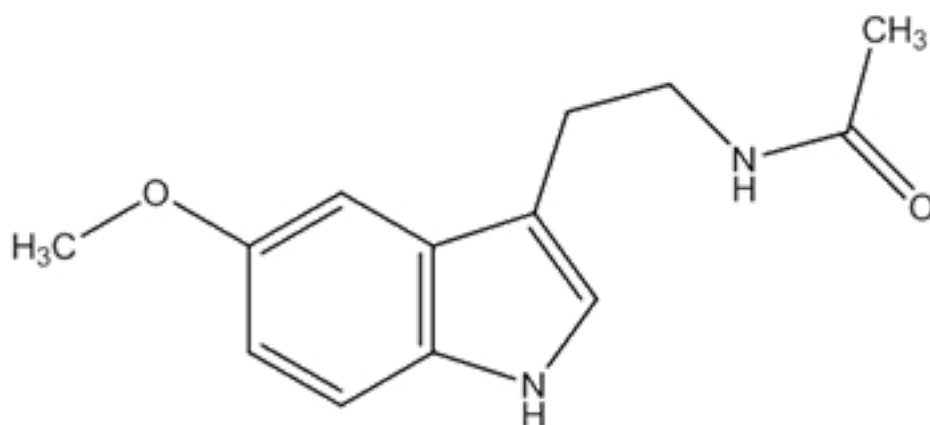
Melatonina es una indolamina ampliamente distribuida en la naturaleza, producida por organismos unicelulares, plantas, hongos y animales. Es sintetizada a partir de L-triptófano vía serotonina. Comúnmente a esta molécula se la conoce como la hormona de la oscuridad ya que en vertebrados participa en el ritmo circadiano y la inducción del sueño. Además de la actividad hormonal, se ha demostrado que es un antioxidante eficaz, presenta actividad inhibitoria sobre algunas formas de cáncer y muestra efectos beneficiosos sobre los trastornos neuronales. A pesar del vasto conocimiento de su rol en animales, el conocimiento de su función en plantas es muy limitado. En la actualidad se realizan numerosas investigaciones tendientes a dilucidar el rol biológico de melatonina en plantas. Sin embargo, en la mayoría de estos trabajos se le da poca importancia a la optimización de la metodología analítica empleada, siendo esto el causante del gran número de resultados contrastantes reportados.

Por lo anterior, es de suma importancia el desarrollo de metodologías analíticas novedosas para la determinación de melatonina y analitos relacionados biológicamente. En el presente trabajo se determinó melatonina y sus isómeros mediante UHPLC-ESI-MS/MS en hollejos, y luego en matrices involucradas en todas las etapas de la vinificación, desde el mosto hasta el vino terminado. Se observó la presencia de MT en hollejos en concentraciones del orden de $\mu\text{g/L}$. Se detectó una concentración creciente de un isómero de MT a medida que avanzaba el proceso de vinificación. Lo cual evidenciaría una participación de las levaduras utilizadas para la fermentación en la síntesis de este isómero a partir de algún precursor.

Introducción

Melatonina (MT, Figura 1) es una molécula de al menos dos mil millones de años, que está presente en casi todos los animales y plantas en donde se ha buscado, con la misma estructura molecular, situación que muy rara vez sucede en la naturaleza. Se cree que esta indolamina apareció con la misión fundamental de “neutralizar el efecto dañino del oxígeno” como productor de radicales libres, poseyendo un potente efecto antioxidante. Con el tiempo ha sido capaz de ir adquiriendo otras funciones propias de una hormona [1]. En vertebrados, MT es una hormona involucrada en la regulación de procesos fisiológicos, incluyendo

ritmo circadiano y fotoperiodicidad. Se produce, principalmente, en la glándula pineal, y participa en una gran variedad de procesos celulares, neuroendócrinos y neurofisiológicos [2]. A pesar del vasto conocimiento de su rol fisiológico y farmacológico en animales el conocimiento de la función in vivo de melatonina en plantas hasta el momento es muy limitado. Los estudios realizados tendientes a identificar su función han sido realizados mediante aplicaciones exógenas de melatonina, en dosis generalmente no fisiológicas.



Melatonina (MT)
N-acetil-5-metoxitriptamina

Figura 1: Estructura química de melatonina

La melatonina que se ha encontrado en pequeñas concentraciones en algunas frutas y verduras como la mostaza, las almendras y pipas de girasol, el cardamomo, el hinojo, el cilantro y las cerezas. También se ha detectado su presencia en bebidas alcohólicas ampliamente consumidas en la dieta mediterránea como son el vino y la cerveza. Como se ha mencionado, el estudio la evaluación de la presencia y función de MT en plantas superiores avanza muy lentamente debido a problemas relacionados con su extracción de los tejidos vegetales y la posterior cuantificación

precisa de esta hormona [3-5]. La complejidad de los extractos de plantas pueden interferir en las determinaciones de MT, dando la posibilidad de falsos positivos si los métodos desarrollados para vertebrados son directamente aplicados al análisis de matrices vegetales, ej: debido a la co-elución en cromatografía líquida o reactividad cruzada con anticuerpos de métodos inmunológicos como RIA o ELISA [6, 7].

Van Tassel y colaboradores [4, 5] observaron que la validación de acuerdo a un criterio estándar; de la dilución lineal en serie y en paralelo de in-

hibición para inmunoensayo, y co-elución con un estándar auténtico para HPLC, no son suficientes para asegurar la identidad de melatonina. Únicamente la cromatografía gaseosa (GC) o cromatografía líquida (LC) combinadas con detección por espectrometría de masas pueden ser utilizadas para confirmar inequívocamente la presencia de melatonina [4, 5, 7]. Esto podría explicar muchos resultados contradictorios encontrados, todos cuantificados a partir de métodos similares, para los valores de MT en plantas de las mismas especies [5]. Por ejemplo, en tubérculos de jengibre se reportó una concentración de MT entre 584 y 1423 pg g⁻¹ (peso fresco) [9, 10] mientras que Van Tassel y O'Neill [5] encontraron solo trazas en este órgano de la planta. Diferencias en la degradación de MT y la eficiencia de extracción pueden representar otra fuente de variación.

Debido a la enorme importancia de esta molécula y a lo anteriormente descrito, resulta fundamental el desarrollo de metodologías analíticas destinadas a determinar melatonina y analitos biológicamente relacionados con ella con el pro-

pósito de contribuir al entendimiento y dilucidación del rol biológico de esta indolamina en plantas. El análisis de MT en tejidos vegetales presenta diversas dificultades y constituye un gran desafío para la química analítica. En primer lugar, sus concentraciones a niveles sub-vestigiales son incompatibles con los límites de detección de cualquier sistema de detección tradicional. En segundo lugar, la naturaleza anfílica de melatonina resulta en una muy difícil elección del solvente de extracción para lograr recuperaciones cuantitativas. En tercer lugar, es un potente antioxidante que reacciona fácilmente con diversas especies presentes en la matriz, por lo que es indispensable lograr una adecuada manipulación de la muestra. Finalmente, debe tenerse en cuenta la elevada labilidad de esta molécula luego de ser extraída de tejidos vegetales y su sensibilidad a la luz. Por lo anteriormente dicho es de suma importancia el desarrollo de metodologías robustas teniendo sumo cuidado en la manipulación de las muestras y en la interpretación de los resultados obtenidos.

Objetivos

-Contribuir al entendimiento del papel que cumple melatonina (MT) en plantas y entender que factores externos modulan su abundancia en vid, con fines nutraceuticos.

-Desarrollar una metodología analítica mediante UHPLC-MS/MS para la determinación de MT en diferentes matrices.

-Aplicar la metodología mediante UHPLC-MS/MS desarrollada con el fin de monitorear a MT y sus isómeros durante todo el proceso de vinificación.



Materiales y métodos Estándares y solventes

Melatonina se obtuvo de Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA). Acetonitrilo, metanol, y agua Optima®, grado LC-MS fueron comprados de Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ, USA). Acido fórmico al 98% se obtuvo de Fisher Scientific (Loughborough, UK). Acido acético (grado traza de metales), acetato de amonio grado HPLC y formiato de amonio certificados fueron obtenidos de (Fisher Scientific Inc., Pittsburgh,

Pennsylvania). Agua ultrapura (18 MW cm) se obtuvo de EASY pure (RF Barnstead, IA, USA). Cartuchos de extracción en fase sólida Strata C8 (500mg/6mL), Strata C18-E (200mg/6mL) y Strata-X (100mg/6mL) se obtuvieron de Phenomenex® (Torrance, CA, USA). L-triptofano se obtuvo de Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA). Hakaphos RTM se obtuvo de Compo (España). D-(+)-Sacarosa se compró de Biopack (Buenos Aires, Argentina).

Material vegetal

Las muestras se obtuvieron durante el 2010, en un viñedo comercial de *Vitis vinifera* cv. Malbec de clones seleccionados plantados en un suelo arenoso localizado en Gualtallary (1.500 m s.n.m.; 69°77'O and 33°22'S), Tupungato, provincia de Mendoza, Argentina. Las plantas de vid (de 11 años de edad) se encontraban colocadas en espalderos verticales y puestas en Guyot, ubicadas en hileras de norte a sur espaciadas cada una por

2 m. y cada planta por 1,20 m. El viñedo estaba protegido con maya media sombra (polietileno negro) que produce 17% de sombra. El muestreo se llevo a cabo durante la cosecha comercial cuando los niveles de azúcares alcanzaron 24 °Brix. Los racimos se colectaron en bolsas de nylon negras y las uvas fueron procesadas inmediatamente.

Proceso de vinificación

Se llevó a cabo una vinificación a escala piloto de acuerdo al siguiente protocolo: 150 kg de bayas Malbec procedentes de tres hileras fueron muestreadas aleatoriamente, descobilladas, trituradas y se introdujeron en tanques de fermentación. El mosto fue sulfitado (50 mg L⁻¹ K₂S₂O₅) y después de 24 horas se inocularon las levaduras (20 g h L⁻¹ EC1118 Lallemand Montreal, Canadá). Las temperaturas durante la fermentación se mantuvieron a 25 °C ± 1 °C. El remontado y los controles básicos se hicieron a diario. Cuando la fermentación alcohólica se completó (10 días), los

vinos fueron sulfitados (50 mg L⁻¹) y filtrados. Se almacenaron en recipientes de 20 L y se mantuvieron a una temperatura de 7 ° C. Finalmente, fueron embotellados 3 meses después de su preparación. El proceso entero fue realizado con luz tenue para evitar la degradación de la melatonina. En la Tabla 3.1 se muestran los parámetros enológicos del vino los cuales fueron medidos de acuerdo a los métodos oficiales de la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV).
Tabla 3.1: Parámetros enológicos de vinos terminados.



Parámetros Enológicos	
Etanol (%vol.)	14,21
pH	3,68
TA ^a	5,65
TPI ^b	42,70
CI ^c	1,85

a TA: Acidez total expresada como g/L de ácido tartárico
b TPI: Índice total de fenoles
c CI: Intensidad de color

Microvinificación a escala laboratorio

Se llevó a cabo una vinificación a escala laboratorio a partir de 10 kg de uva siguiendo el mismo proceso indicado en el ítem anterior. Se realizó por triplicado y las muestras se tomaron a las 4:00 pm todos los días durante la fermentación.

Por otro lado, se llevó a cabo otra vinificación a escala laboratorio con el objetivo de estudiar la influencia de las levaduras de vinificación y triptófano (precursor de MT) en la biosíntesis de MT y sus isómeros durante el proceso de elaboración del vino. Para ello, el proceso descrito anteriormente se llevó a cabo en ausencia de mosto. En cambio se utilizó un medio de cultivo para las levaduras el cual consistió en sacarosa (250 g L⁻¹) y

nutrientes (Hakaphos RTM, 1 g L⁻¹) con 200 mL de agua destilada. Se llevaron a cabo tres tratamientos diferentes cada uno por triplicado:

a) Ensayo C (control): sacarosa y nutrientes.

b) Ensayo T1: EC1118, sacarosa, nutrientes y melatonina (100 ng L⁻¹).

c) Ensayo T2: EC1118, sacarosa, nutrientes y triptófano (500 ng L⁻¹).

Se tomaron muestras diariamente a las 4:00 pm con el objeto de monitorear MT y sus isómeros durante el proceso de fermentación. La totalidad de los estudios se llevaron a cabo bajo luz débil con el objeto evitar la degradación de los analitos.

Pre-tratamiento de las muestras de uva

Las bayas las cuales habían sido previamente congeladas fueron peladas usando un escalpelo, se secaron bajo nitrógeno gaseoso, se homogeneizaron en mortero, se pesaron muestras de 0.1g, y se transfirieron a un tubo de vidrio de 15 mL. Se agregó una alícuota de 2,5mL de metanol a cada muestra, y luego los tubos se agitaron durante 30 s en vortex. Se utilizó ultrasonificación para asistir y acelerar la extracción de MT del tejido vegetal

en un baño ultrasónico (200 W, 15 °C; Cleanson 1106, Buenos Aires, Argentina) el cual se llenó con agua fría. Se separó el sobrenadante y se centrifugó durante 10 min a 3500 rpm (1852.2 g). El extracto resultante se filtró con filtros de jeringa de 0,22 μ m de PTFE (Osmonics®) y se almacenó a -18 °C hasta el análisis por UHPLC-MS.

Instrumentación y condiciones de UHPLC-MS/MS

Se utilizó un equipo Acquity™ Ultra High Performance LC system (UHPLC) (Waters, Milford, USA) equipado con inyección automática vía autosampler y sistema de bombas (Waters, Milford, USA). El autosampler se mantuvo a 15 °C. La aguja de inyección se lavó entre medidas con mezclas apropiadas de acetonitrilo y agua. La separación se llevó a cabo inyectando 10 µL de muestra en columnas ACQUITY UHPLC® BEH tipo HILIC, C18 y C8 (Waters, Milford, USA) con 2,1 mm de diámetro interno × 50 mm de longitud, y 1,7 µm de tamaño de partícula.

Para la cromatografía en fase reversa utilizando

una columna C8, se utilizó un programa de elución por gradiente, empleando como fase móvil A, ácido fórmico al 0,1% (v/v) y fase móvil B, acetonitrilo con 0,1% (v/v) de ácido fórmico, siendo el flujo de 0,25 mL min⁻¹. El programa de gradiente comenzó con 90% de A, seguido por un incremento lineal de B hasta un 50% en 3,0 min. A continuación se retornó a las condiciones iniciales en un tiempo de 0,2 min, donde se mantuvo por 0,8 min. El tiempo de corrida total fue de 4,0 min. La columna se mantuvo a una temperatura de 35 °C.

Resultados y Discusión

Las curvas de calibrado se crearon bajo condiciones experimentales óptimas a partir de soluciones estándar preparadas en metanol. Se obtuvieron ocho puntos para la construcción de la curva de calibrado con tres réplicas por cada punto. Las ecuaciones de calibrado fueron calculadas por el método de regresión lineal y las concentraciones desconocidas fueron calculadas por extrapolación. Se evaluó la linealidad desde valores cercanos al LOD hasta aproximadamente 500 µg L⁻¹. La linealidad de la curva de calibrado fue satisfactoria con un coeficiente de correlación de 0,9998 y la ecuación fue $y=1414x-1126$.

Teniendo en cuenta que no se dispone de un material de referencia de vino con un valor informado del contenido de MT es aceptable realizar estudios de recuperación para asegurar la validez de las medidas. Para estimar la exactitud, se realizaron ensayos de repetibilidad intra-día y reproducibilidad inter-día, para esto se analizaron 5 muestras blanco, 3 réplicas por cada muestra, y

se evaluaron los siguientes niveles de concentración: 1, 10, 20, 50, 100, 200, 300, y 500 µg L⁻¹ de MT. Se repitió el mismo experimento 4 veces más en 4 intervalos de tiempo de una semana entre cada uno. Los estudios de recuperación demostraron recuperaciones mayores al 95% y menores que el 103%. La repetibilidad, se calculó como la variabilidad intra-día y se determinó mediante desviación estándar relativa (RSD (%)) para las medidas de las réplicas. Los valores obtenidos fueron mejores que 0,4% para los tiempos de retención y que 5,1% para las áreas de los picos a todas las concentraciones evaluadas (Tabla 3.2). Para los estudios de reproducibilidad se observó una variación entre 1.6 hasta 10.8%. Considerando la complejidad de las muestras bajo estudio, y las diferentes etapas que involucran el procedimiento, se concluye que la robustez de la metodología propuesta es satisfactoria.

Tabla 3.2: Robustez de la metodología desarrollada.

Concentración MT ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Repetibilidad	Reproducibilidad
	RSD(%)	RSD(%)
1	5,12	9,04
10	4,20	10,80
50	3,61	6,20
100	3,12	9,94
200	2,52	8,55
300	1,41	6,39
500	0,11	1,60

Una vez que las condiciones para la extracción, la separación y la cuantificación fueron establecidas, el método se aplicó a la determinación de MT en hollejo, mosto, medio de fermentación y vino. El contenido de MT en hollejo de *Vitis Vinifera* cv. Malbec fue alrededor de 400 ng g⁻¹ expresado en peso seco. De la misma manera como se describió en el capítulo anterior, no se detectó melatonina en vinos terminados realizados con estas uvas. En cambio, se encontró el isómero de MT.

En la Figura 3.1 se muestra el cromatograma de una muestra de vino Malbec fortificado con 100

$\mu\text{g L}^{-1}$ de melatonina, y el espectro de masas de MRM de MT (el radio entre las dos transiciones monitoreadas 233>174 y 233>216 fue 9.56 ± 0.05) y del isómero (el radio entre 233>174 y 233>216 fue 0.057 ± 0.002). Diamantini y colaboradores [11] estudiaron el comportamiento mediante espectrometría de masas de compuestos isoméricos de MT. Ellos describieron su síntesis y realizaron una evaluación biológica, concluyendo que los grupos farmacofóricos de melatonina pueden moverse desde C-5 y C-3 hasta C-6 y N-1 en las posiciones del núcleo indólico sin perder potencia antioxidante

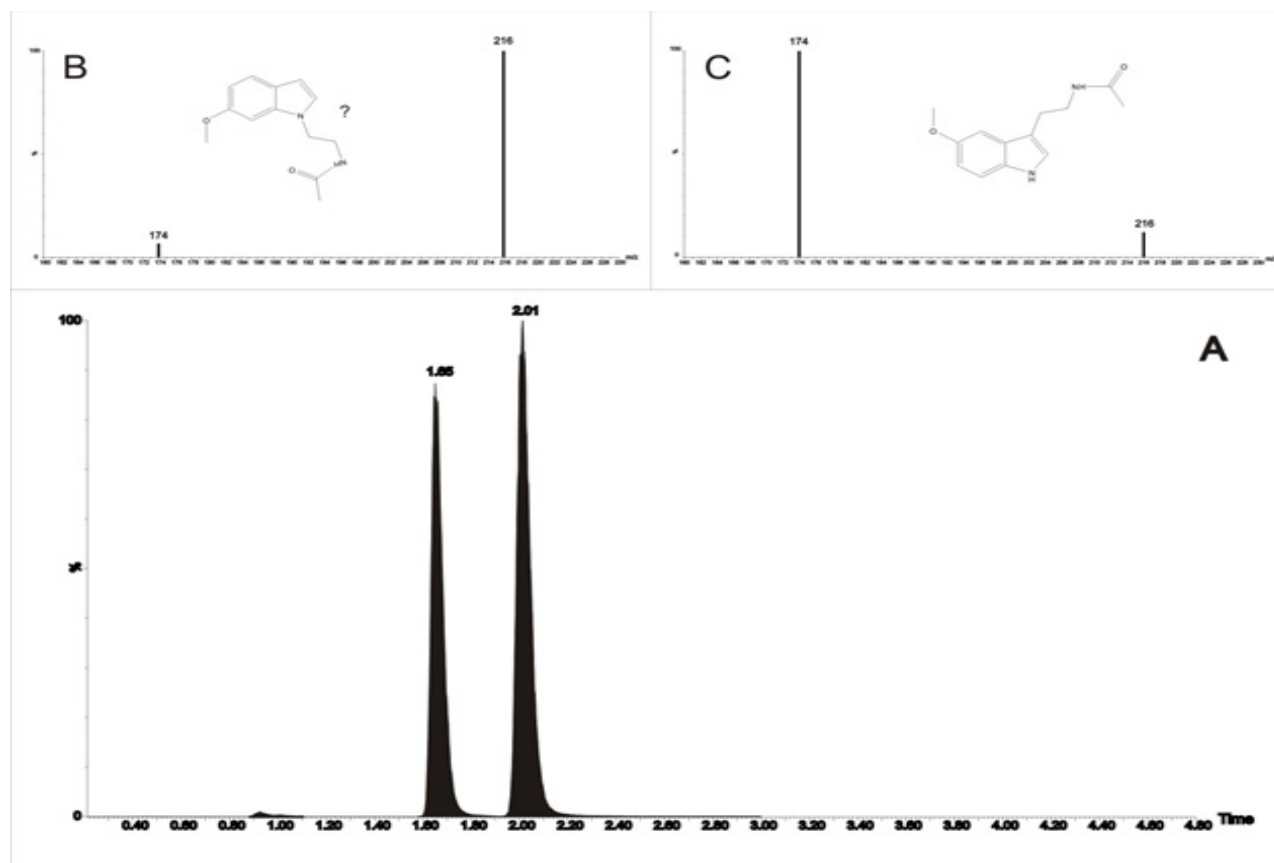


Figura 3.1: (A) Cromatograma de una muestra de vino Malbec con agregado de MT, (B) patrón de fragmentación del isómero y su estructura propuesta, (C) patrón de fragmentación de MT y su estructura.

Como no se dispone de un marcador auténtico para la identificación del isómero mediante MS, es apropiado para realizar una identificación tentativa, comparar la abundancia de los fragmentos e iones para cuasi-identificar isómeros de posición. Como se puede observar en la Figura 3.1 y al igual que se describió en el capítulo anterior, el fragmento más abundante para melatonina es 174, mientras que para el isómero es 216. De acuerdo con Diamantini [11], el único isómero cuyo pico base no es 174 es la estructura que se muestra en la Figura 3.1. Indudablemente, se necesitan estudios complementarios para confirmar la estructura del compuesto encontrado en vinos Malbec. Con el objeto de evaluar la evolución de MT y

su isómero potencialmente identificado durante el proceso fermentativo, se diseñó un protocolo tal como se describe en la sección experimental del presente capítulo. En la Figura 3.2 se muestra la evolución de MT y su isómero durante la fermentación. La concentración del isómero de MT en vinos terminados estuvo en el intervalo de concentraciones entre: 18-24 ng mL⁻¹. Debe ser resaltado que MT no fue detectada; sin embargo la concentración del isómero se incrementó a medida que la fermentación alcohólica avanzaba. Estos resultados sugieren que MT no es extraída en niveles detectables desde el hollejo durante el proceso de molienda, y por otro lado, *Saccharomyces cerevisiae* juega un rol crucial en la síntesis de este isómero.

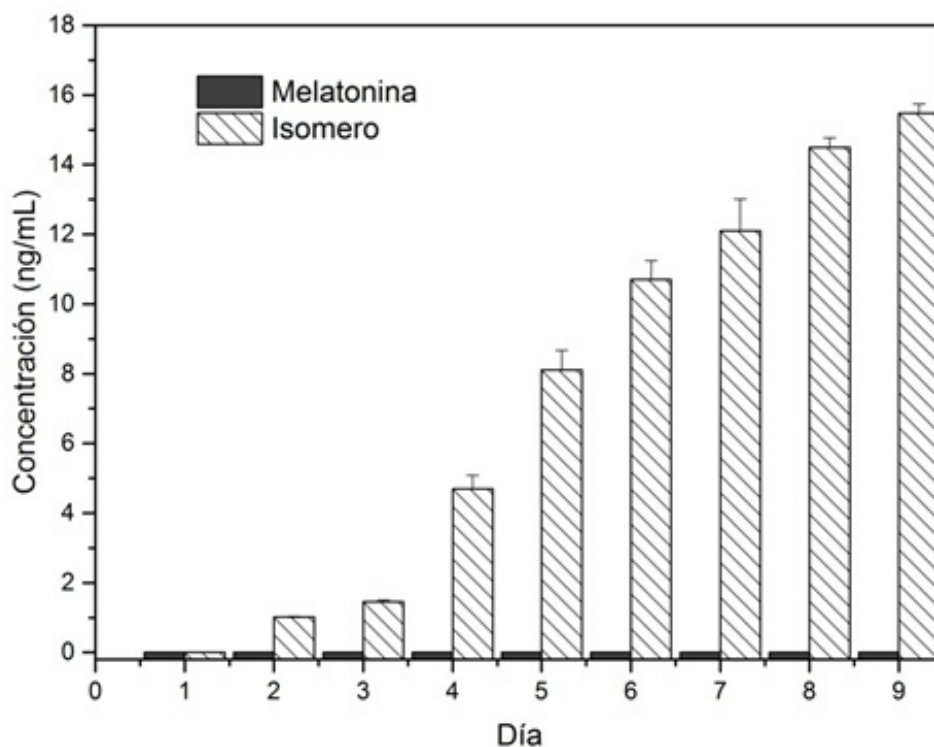


Figura 3.2: Evolución de MT y su isómero durante la vinificación a escala laboratorio. Las barras indican errores estándar de la media (n=3).

Sprenger y colaboradores [12] demostraron que MT y compuestos relacionados estructuralmente se sintetizan en altas concentraciones en *Saccharomyces cerevisiae*. Estos autores también verificaron que melatonina puede ser sintetizada a través de la vía más común partiendo del precursor triptófano hasta N-acetilserotonina como precursor directo. Encontraron además, que la adición de triptófano incrementa los niveles de

MT de manera considerable. En vista de estos resultados, se llevó a cabo un ensayo en ausencia de mosto para elucidar el rol de las levaduras y triptófano durante el proceso de fermentación. En la Figura 3.3 se muestra la evolución de MT y su isómero durante la fermentación en un medio acuoso que contenía levaduras y nutrientes.

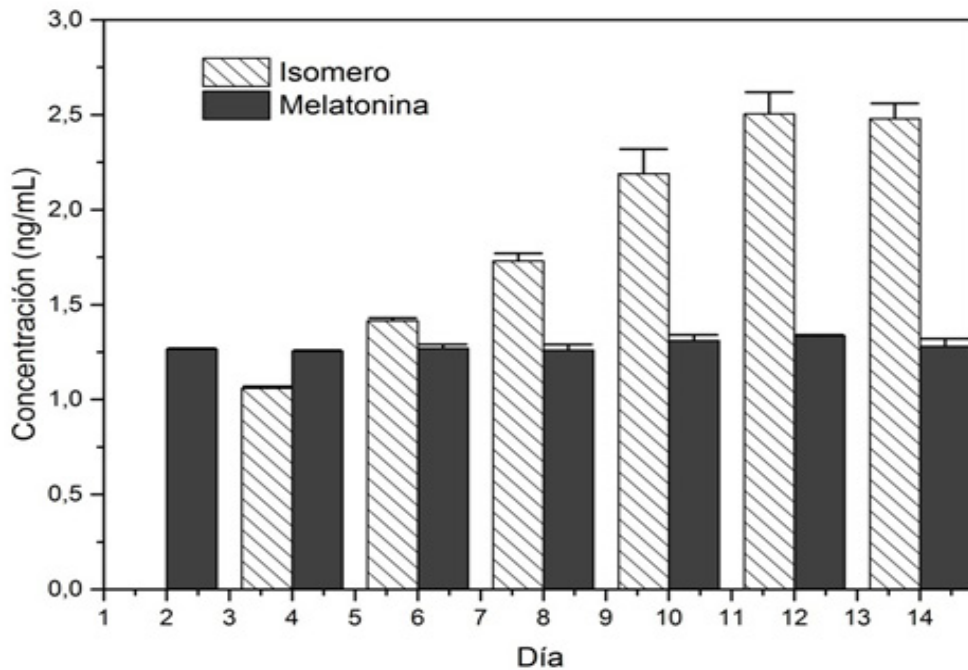


Figura 3.3: Evolución de MT y su isómero durante la fermentación a escala laboratorio en medio acuoso. Condiciones: EC1118 (20 g h/L), sacarosa (250 g/L), Hakaphos RTM (1 g/L), 200 mL de agua destilada. Las barras indican errores estándar de la media (n=3).

Interesantemente, MT fue detectada desde el día dos pero su concentración permaneció constante durante todo el proceso. Por otro lado el isómero fue detectado desde el día cuatro y su concentración fue aumentando durante la fermentación como se observa en la figura anterior (Figura 3.2) de la fermentación en presencia de mosto. Cabe destacar que no se detectaron estas indolaminas en el tratamiento control. Estos resultados sugieren que en *S. cerevisiae*, los niveles de melatonina y sus isómeros son influenciados por las condiciones de crecimiento. Bajo las mismas condiciones, el proceso de biosíntesis del isómero de me-

latonina es más lento. En la Figura 3.4 se muestra la evolución de melatonina y su isómero durante la fermentación en medio acuoso conteniendo levaduras, nutrientes y triptófano. Melatonina no fue detectada durante todo el proceso, y la evolución del isómero mostró resultados similares a los ensayos previos. Las indolaminas no fueron detectadas en los controles. Inesperadamente, no se observó aumento en los ensayos con adición de triptófano como se preveía, ya que como se detalló anteriormente el triptófano es precursor de melatonina y existen antecedentes bibliográficos que indican que puede incrementar su síntesis.

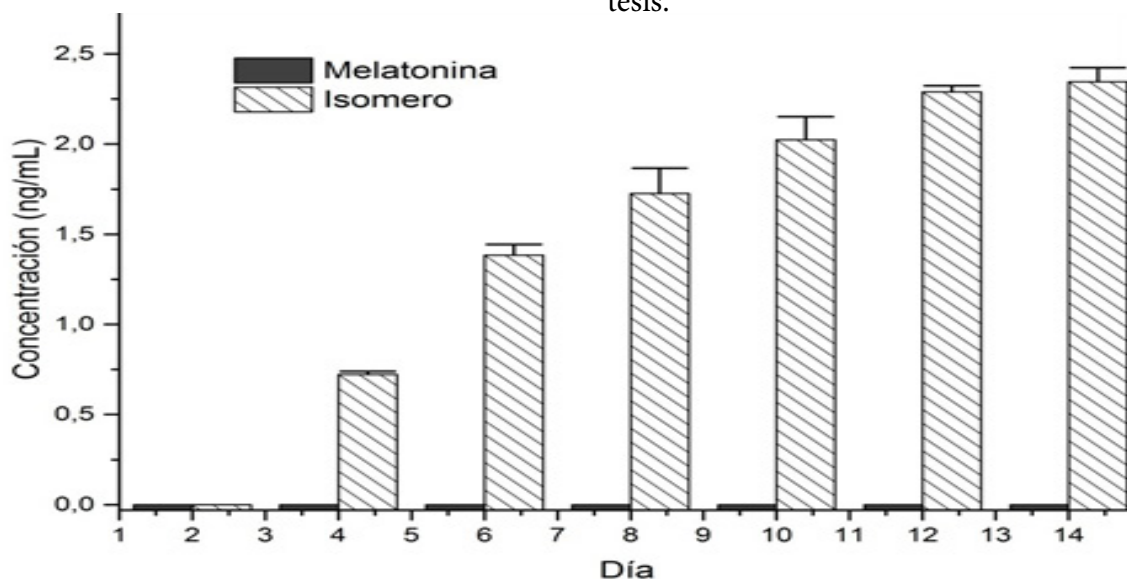


Figura 3.4: Evolución de MT y su isómero durante la fermentación a escala laboratorio en medio acuoso con adición de triptófano. Condiciones: EC1118 (20 g h/L), sacarosa (250 g/L), Hakaphos RTM (1 g/L), triptófano (500 ng/mL), 200 mL de agua destilada. Las barras indican errores estándar de la media (n=3).

En la Figura 3.5 se muestra la evolución de MT y su isómero en medio acuoso que contenía levaduras, nutrientes y MT agregada. Como se puede observar, la adición de MT exógena no altera el comportamiento durante la fermentación.

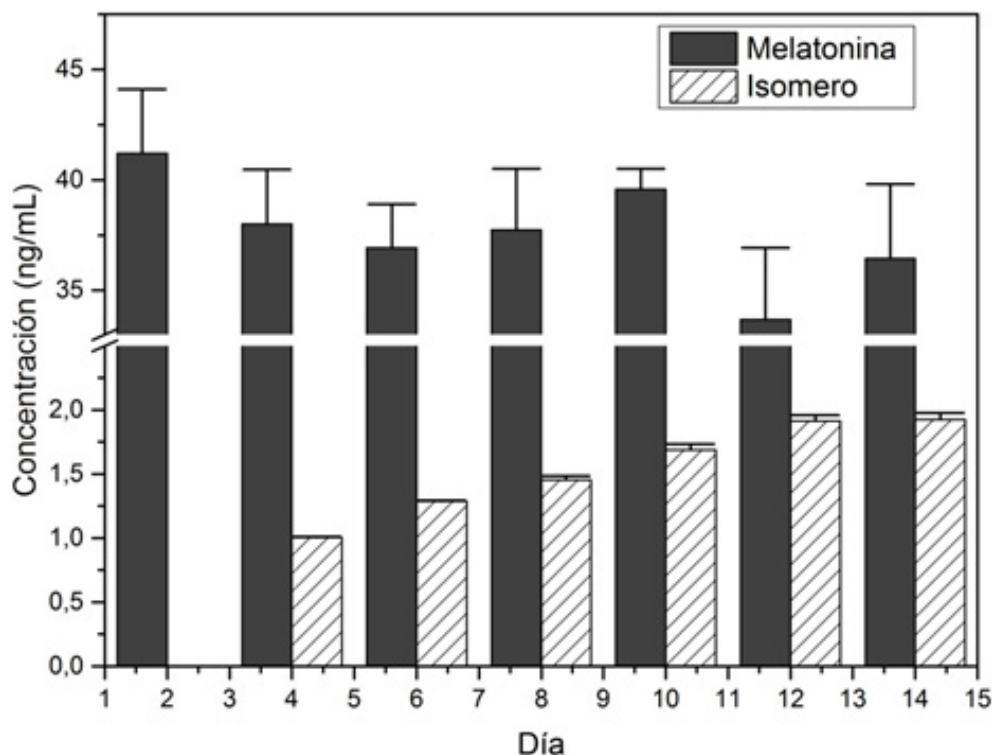


Figura 5: Evolución de MT y su isómero durante la fermentación a escala laboratorio en medio acuoso con adición de MT. Condiciones: EC1118 (20 g h/L), sacarosa (250 g/L), Hakaphos RTM (1 g/L), MT (100 ng/mL), 200 mL de agua destilada. Las barras indican errores estándar de la media (n=3).

Conclusiones

Se desarrolló y optimizó una metodología mediante UHPLC-MS/MS para la determinación de melatonina y sus isómeros en matrices complejas como hollejo, mosto y vino terminado. Se realizó el monitoreo de estas indolaminas durante todo el proceso de vinificación. Se puede concluir que *Saccaromyces* juega un rol decisivo en la producción de melatonina y su isómero. Se obtuvieron resultados contrastantes cuando el proceso de fermentación se llevó a cabo en la presencia de mosto, donde la vía biosintética es conducida hacia la producción del isómero. Además, se ob-

servó el mismo comportamiento en la fermentación en medio acuoso con agregado de triptófano. Estos resultados sugieren que la presencia de este aminoácido en mosto estimula la síntesis del isómero en vinos Malbec. Sin duda, se necesitan estudios futuros para confirmar la estructura del isómero tentativamente identificado en el presente trabajo. De igual manera es necesario estudiar más profundamente el rol de diferentes cepas de levaduras de vinificación utilizadas comúnmente en la producción de vinos comerciales.

Bibliografía

- [1] R. Hardeland, Melatonin and its metabolites as anti-nitrosating and anti-nitrating agents, (2011).
- [2] R.J. Reiter, The melatonin rhythm: Both a clock and a calendar, *Experientia* 49 (1993) 654-664.
- [3] B. Poeggeler, R. Hardeland, Detection and quantification of melatonin in a dinoflagellate, *Gonyaulax polyedra*: Solutions to the problem of methoxyindole destruction in non-vertebrate material, *J Pineal Res* 17 (1994) 1-10.
- [4] D.L. Van Tassel, N. Roberts, A. Lewy, S.D. O'Neill, Melatonin in plant organs, *J Pineal Res* 31 (2001) 8-15.
- [5] D.L. Van Tassel, S.D. O'Neill, Putative regulatory molecules in plants: evaluating melatonin, *J Pineal Res* 31 (2001) 1-7.
- [6] V.M. Cassone, A.K. Natesan, Time and time again: the phylogeny of melatonin as a transducer of biological time, *J. Biol. Rhythms*. 12 (1997) 489-497.
- [7] C. Pape, K. Luning, Quantification of melatonin in phototrophic organisms, *J Pineal Res* 41 (2006) 157-165.
- [8] J. Kolar, I. Machackova, Melatonin in higher plants: occurrence and possible functions, *J Pineal Res* 39 (2005) 333-341.
- [9] A. Hattori, H. Migitaka, M. Iigo, M. Itoh, K. Yamamoto, R. Ohtani-Kaneko, M. Hara, T. Suzuki, R.J. Reiter, Identification of melatonin in plants and its effects on plasma melatonin levels and binding to melatonin receptors in vertebrates, *Biochem. Mol. Biol. Int.* 35 (1995) 627-634.
- [10] F.A. Badria, Melatonin, serotonin, and tryptamine in some egyptian food and medicinal plants, *J. Med. Food*. 5 (2002) 153-157.
- [11] G. Diamantini, G. Tarzia, G. Spadoni, M. D'Alpaos, P. Traldi, Metastable ion studies in the characterization of melatonin isomers, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 12 (1998) 1538-1542.
- [12] J. Sprenger, R. Hardeland, B. Fuhrberg, S.-Z. Han, Melatonin and other 5-methoxylated indoles in yeast: Presence in high concentrations and dependence on tryptophan availability, *Cytologia* 64 (1999) 209-213.