



# SEMINARIO VITIVINÍCOLA 2016

*Melatonina: Buscando la hormona de la oscuridad en plantas y vinos.*

Viernes 26 de agosto, 16 .30 a 19.00 h  
SUM del INV Sede Central - Mendoza

Dr. Ismael Gatica Hernández  
Dr. Federico J. V. Gomez  
Dra. María Fernanda Silva

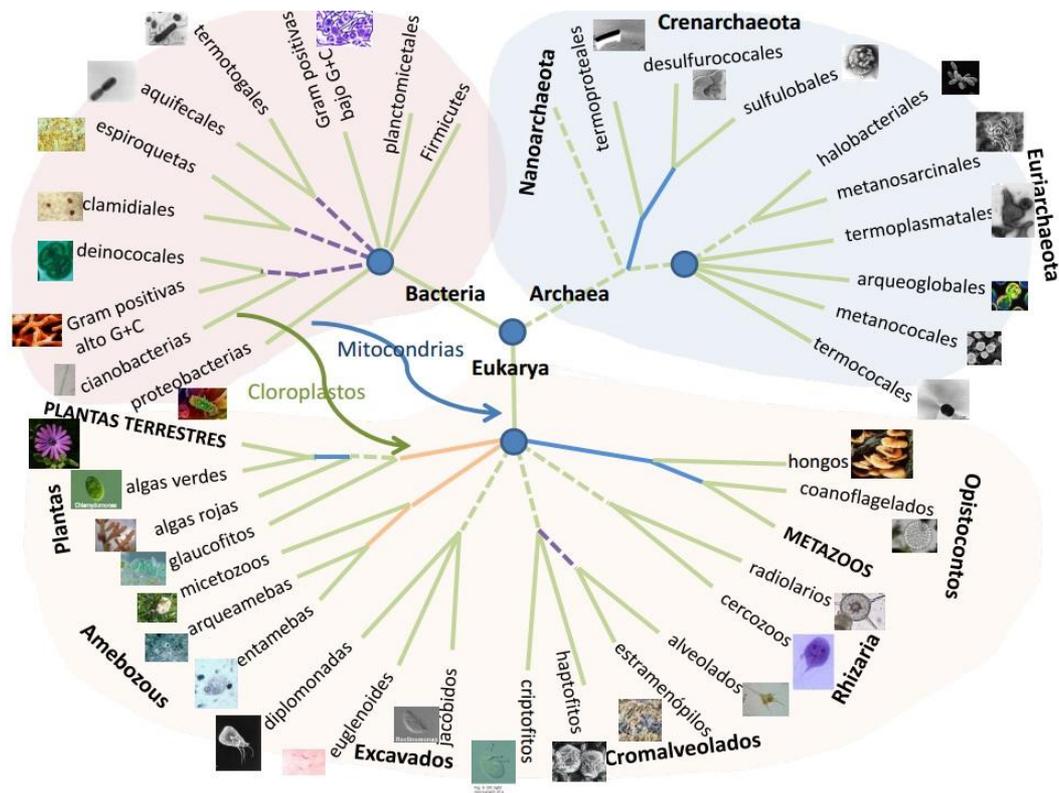


INSTITUTO NACIONAL  
DE VITIVINICULTURA

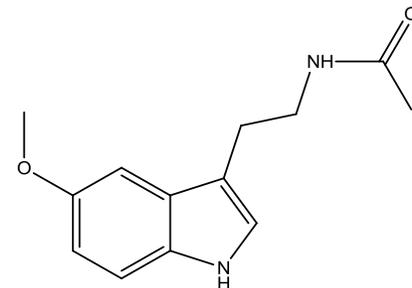


# Introducción

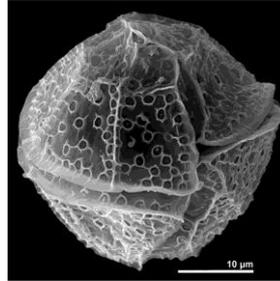
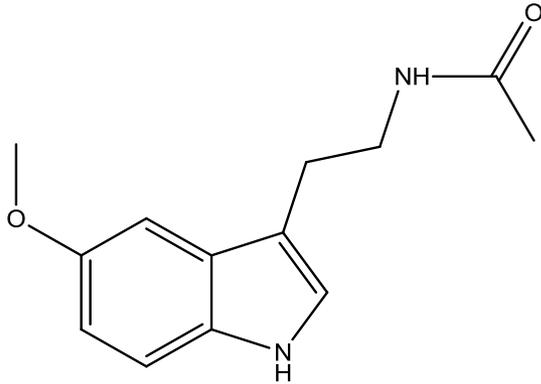




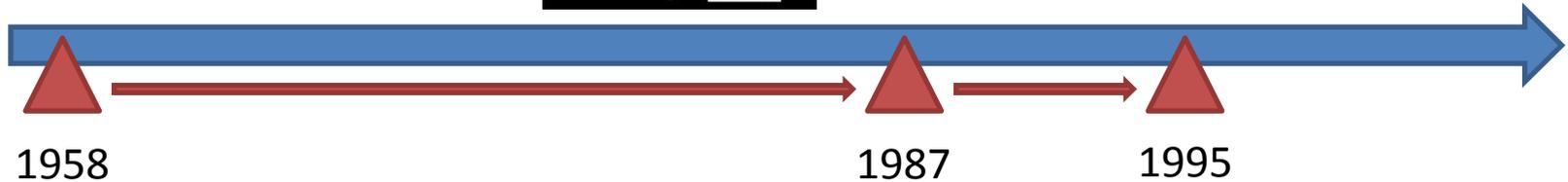
- Molécula de bajo peso molecular, altamente conservada en la naturaleza
- Anfipática
- Gran poder antioxidante
- Elevada labilidad



# Un poco de historia...



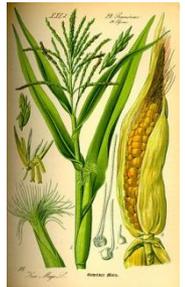
Fue detectada por primera vez en plantas (tabaco, arroz, maíz, etc.) (Dubbels y col. y Hattori y col.).



1958  
MT fue aislada de la glándula pineal bovina por Lerner y colaboradores.

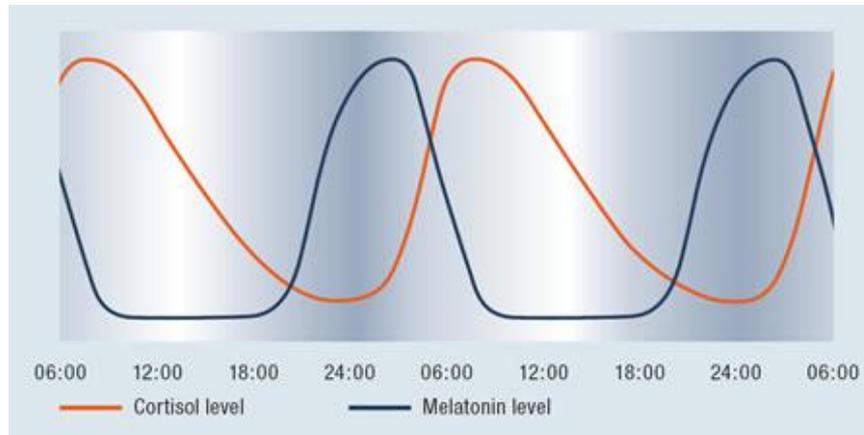


1987  
Hallada en organismos unicelulares (Hardeland & Fischer).



# Función fisiológica en animales

- Regula los ritmos circadianos
- Su síntesis está regulada por factores ambientales y endógenos
- Protege células ante estrés oxidativo

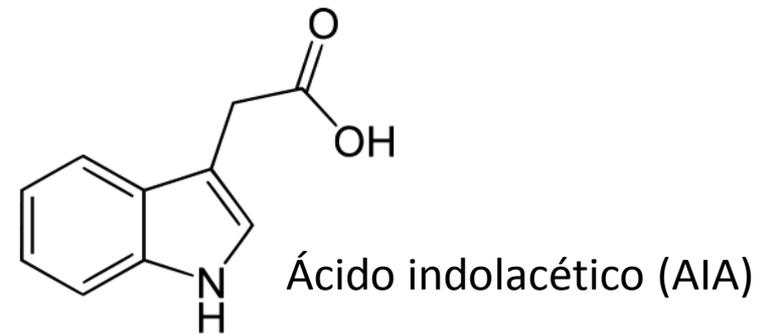
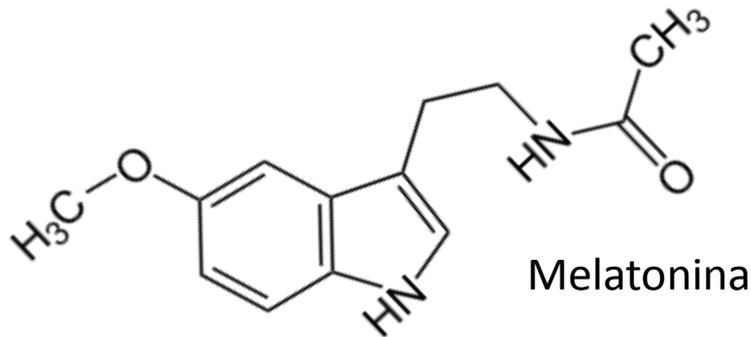


# ¿Función fisiológica en plantas?



Se le adjudican tres funciones a MT en plantas:

- Regulador de crecimiento y desarrollo



- Regulador de respuestas moduladas por reloj biológico y fotoperíodo
- Antioxidante de amplio espectro

El conocimiento de su función *in vivo* en plantas es muy limitado y avanzó lentamente, debido principalmente a problemas con su extracción, detección y cuantificación.

# Niveles de melatonina en plantas



# Niveles de melatonina en plantas



Determinación de MT mediante RIA o ELISA

Falsos +

Falsos -

# Melatonina en uva y vinos

Journal of the  
**Science of  
Food and Agriculture**



[Explore this journal >](#)

**J. Pineal Res. 2008**

Doi:10.1111/j.1600-079X.2008.00616.x

© 2008 The Author  
Journal compilation © 2008 Blackwell Munksgaard  
**Journal of Pineal Research**

Research Article

## Melatonin content in grape LETTER TO THE EDITOR

Marcello Iriti, Mara Rossoni, Franco

## Melatonin in grape, not just a myth, maybe a panacea

First published: 19 June 2006 [Full publication history](#)

2242

*Electrophoresis* 2010, 31, 2242–2248

Patricia W. Stege<sup>1</sup>  
Lorena L. Sombra<sup>1</sup>  
Germán Messina<sup>1</sup>  
Luis D. Martínez<sup>1</sup>  
María F. Silva<sup>2</sup>

<sup>1</sup>INQUISAL, Department of  
Chemistry, National University  
of San Luis, CONICET, San Luis,  
Argentina

<sup>2</sup>IBAM, Facultad de Ciencias  
Agrarias, Universidad Nacional  
de Cuyo, CONICET, Mendoza  
Argentina

Research Article

## Determination of melatonin in wine and plant extracts by capillary electrochromatography with immobilized carboxylic multi-walled carbon nanotubes as stationary phase



ELSEVIER

Journal of Food Composition and Analysis

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jfca](http://www.elsevier.com/locate/jfca)



Original article

## Melatonin: A new bioactive compound in wine

M. Isabel Rodríguez-Naranjo<sup>a</sup>, Angel Gil-Izquierdo<sup>b</sup>, Ana M. Troncoso<sup>a</sup>,  
Emma Cantos<sup>c</sup>, M. Carmen García-Parrilla<sup>a,\*</sup>



# 1<sup>ra</sup> Parte

# Desarrollo de una metodología mediante UHPLC-MS/MS para la determinación de melatonina



# Cosecha



Bodega  
CATENA ZAPATA

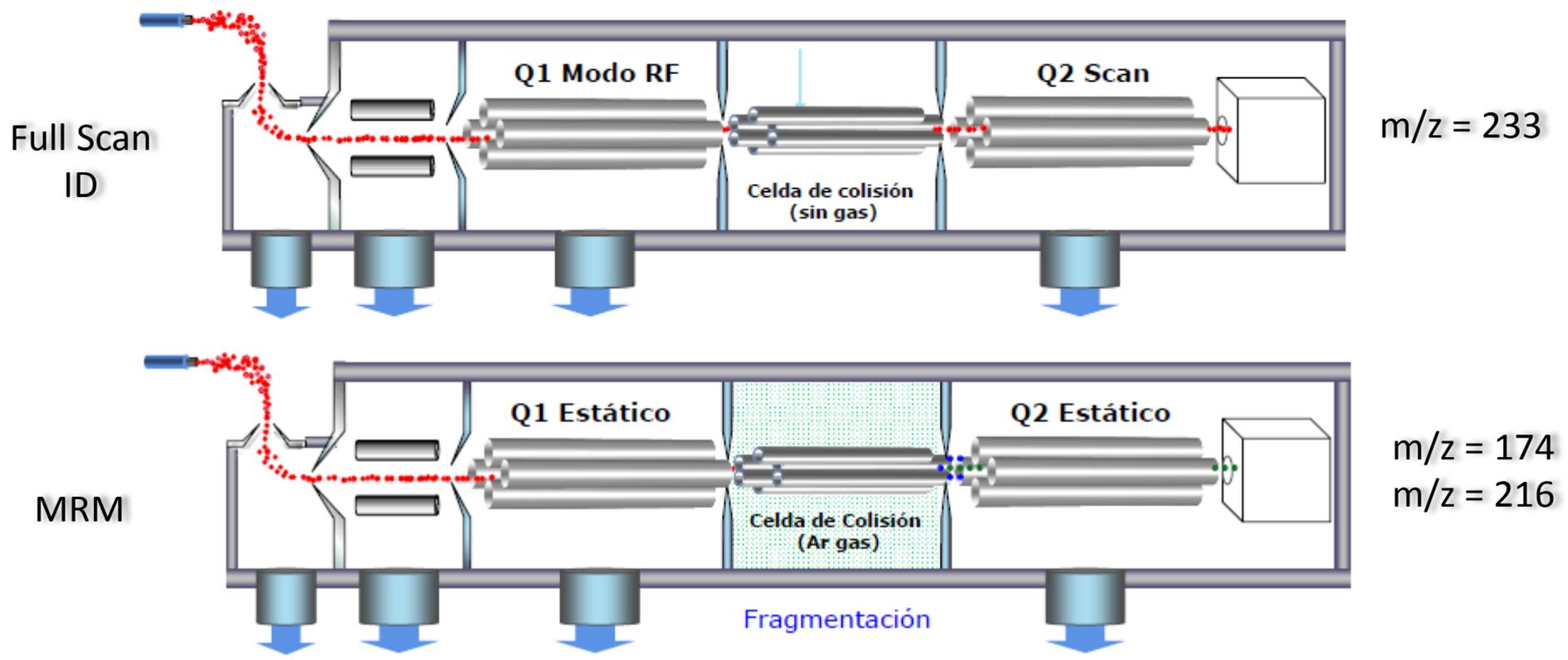
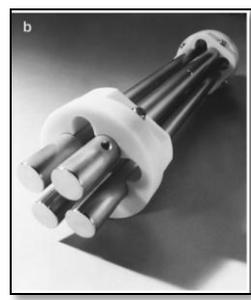
750 ml  
19:30 2:00 9:00  
*Melatonin*  
Malbec 2010

Three small images showing the moon at different times: 19:30, 2:00, and 9:00. The first image shows a bright, glowing moon in a dark sky. The second image shows a crescent moon in a dark sky. The third image shows a crescent moon in a dark sky with a red and orange glow.

# Optimización

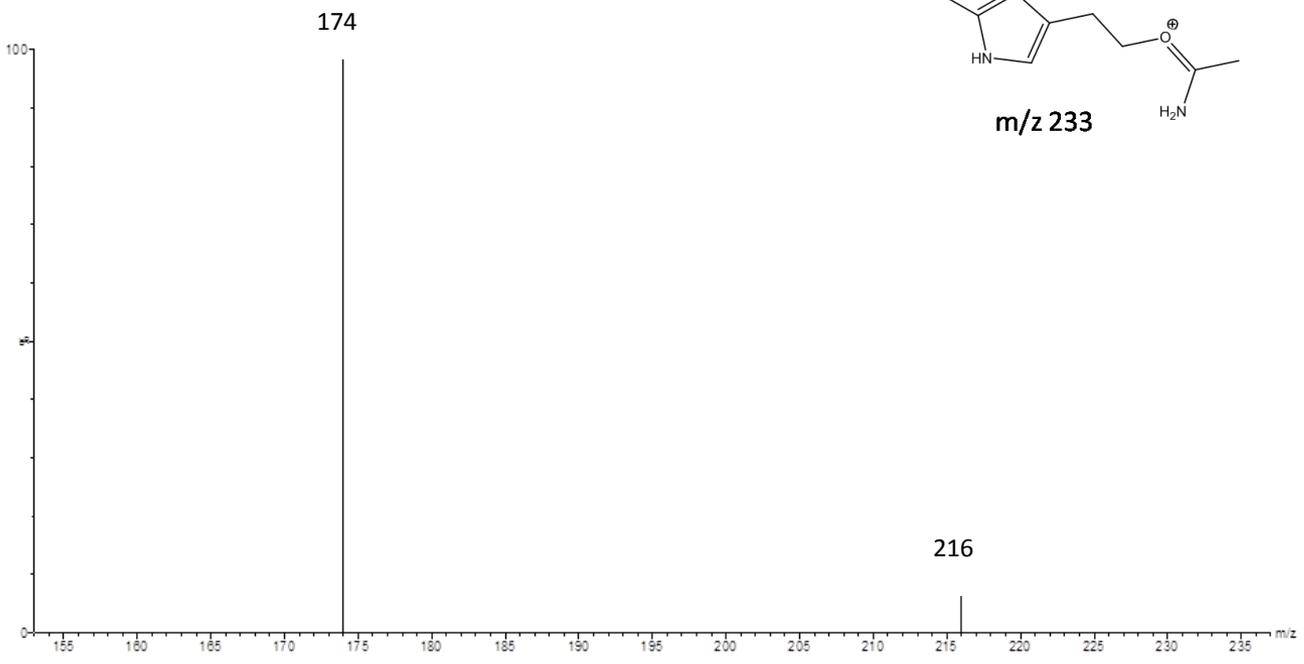
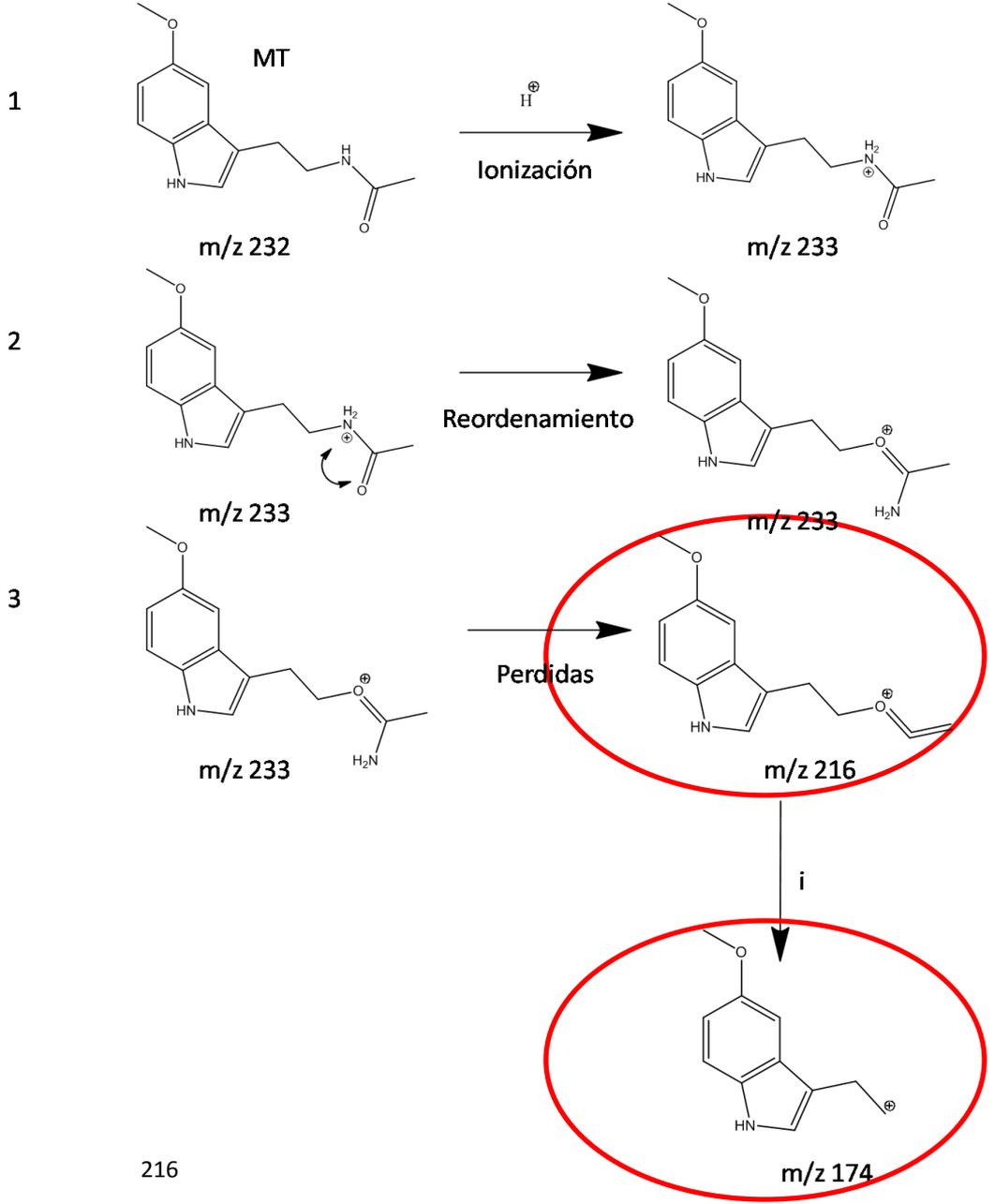
ESI

APCI

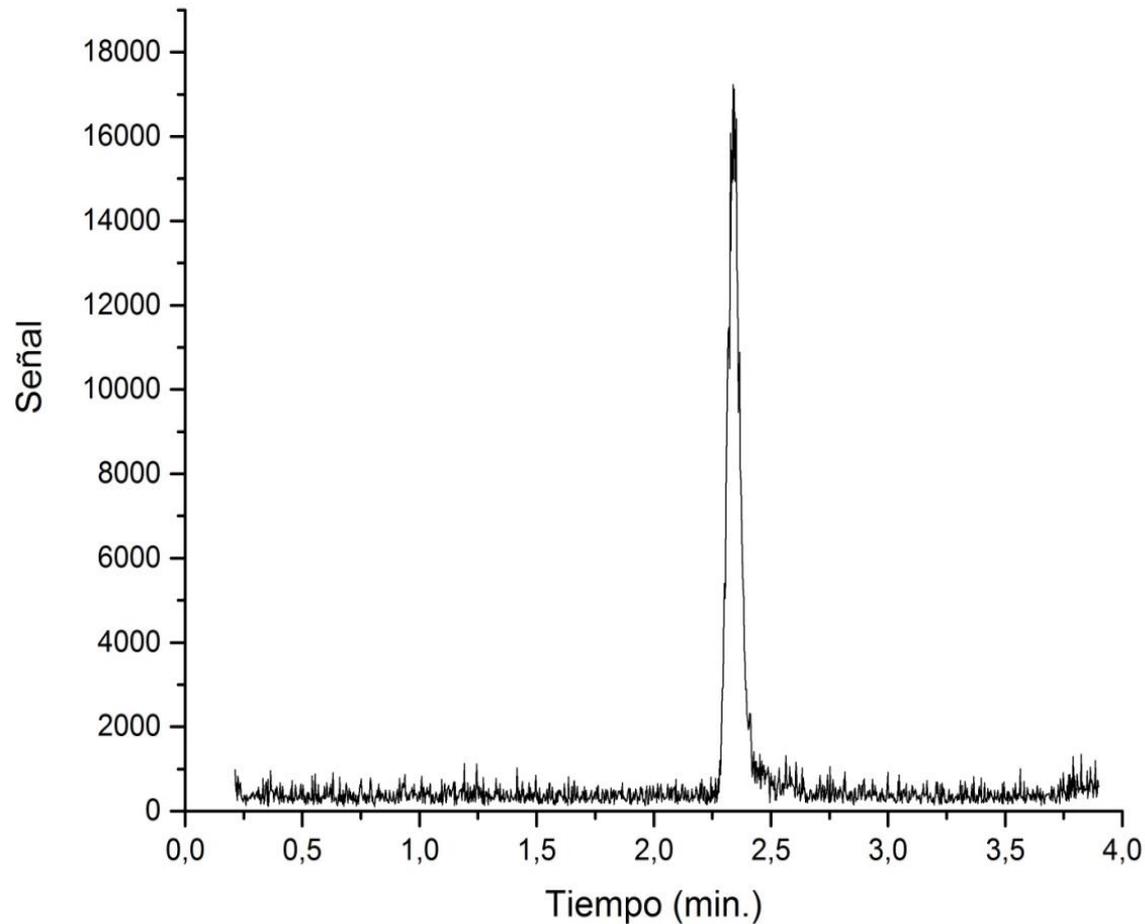
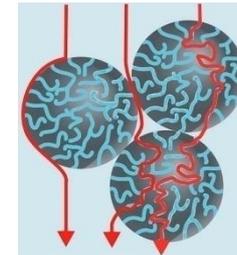


# Optimización

Pérdidas de masa mal asignadas en bibliografía



# Optimización



Estándar de MT. Condiciones: 1 ng mL<sup>-1</sup> MT disuelto en metanol, columna HILIC, fase móvil: A: 7.5 mM NH<sub>4</sub>COOH/H<sub>2</sub>O B: 7.5 mM NH<sub>4</sub>COOH/ACN, modo de ionización (+)ESI.

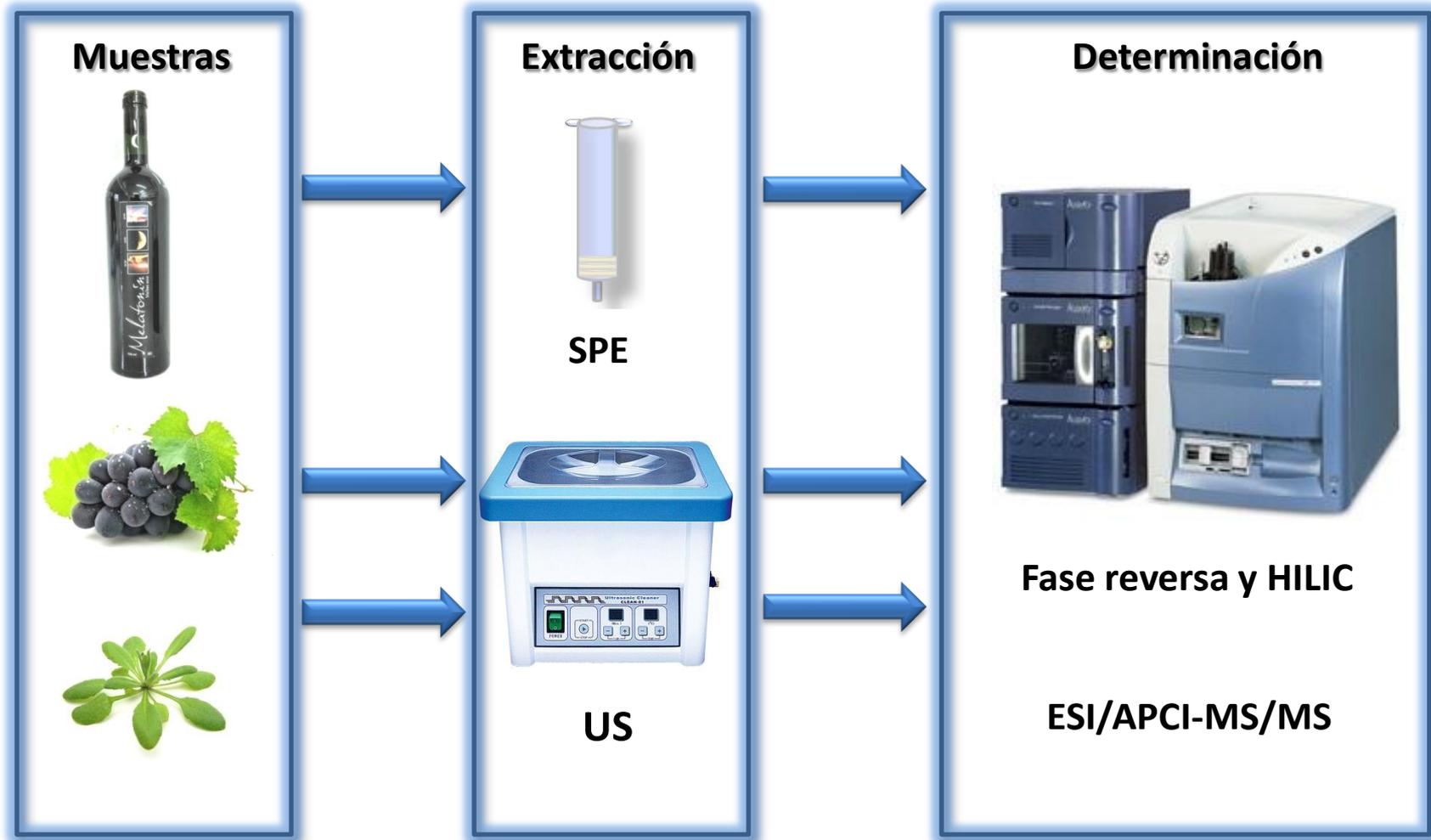
HILIC

C<sub>18</sub>

C<sub>8</sub>



# Optimización



# Parámetros analíticos



Muestra	Pre-tratamiento	Columna	Fase móvil	Ionización	Efecto de matriz (%)	LOD (pg)	LOQ (pg)	Muestras por hora ( $h^{-1}$ )	Recuperación (%) <sup>a</sup>
Estándar	Solución metanólica	HILIC	A: 7.5 mM $NH_4COOH/H_2O$ B: 7.5 mM $NH_4COOH/ACN$	(+)ESI	-	0.89	2.97	13.30	-
Hollejo	MeOH y sonicación. Filtración (PTFE, 0.22 $\mu$ m)	$C_8$	A: 0.1% HCOOH en $H_2O$ B: 0.1% HCOOH in ACN	(+)APCI	69.35	2.61	8.71	4.10	99.30
Mosto y vino	Preconcentración (SPE $C_8$ ) Filtración (PTFE, 0.22 $\mu$ m)	$C_{18}$	A: 0.1% HCOOH en $H_2O$ B: 0.1% HCOOH en ACN	(+)ESI	88.40	0.12	0.42	7.50	104.94
Tejido vegetal (semillas y hojas)	MeOH: $H_2O$ (50:50, v/v) y sonicación. Filtración (PTFE, 0.22 $\mu$ m)	$C_8$	A: 0.1% HCOOH en $H_2O$ B: 0.1% HCOOH en ACN	(+)ESI	20.70	1.71	5.72	2.90	98.70

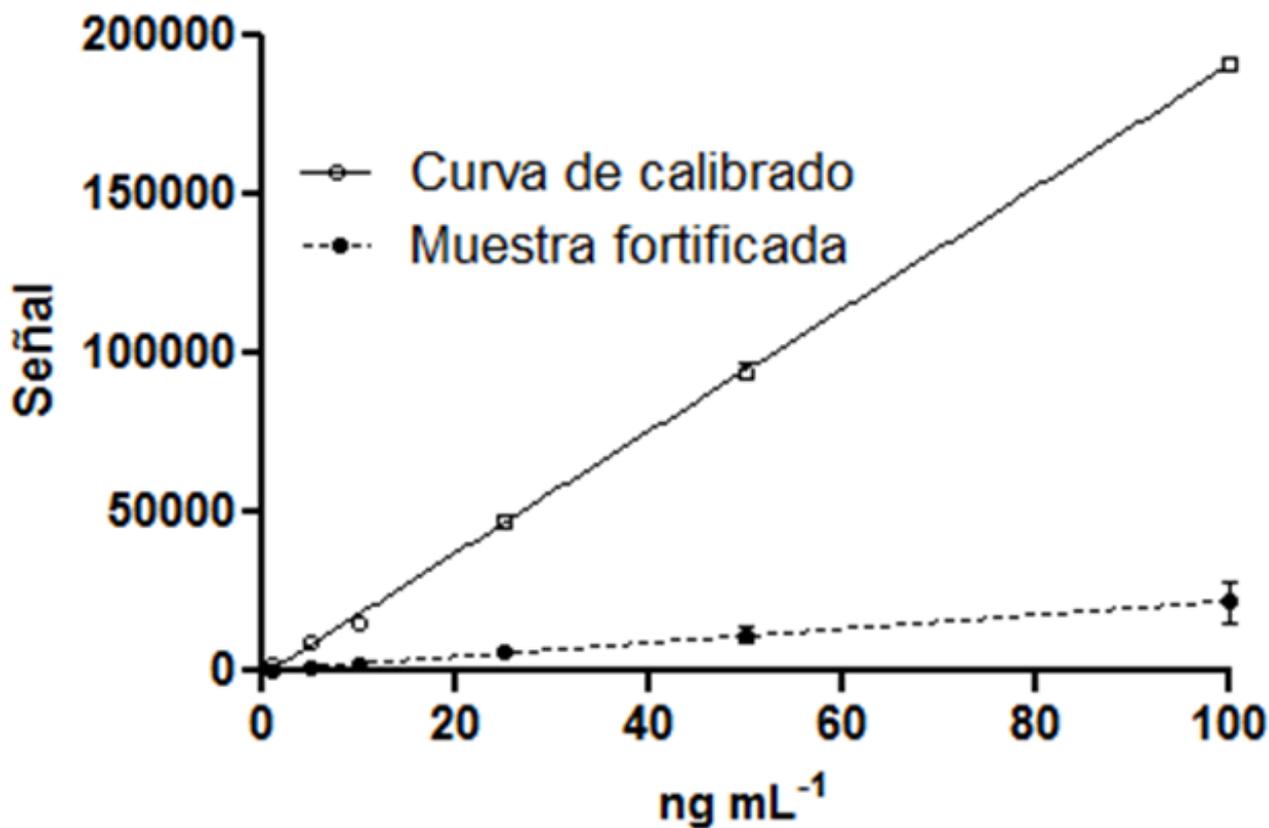
Volumen inyectado 10  $\mu$ L

# Efecto de matriz

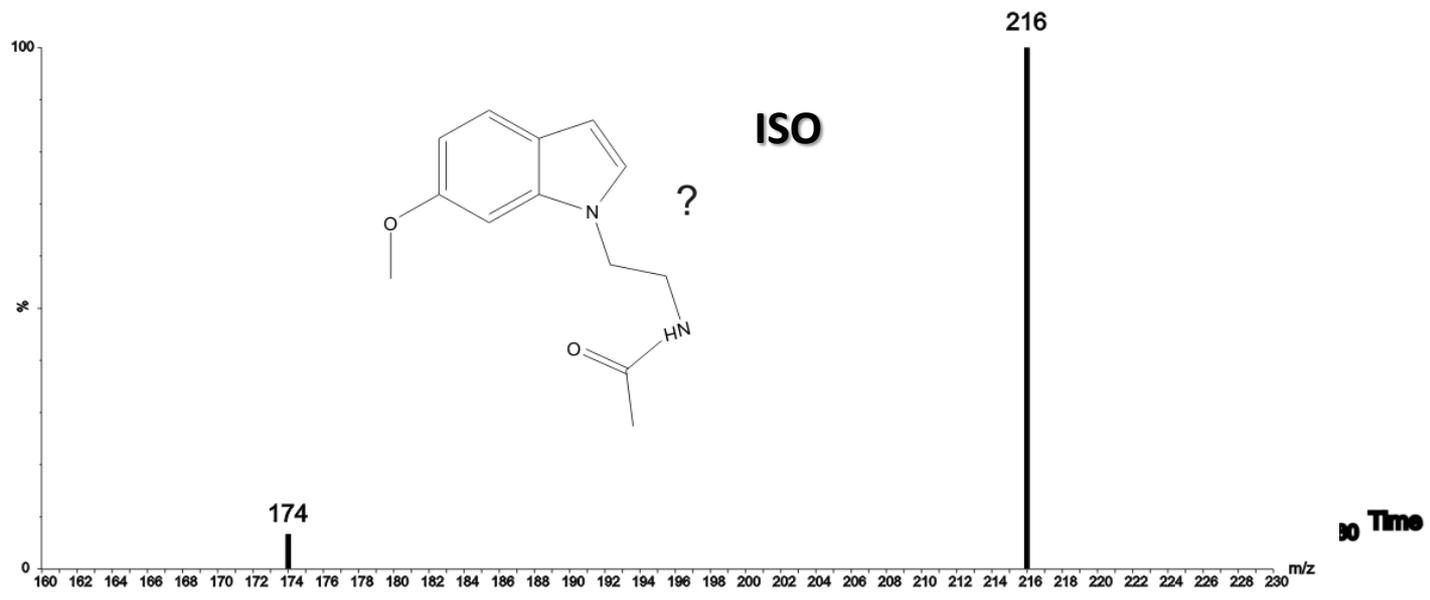
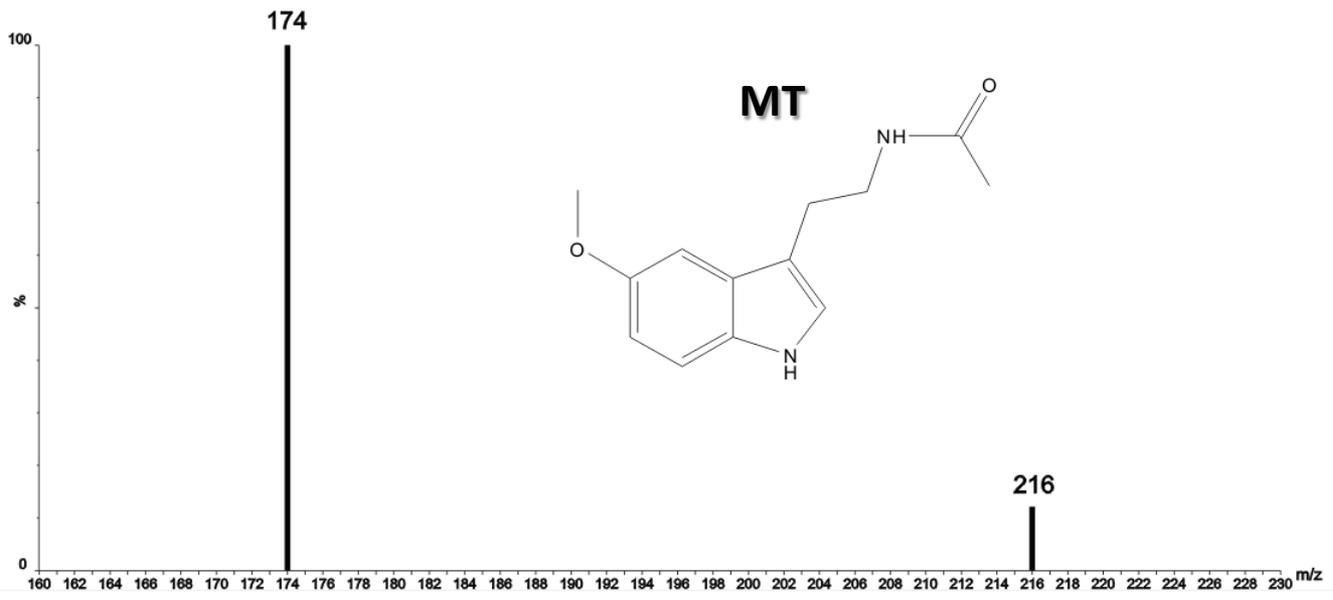
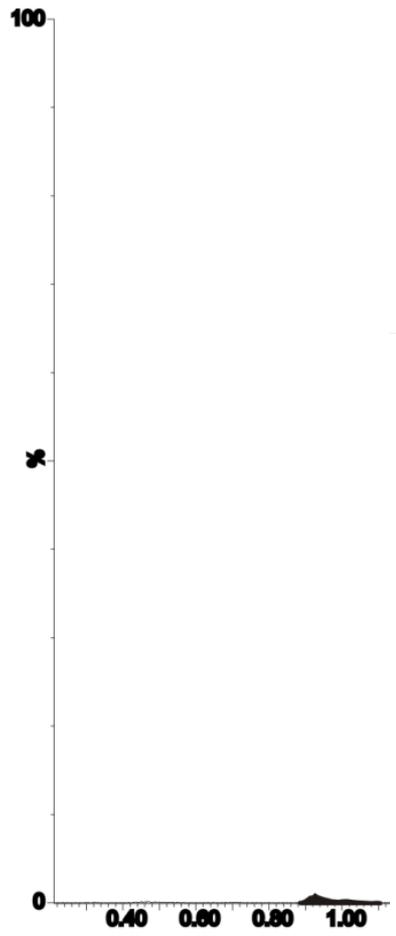
CALIBRACIÓN EXTERNA NO ES POSIBLE

70 %

$$\text{Efecto de matriz \%} = 100 - \left[ \left( \frac{b \text{ fortificada}}{b \text{ solvente}} \right) \times 100 \right]$$



# MT en vinos



# Análisis de muestras

Muestra	Concentración (ng g <sup>-1</sup> y ng mL <sup>-1</sup> )	
Vinos	MT	Isómero de MT <sup>a</sup>
Tannat	N/D	151.74±5.76
Merlot	N/D	211.28±7.92
Cabernet	N/D	185.09±5.25
Malbec 1	N/D	145.26±2.82
Malbec 2 <sup>b</sup>	N/D	60.16±4.87
Uvas		
Hollejo <sup>c</sup>	440.02±3.15	N/D
Mosto	N/D	N/D
Arabidopsis		
Hojas <sup>b</sup>	540.12±2.99	N/D
Semillas	4.91±3.27	N/D

<sup>a</sup> La concentración del isómero fue calculada a partir de la curva de calibrado de MT

<sup>b</sup> Vino producido en el laboratorio

<sup>c</sup> Expresado como peso seco

## Conclusiones Parciales

- ① Se desarrollaron metodologías analíticas para cada matriz bajo estudio
- ② Las condiciones experimentales óptimas dependen marcadamente de la matriz (vino, mosto, tejido vegetal)
- ③ A pesar de lo reportado en la bibliografía, no se detectó MT en vinos terminados. En su lugar se identificó un isómero, cuya biosíntesis ocurriría durante la fermentación

# Monitoreo de melatonina desde la uva hasta el vino



# Microvinificación



🎯 Ensayo 1: Mosto + Levadura

🎯 Ensayo C (control): Agua + Nutrientes + Levadura

🎯 Ensayo Trp: Agua + Nutrientes + Levadura + L-Trp ( $500 \text{ ng L}^{-1}$ )

🎯 Ensayo MT: Agua + Nutrientes + Levadura + MT ( $100 \text{ ng L}^{-1}$ )

🕒 Se tomaron muestras cada 24 horas

# Experimental



🕒 Se tomaron muestras cada 24 horas



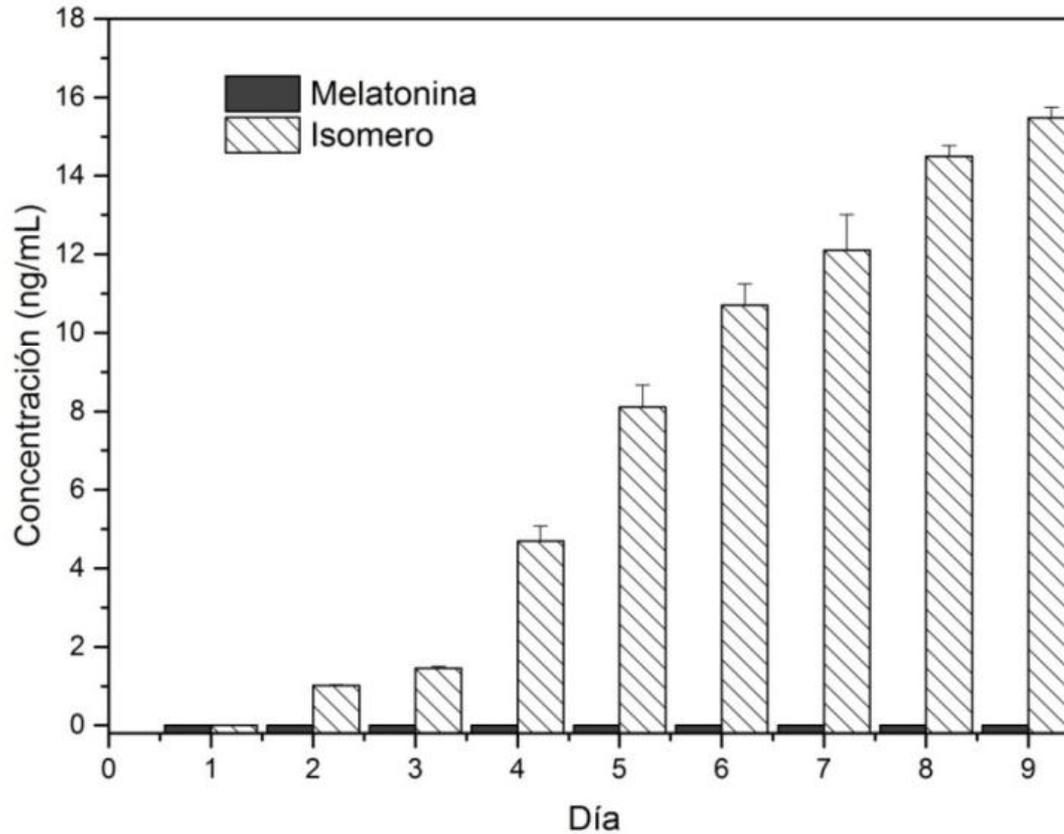
SPE



C<sub>18</sub> (+)ESI

# Evolución de MT y su isómero

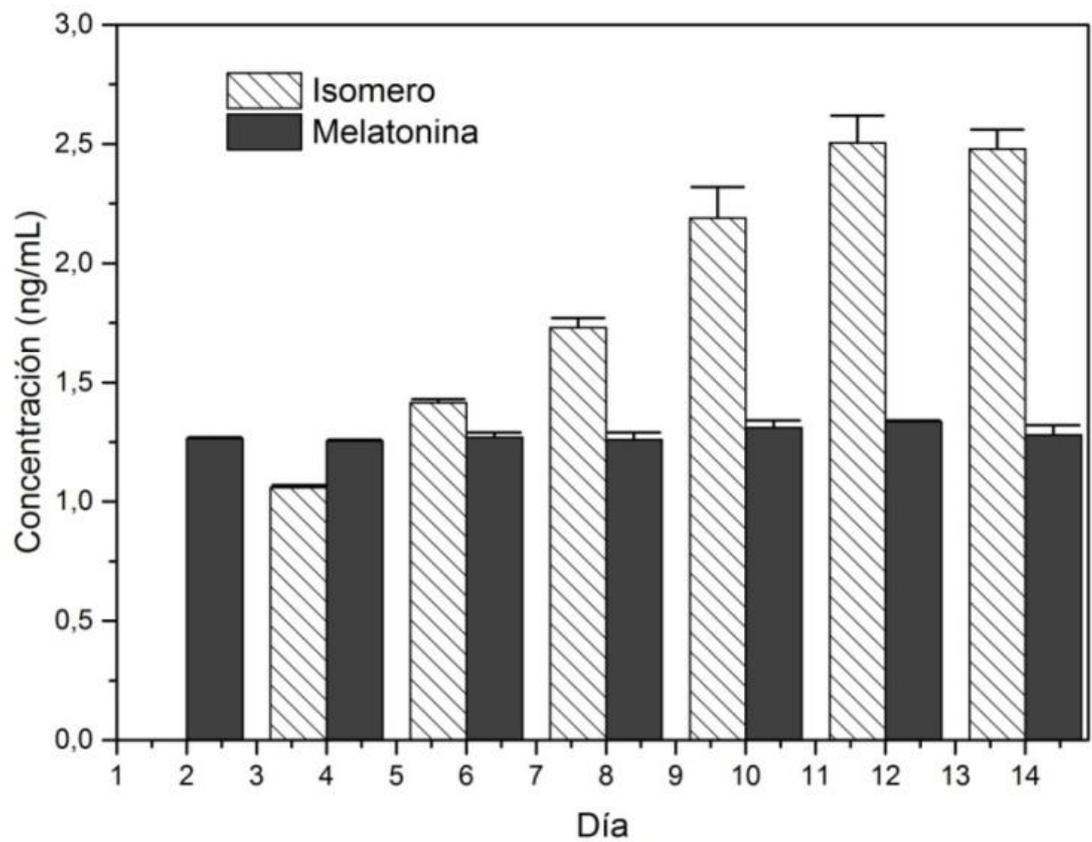
## © Ensayo 1: Mosto + Levadura



Condiciones: EC1118 (20 g h/L), 250 mL mosto. Las barras indican error estándar de la media (n=3).

# Evolución de MT y su isómero

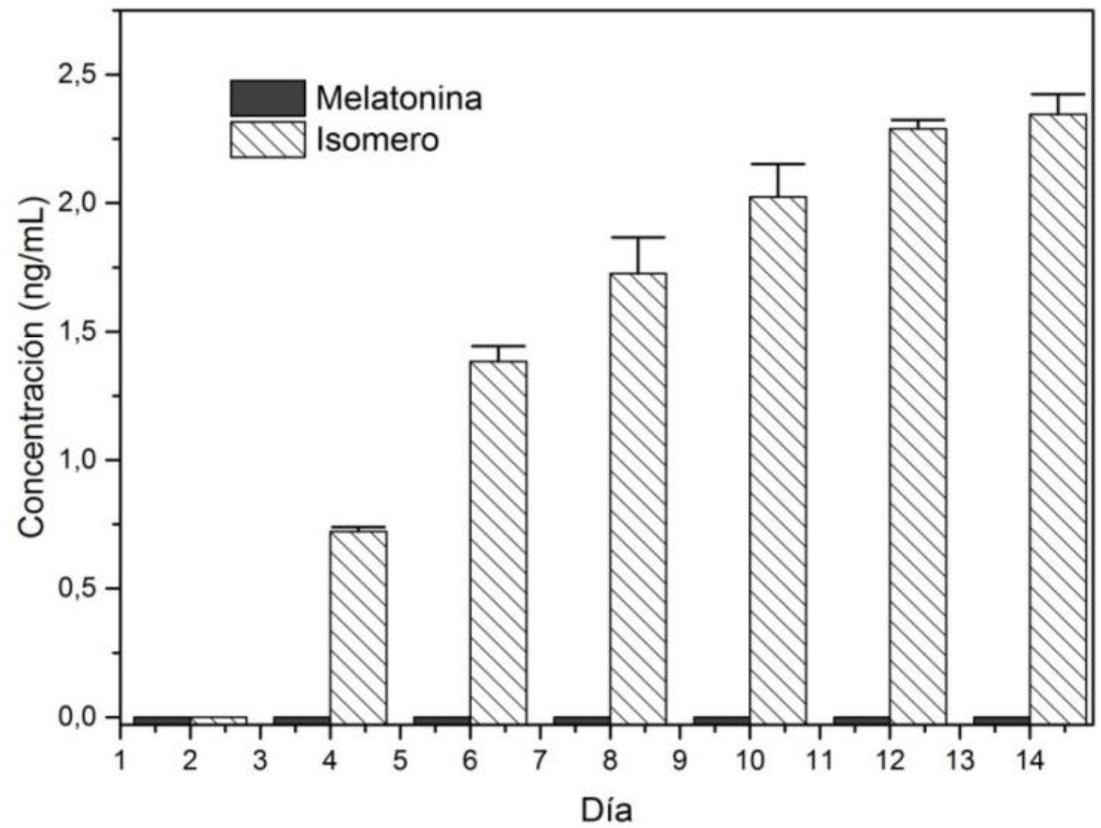
© Ensayo C (control): Agua + Nutrientes + Levadura



Condiciones: EC1118 (20 g h/L), sacarosa (250 g/L), Hakaphos R™ (1 g/L), 200 mL de agua destilada. Las barras indican error estándar de la media (n=3).

# Evolución de MT y su isómero

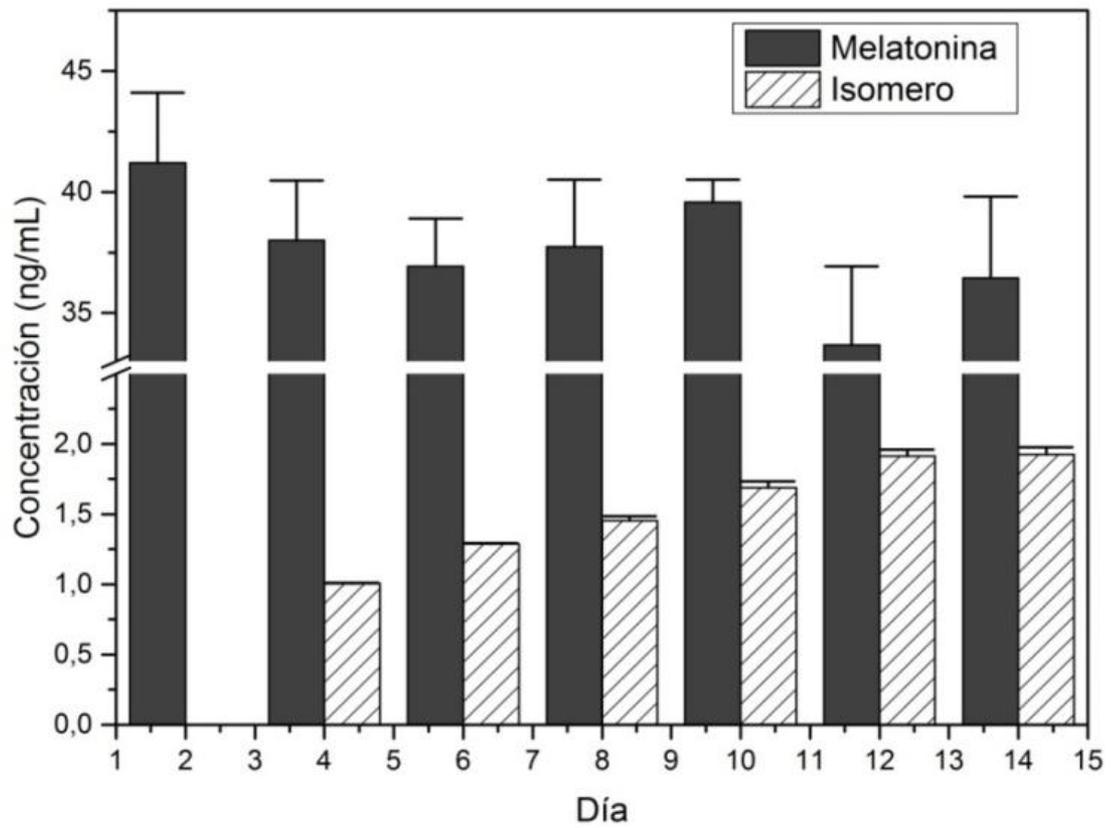
© Ensayo Trp: Agua + Nutrientes + Levadura + L-Trp (500 ng L<sup>-1</sup>)



Condiciones: EC1118 (20 g h/L), sacarosa (250 g/L), Hakaphos RTM (1 g/L), L-Trp (500 ng/mL), 200 mL de agua destilada. Las barras indican error estándar de la media (n=3).

# Evolución de MT y su isómero

© Ensayo MT: Agua + Nutrientes + Levadura + MT (100 ng L<sup>-1</sup>)



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 error estándar de la media (n=3).

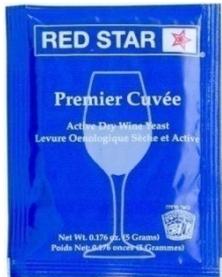
## Conclusiones Parciales

- ① *Saccaromyces* juega un rol crucial en la producción de melatonina y su isómero
- ② Se observó que triptófano (precursor de MT) estimula la síntesis del isómero en vinos
- ③ Se necesitan futuros estudios para confirmar la estructura del isómero encontrado y comprender el rol de las levaduras en la producción de MT y sus isómeros

# Estudio del efecto de las levaduras y el estrés sobre el contenido de melatonina en vinos



# Microvinificación



FCA32

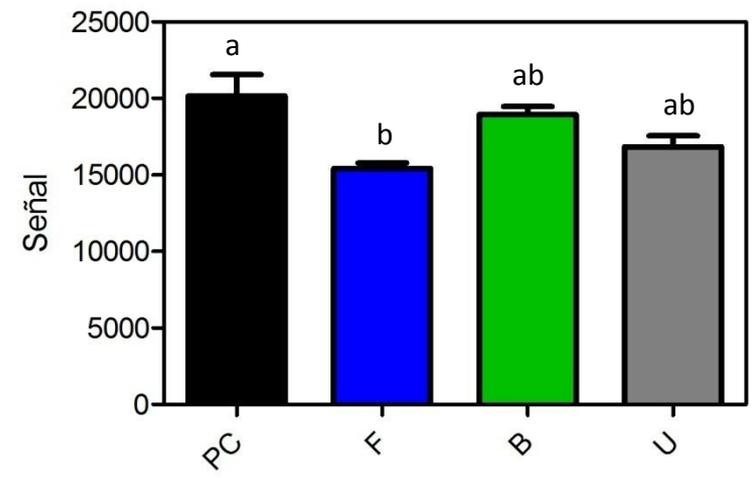
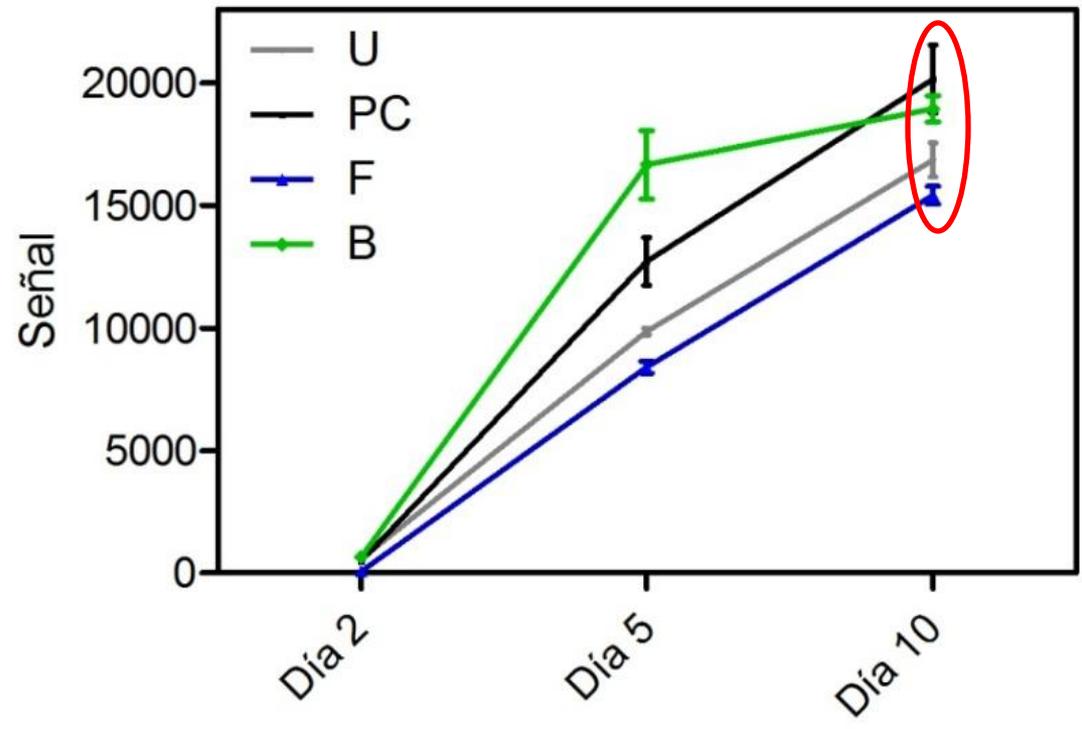


- ① Mosto + Levadura autóctona FCA 32 (**F**, *Saccharomyces cerevisiae*)
- ① Mosto + Levadura Red Star Premier Cuvée (**PC**, *Saccharomyces bayanus*)
- ① Mosto + Levadura Springer Enologie BC S103 (**B**, *Saccharomyces cerevisiae var bayanus*)
- ① Mosto + Levadura Springer Enologie UCLM S377 (**U**, *Saccharomyces cerevisiae var bayanus*)
- 🕒 Se tomaron muestras durante el proceso

# Evolución del isómero



Levaduras

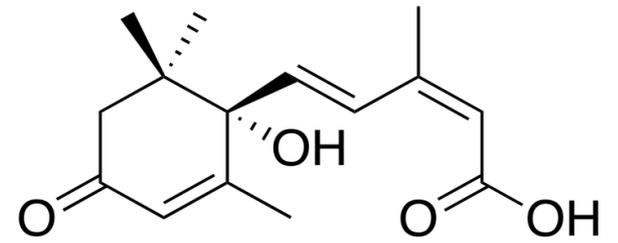


# Experimental

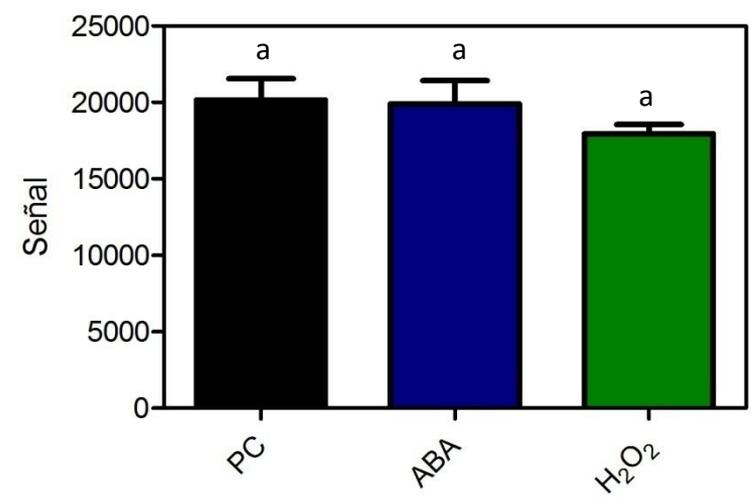
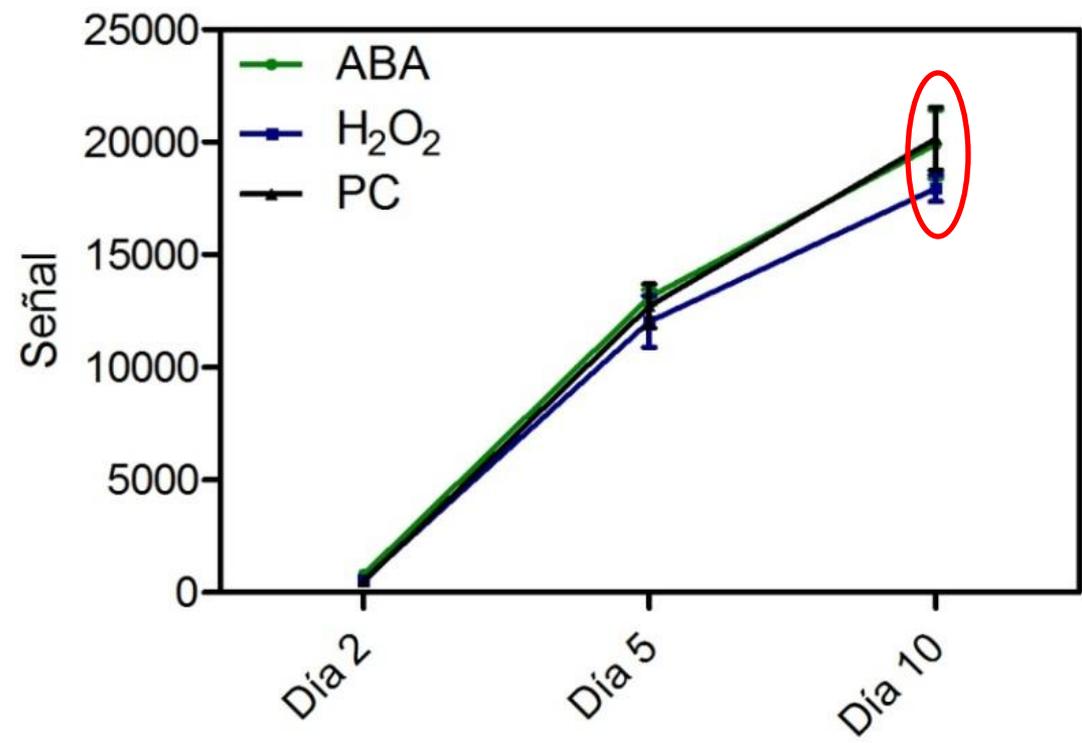


- ⊙ Mosto + levadura **PC** + 0,75 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$
- ⊙ Mosto + levadura **PC** + 100 mM de ABA
- ⊙ Medio + levadura **PC** + 10 mg  $\text{L}^{-1}$  de Hg
- ⊙ Medio + levadura **PC** + fermentación a 10, 25 y 35°C
- ⊙ Medio + levadura **PC** + 100 mg  $\text{L}^{-1}$  de 5-HT
- 🕒 Se tomaron muestras durante el proceso

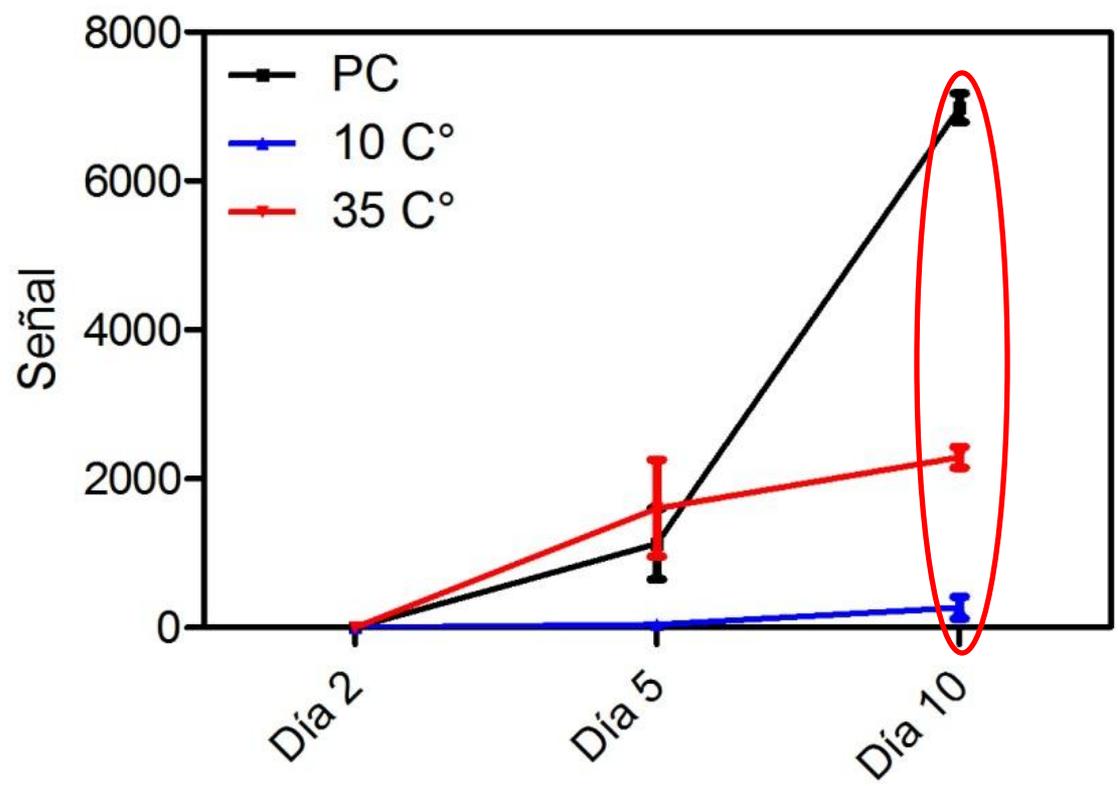
# Evolución del isómero



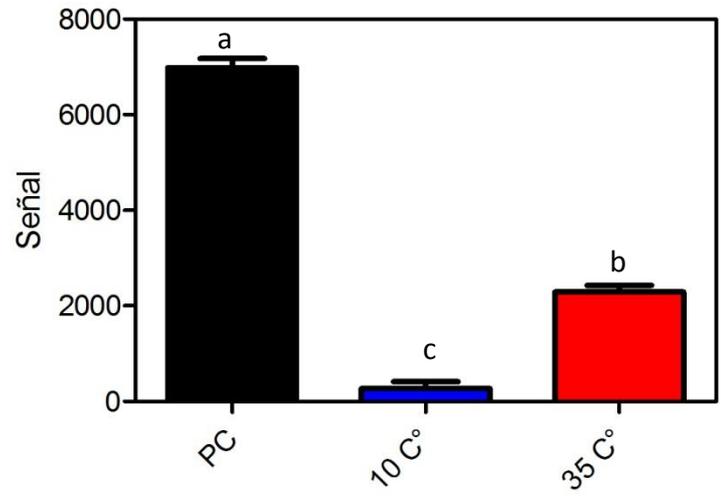
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y ABA



# Evolución del isómero



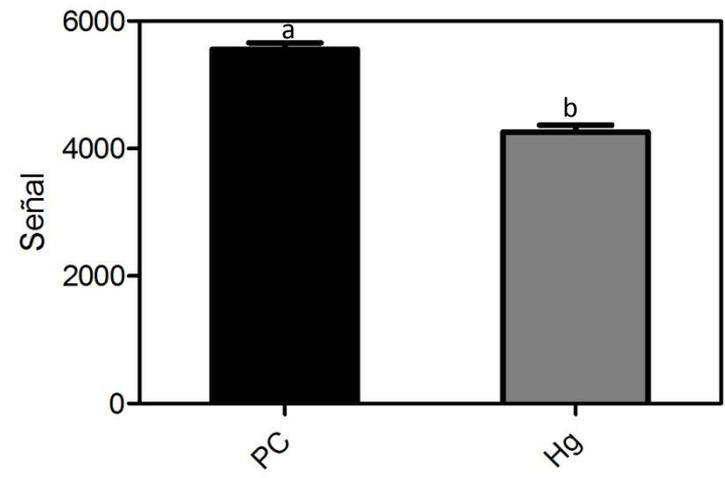
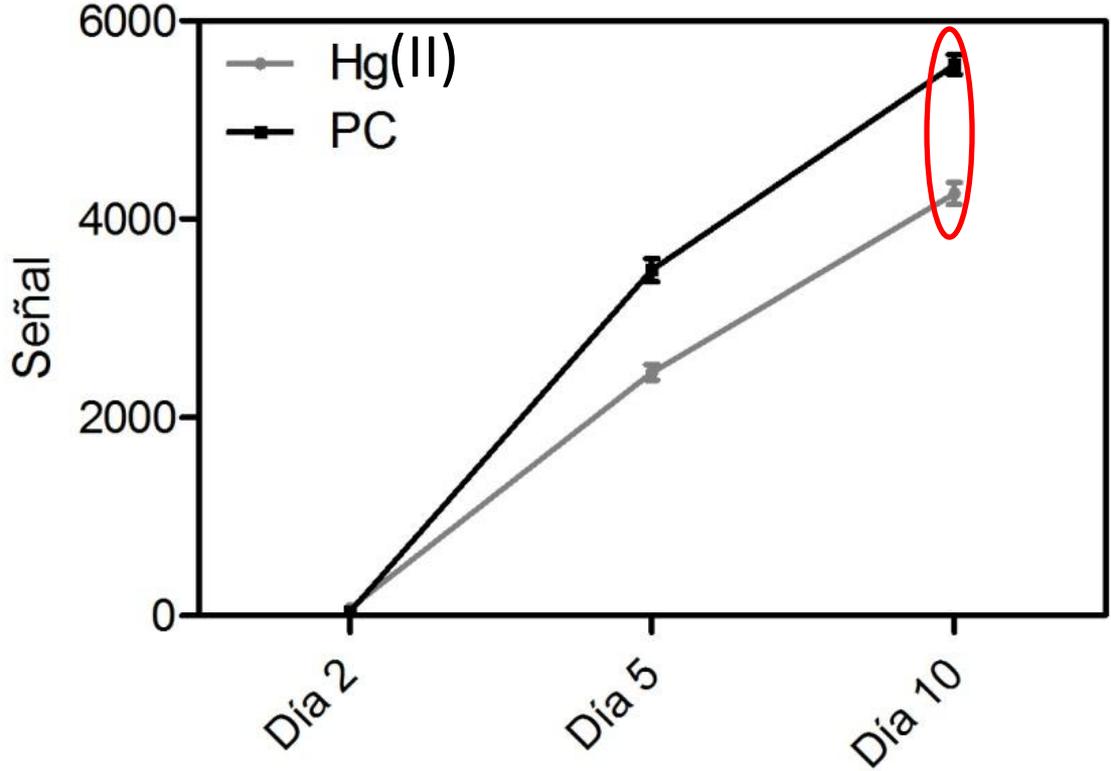
## Temperatura



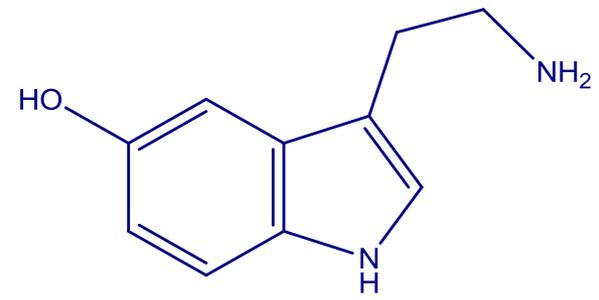
# Evolución del isómero



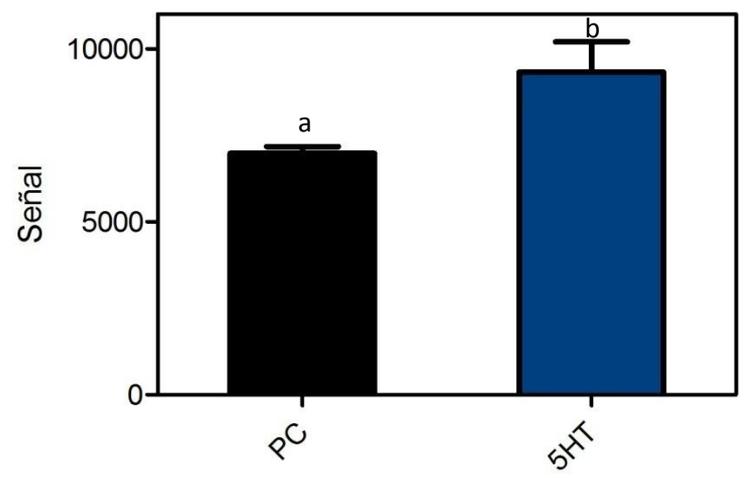
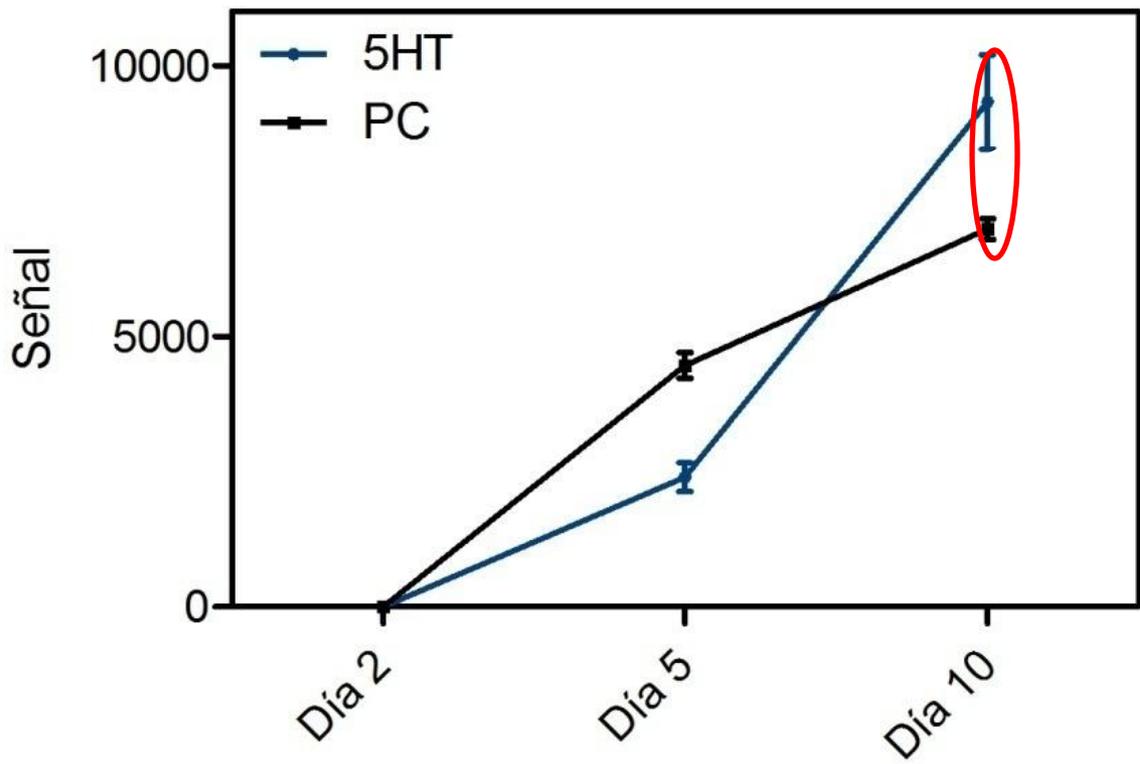
## Metales



# Evolución del isómero



Serotonina



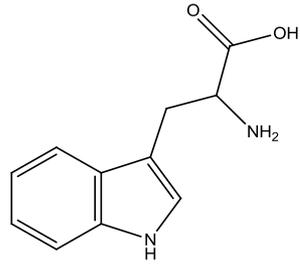
## Conclusiones Parciales

- ① Los diferentes tipos de levaduras evaluadas no mostraron diferencias significativas en la biosíntesis de MT y su isómero
- ② MT no fue detectada en ninguno de los ensayos llevados a cabo, solo se encontró el isómero de MT descrito en las secciones anteriores
- ③ Los diferentes tipos de estrés estudiados afectaron el comportamiento de las levaduras sobre la concentración final del isómero

# Desarrollo de una metodología mediante SPE-CE-UV para la determinación de melatonina y sus precursores



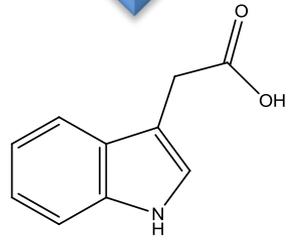
# Biosíntesis



Triptófano(Trp)



Serotonina  
(5-HT)

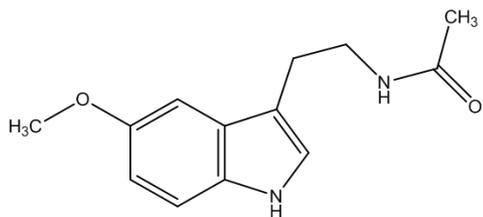


Ácido indol acético  
(AIA)

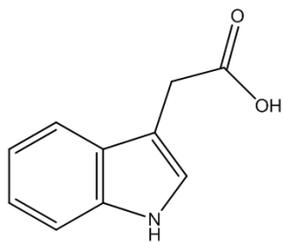


Melatonina  
(MT)

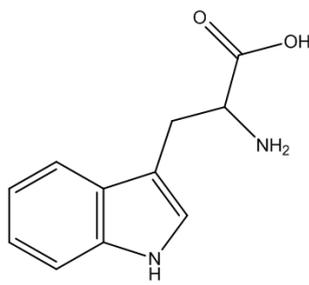
# Optimización



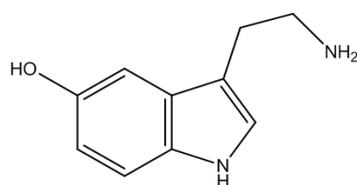
**MT**  
**pKa = 15.8**



**AIA**  
**pKa = 4.7**



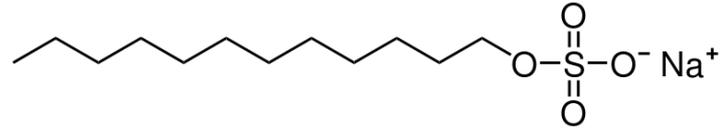
**Trp**  
**pKa<sub>1</sub> = 2.4**  
**pKa<sub>2</sub> = 9.4**



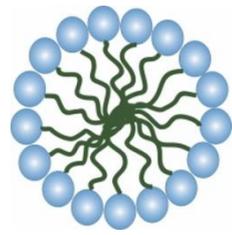
**(5-HT)**  
**pKa = 9.8**



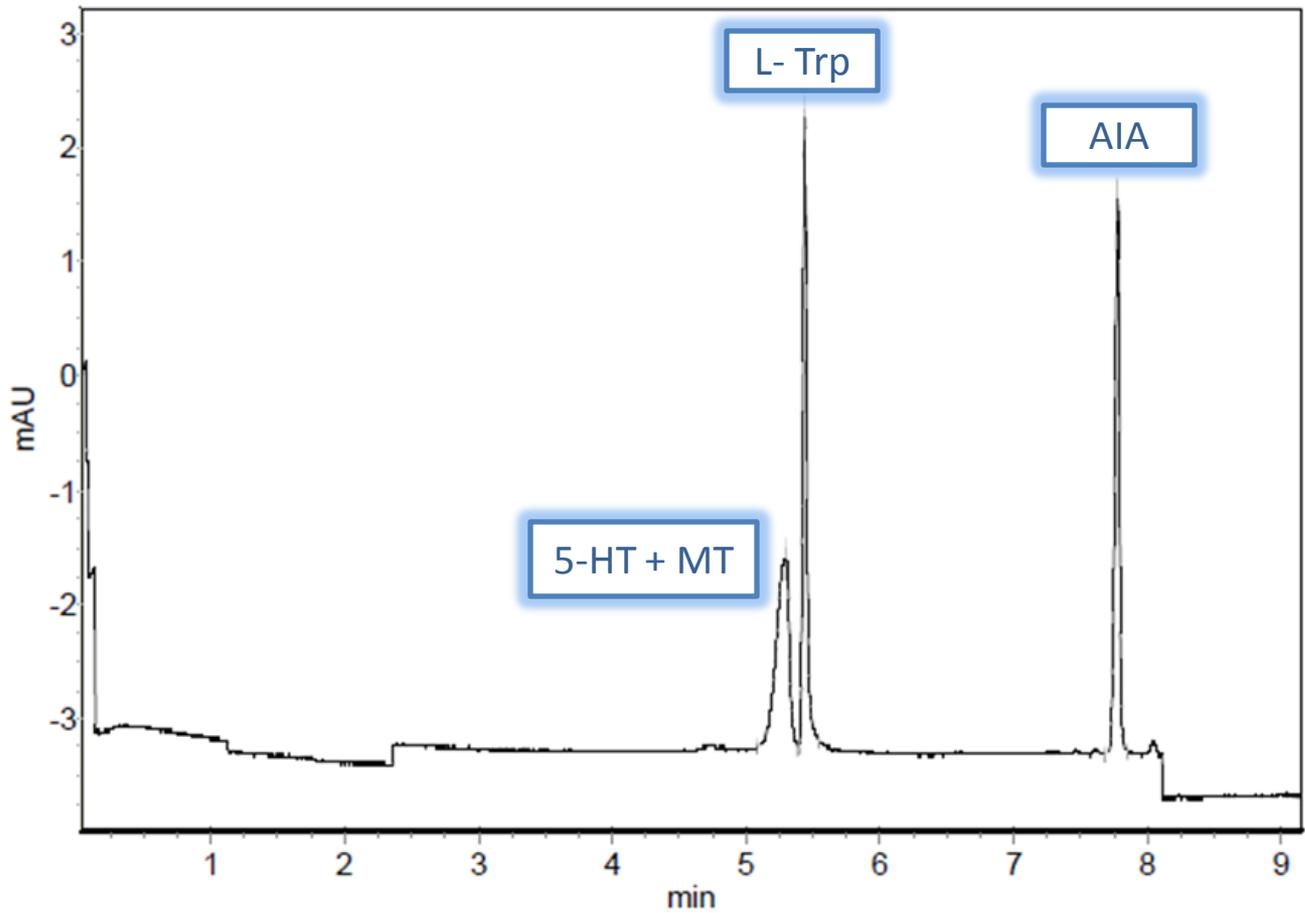
# Optimización



SDS

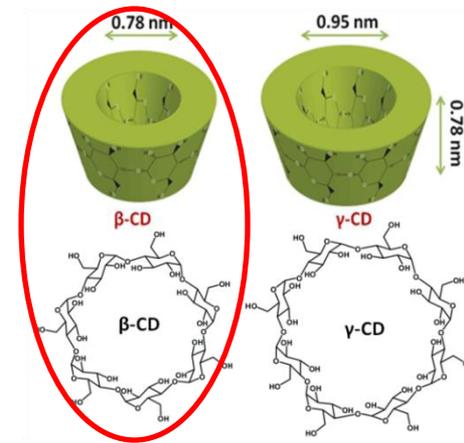
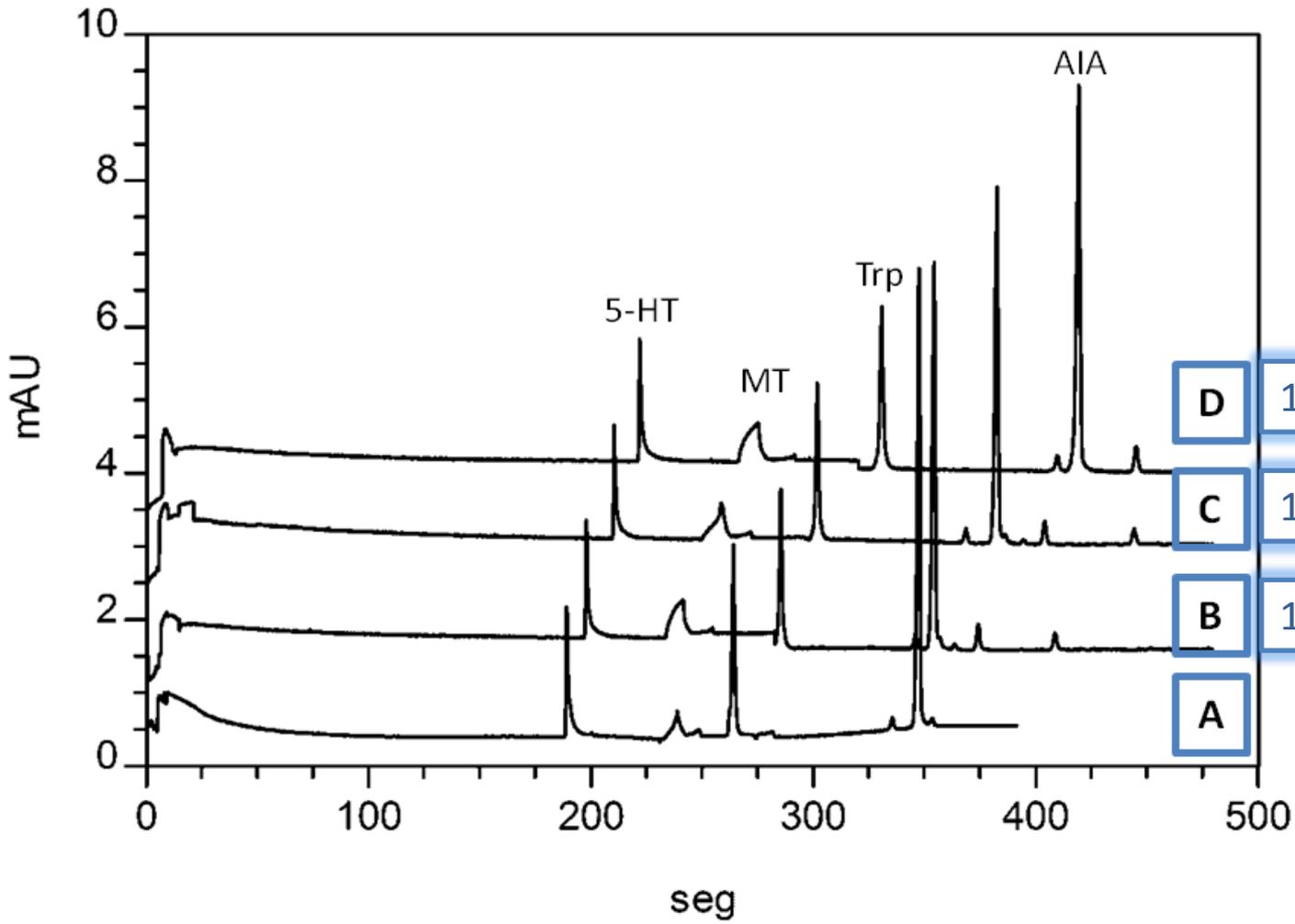


MEKC



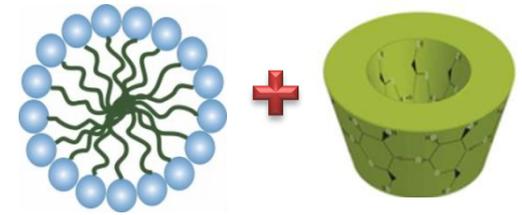
EPG mezcla de estándares (5 mg L<sup>-1</sup>) Condiciones BGE: 10 mM de tetraborato de sodio, pH 9,50 con 20 mM de SDS y 10 % ACN (v/v), capilar: 57 cm de largo total, 50 cm de largo efectivo, 75 µm de diámetro interno y 375 µm de diámetro externo; inyección hidrodinámica 30 mbar, 3 s; voltaje de separación 20 kV; la temperatura se mantuvo a 25 °C, detección a 220 nm.

# Optimización

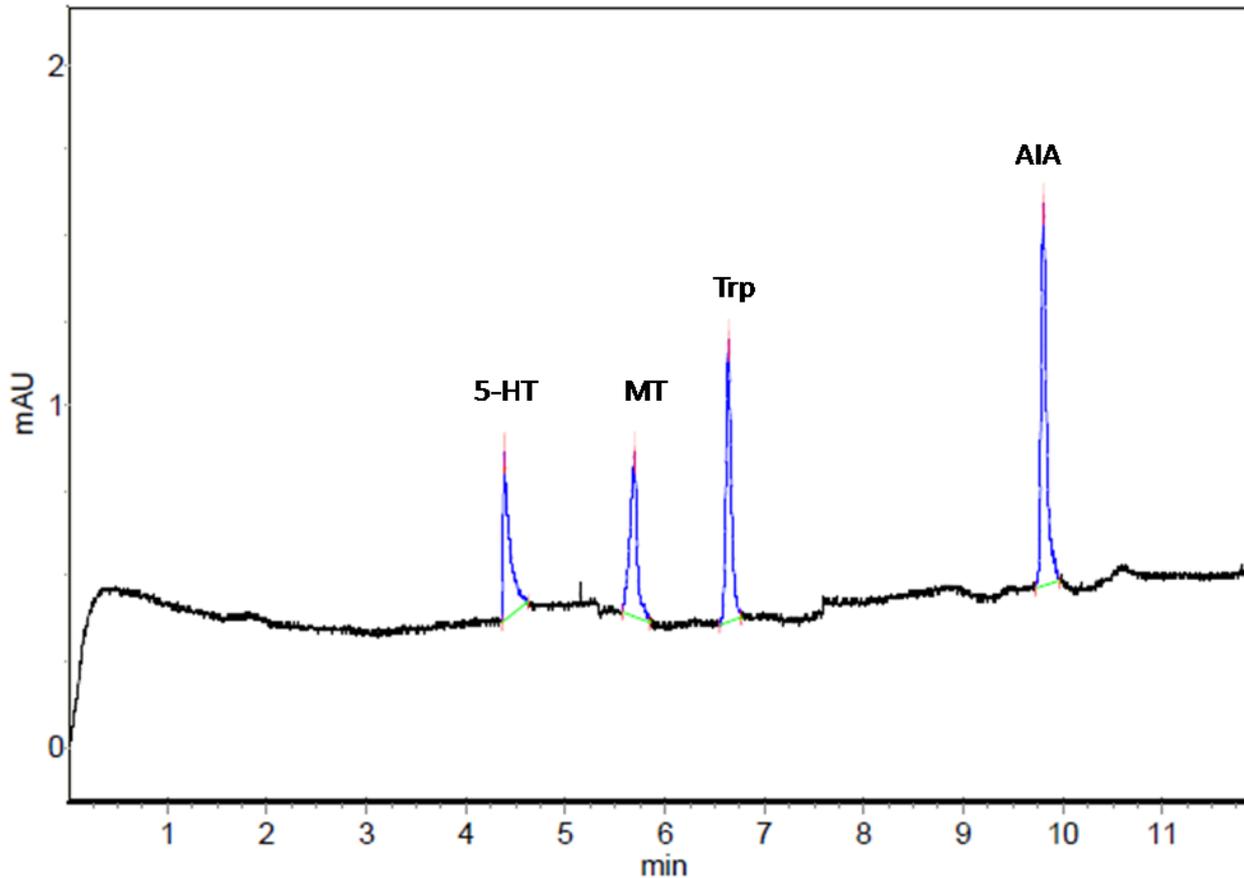


CD-CE

EPG mezcla de estándares (5 mg L<sup>-1</sup>). Condiciones BGE: 10 mM de tetraborato de sodio, pH 9,20 con 20 mM b-CD. A) Sin modificador orgánico, B) ACN 10% (v/v), C) MeOH 10% (v/v) y D) IPA 10% (v/v).



CD-MEKC



EPG mezcla de estándares de  $1 \text{ mg L}^{-1}$  mediante CD-MEKC. Condiciones: BGE: 10 mM de tetraborato de sodio, pH 9,20 con 20 mM  $\beta$ -CD, 20 mM de SDS y ACN 10% (v/v).

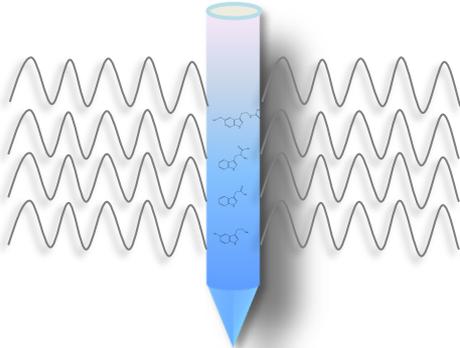
# Síntesis del proceso de Optimización

	Variable	Intervalo	Condición óptima
BGE	pH	8,00 – 10,50	9,20
	Agente buffer	Tetraborato de Sodio / Acido Bórico 5 – 20 mM	Tetraborato de Sodio 10 mM
	SDS	10 – 50 mM	20 mM
	Ciclodextrina	$\beta$ -CD/ $\gamma$ -CD 10 – 30 mM	$\beta$ -CD 20 mM
	Solvente orgánico	MeOH – ACN – IPA 5 – 15 % (v/v)	ACN 10 % (v/v)
Condiciones de CE	Voltaje	15-25 kV	20 kV
	Inyección hidrodinámica	2-7 s 10-30 mbar	3 s 30 mbar
	Temperatura del Capilar	15-30 °C	25 °C
	Longitud de onda	200-300 nm	220 nm

# Experimental



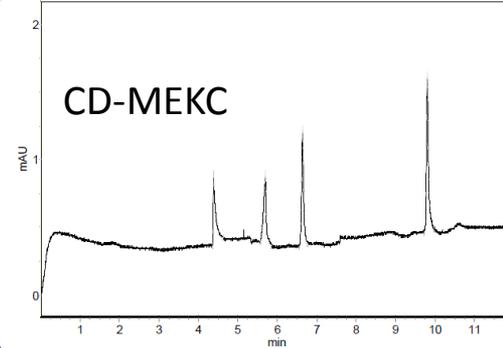
Tejido liofilizado y  
homogenizado con N(l)



Ultra Sonido



SPE C<sub>8</sub>, C<sub>18</sub>, Strata X



# Parámetros analíticos

	Tiempo de migración		Área de pico	
	Repetibilidad RSD(%)	Reproducibilidad RSD(%)	Repetibilidad RSD(%)	Reproducibilidad RSD(%)
5-HT	0.52	1.91	6.14	9.23
MT	2.49	2.02	4.74	5.55
Trp	3.40	6.16	2.27	8.73
AIA	0.22	3.84	4.28	5.57

	LOD (ng/g)	LOQ (ng/g)	N	FE
5-HT	4.16	13.86	331634	16.74
MT	0.79	2.62	60168	88.56
Trp	0.72	2.41	228017	94.34
IAA	0.55	1.83	251023	126.56

N: Número de platos teóricos; FE: Factor de enriquecimiento

# Análisis de muestras



*Camellia sinensis* (Té)



*Tilia cordata* (Tilo)



*Arabidopsis thaliana*

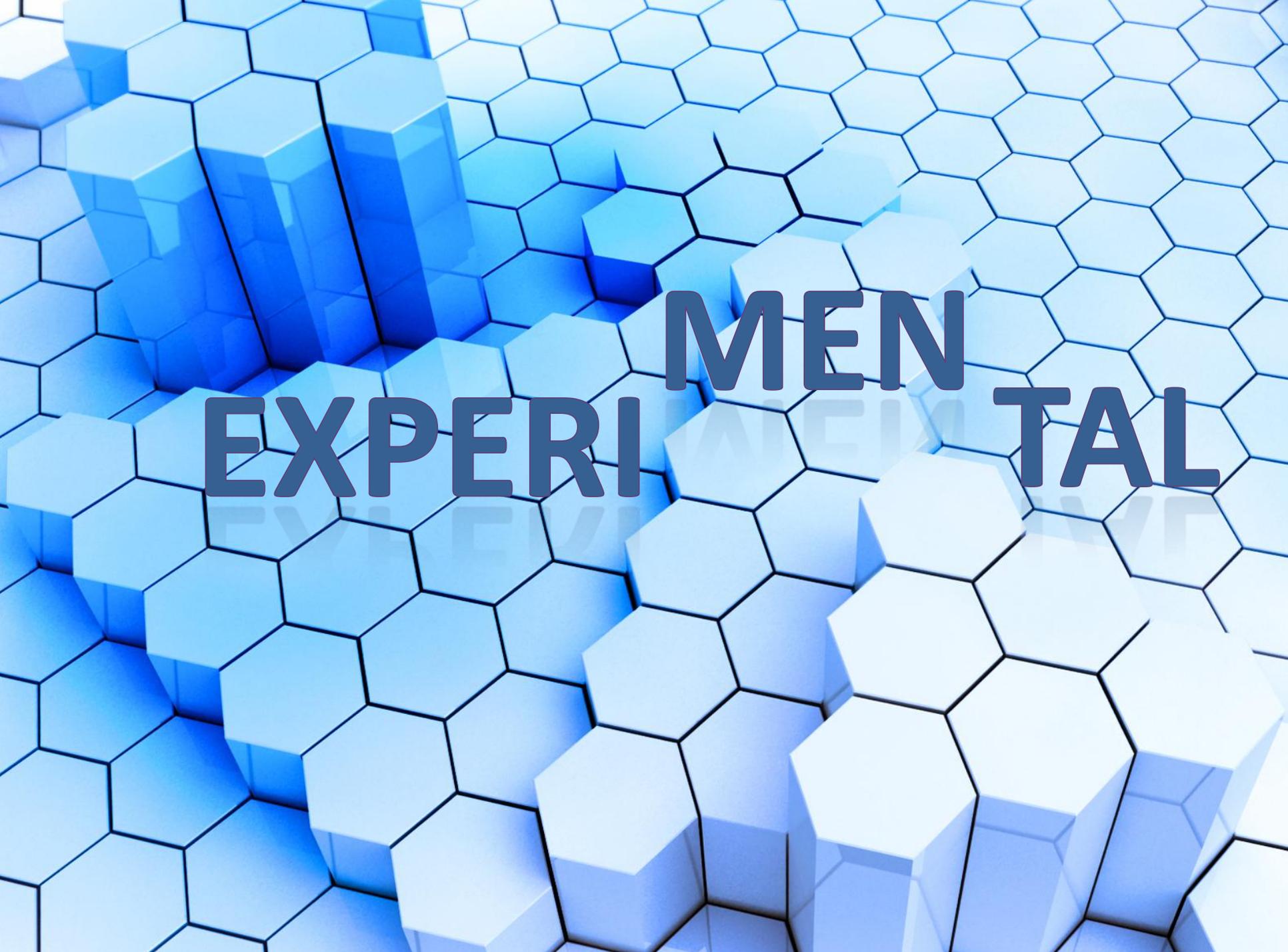
	5-HT (ng g <sup>-1</sup> )	MT (ng g <sup>-1</sup> )	Trp (ng g <sup>-1</sup> )	IAA (ng g <sup>-1</sup> )
<i>Camellia sinensis</i>	ND	386,25 ± 20.91	671,48 ± 19.76	ND
<i>Tilia cordata</i>	ND	410,81 ± 16.25	993,54 ± 9.32	542,81 ± 10.05
<i>Arabidopsis</i>	166,86 ± 1.94	548,13 ± 26.21	458,68 ± 15.23	765,10 ± 19.56

## Conclusiones Parciales

- ① Se desarrolló una metodología mediante SPE seguido de CD-MEKC para la determinación de MT y analitos relacionados
- ② Se aplicó con éxito la metodología desarrollada a la determinación de los analitos bajo estudio en matrices vegetales
- ③ El método desarrollado puede ayudar a dilucidar el rol biológico de MT en plantas

# Desarrollo de un sensor electroquímico para la detección de melatonina y serotonina





# EXPERI **MEN** TAL

# ¿Por que utilizar electroquímica?

-  Costosos
-  Complejos
-  Necesidad de personal capacitado
-  Consumo elevado de solventes
-  Tiempos de análisis elevados
-  Inmunoensayos no aptos para plantas

Métodos tradicionales para MT y 5-HT



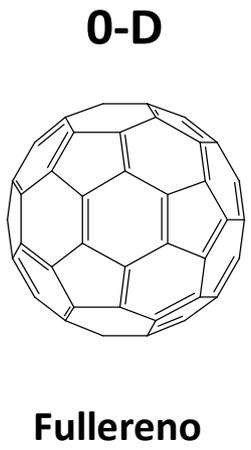
Electroquímica



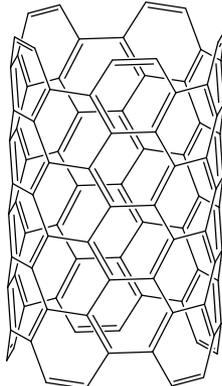
# ¿Por qué utilizar NM de Carbono?



**Premio Nobel de Física de 2010** se les otorgó a **Andréy Gueim** y a **Konstantín Novosiólov** por sus revolucionarios descubrimientos acerca de este material.

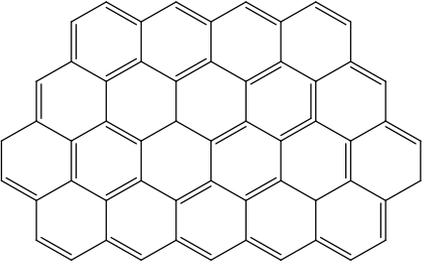


**1-D**

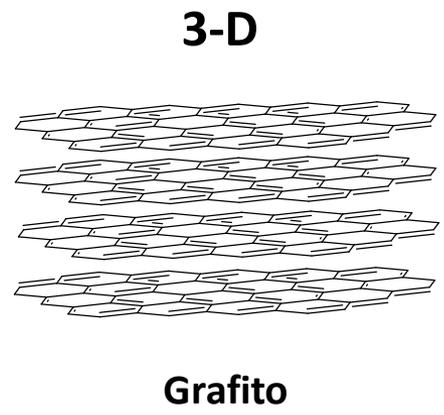


**Nanotubo**

**2-D**



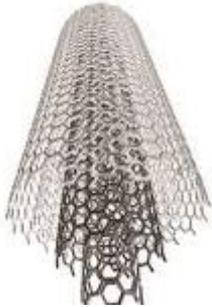
**Grafeno**



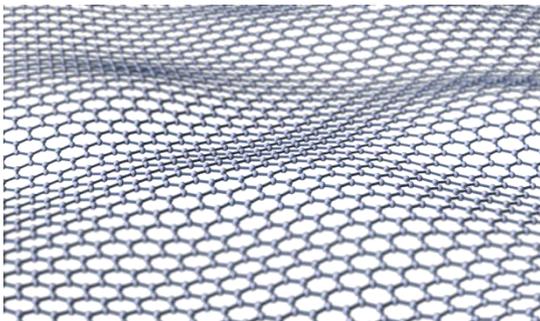
# NM de Carbono



Nanotubos de pared simple (SWCNT)



Nanotubos de pared múltiple (MWCNT)



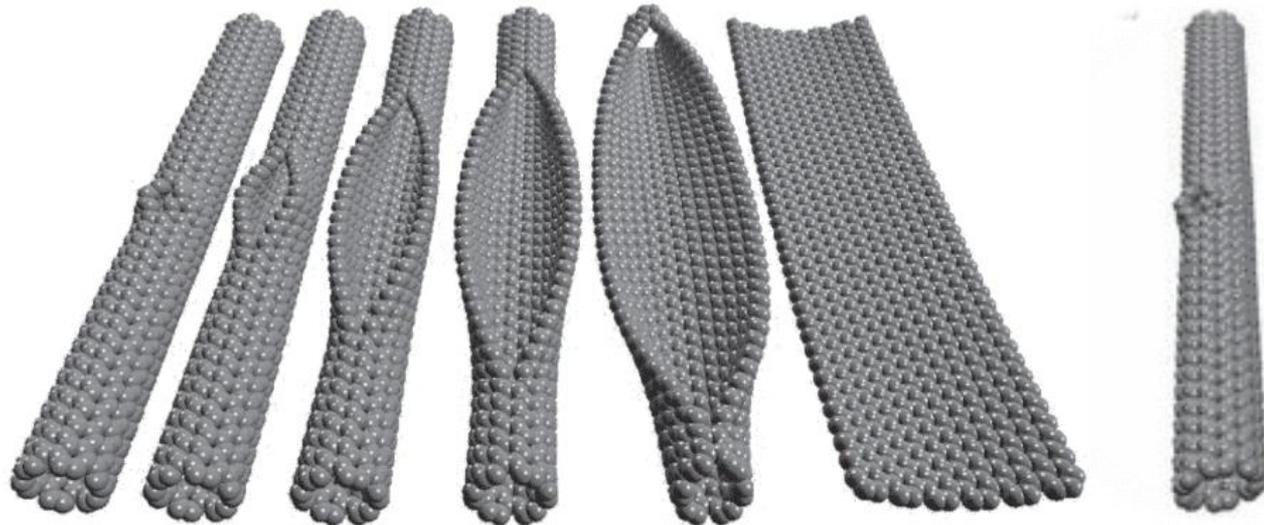
Grafeno (GF)

## ✓ ventajas:

- Gran área superficial
- Mayor número de sitios activos
- Resistencia al ensuciamiento
- Excelente conducción eléctrica y térmica
- Flexibilidad
- Resistencia mecánica



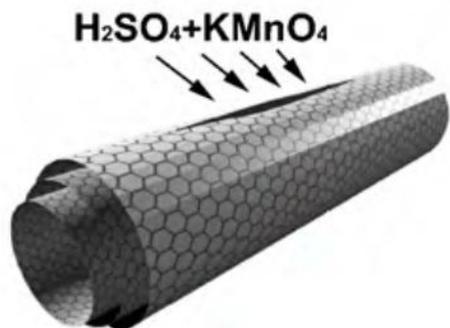
# Síntesis de grafeno



**MWCNTs**

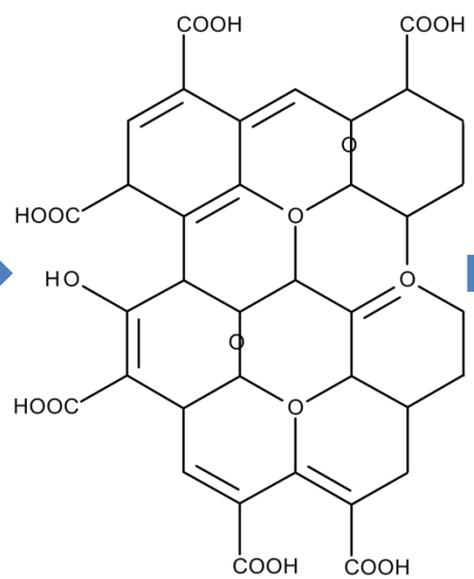
**GNRox**

**GNRred**

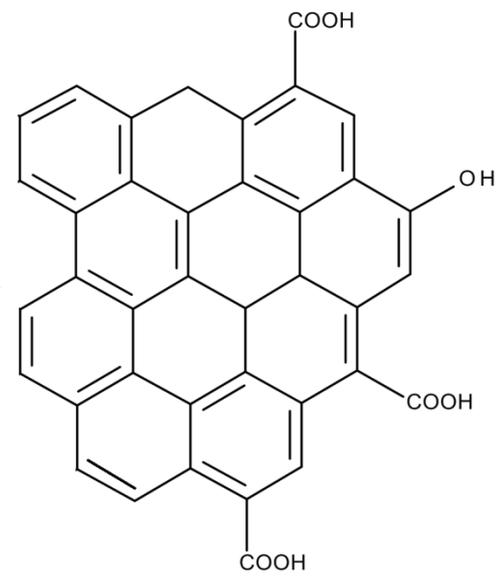


$H_2SO_4 + KMnO_4$

**Ruta**  
**Química**



$N_2H_4$   
 $NH_3$



**wt. % Oxígeno**

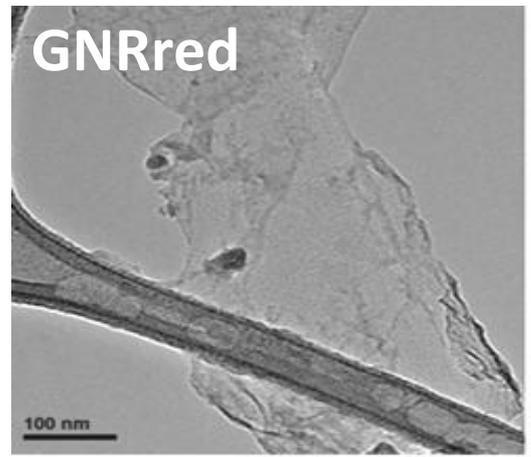
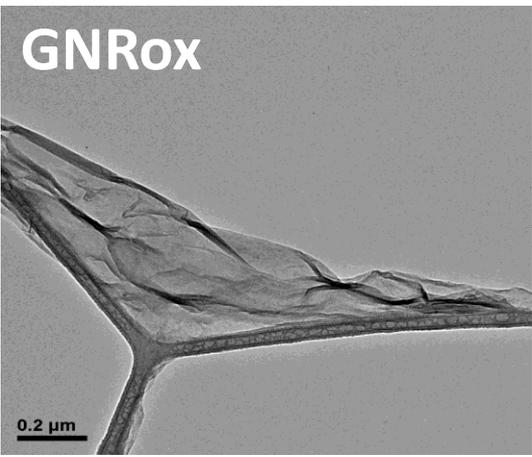
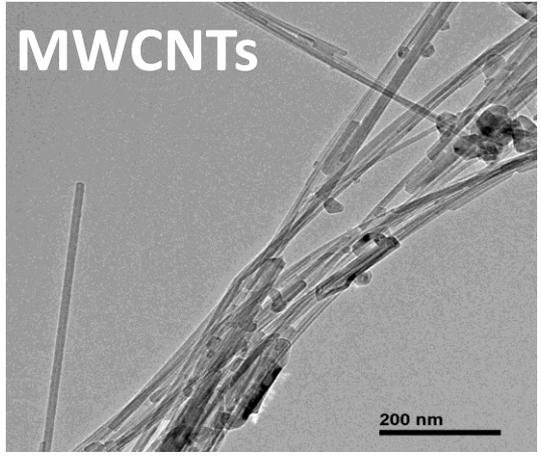
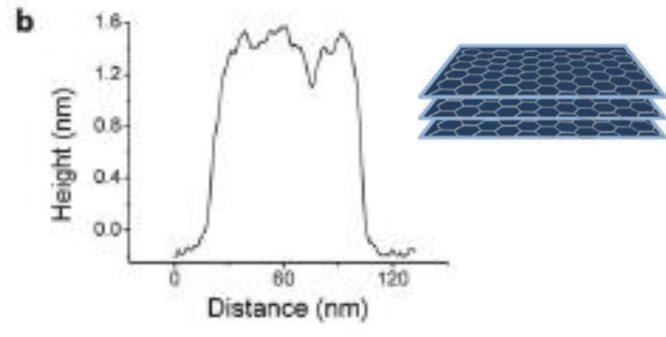
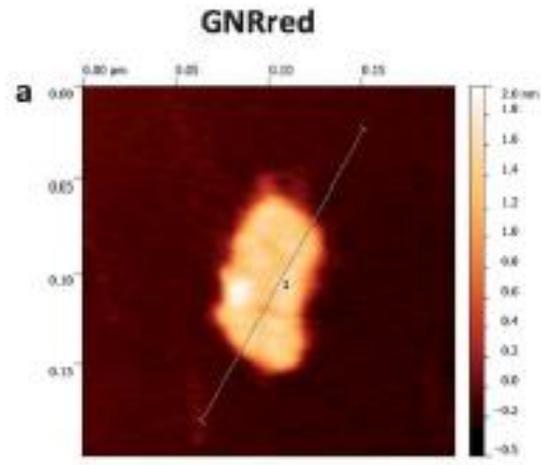
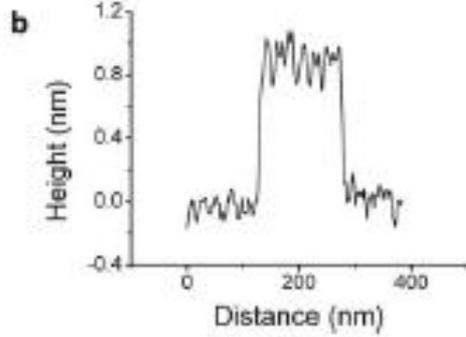
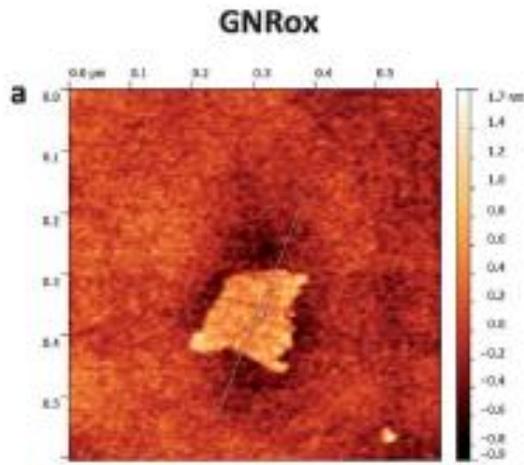
**44%**

**14%**

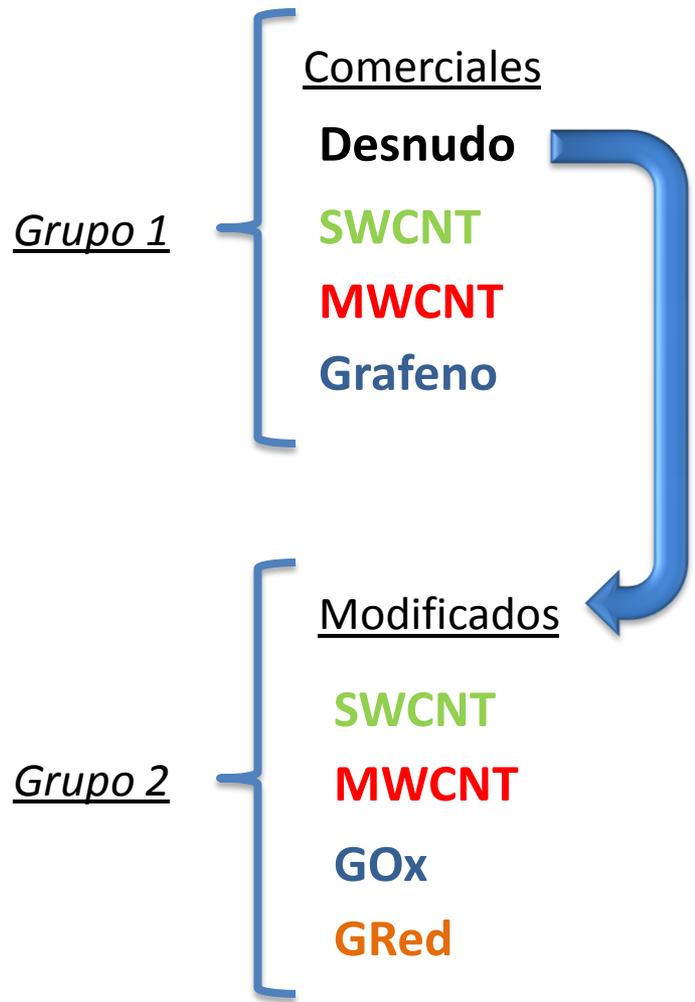
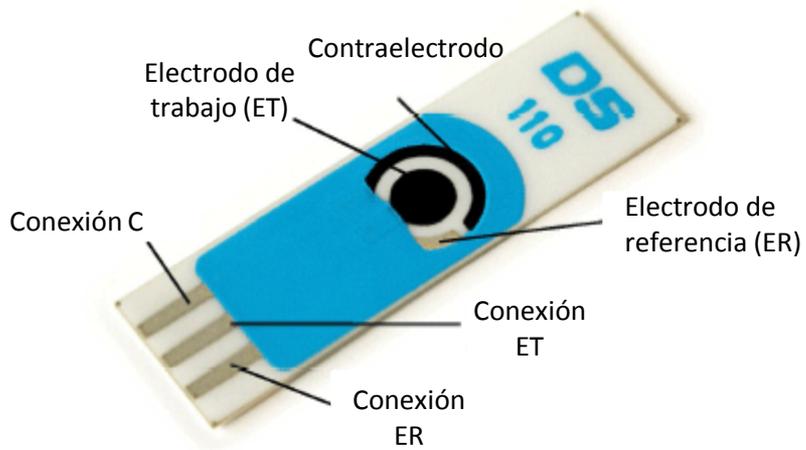
# Caracterización previa

AFM

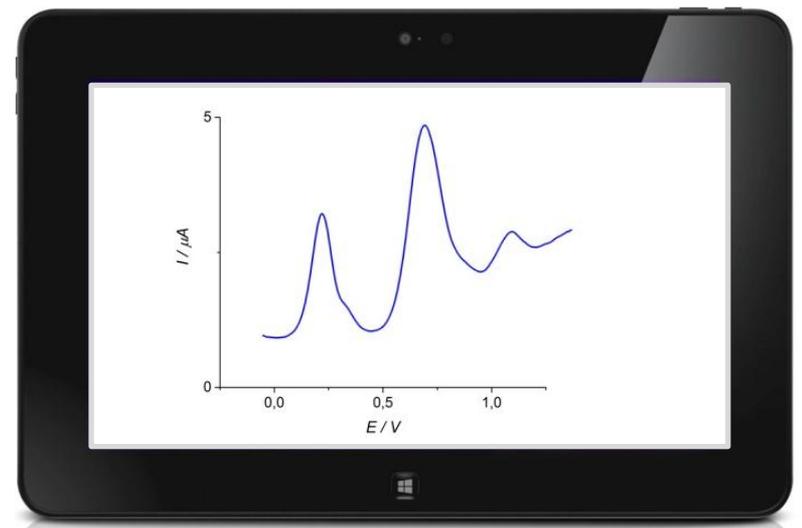
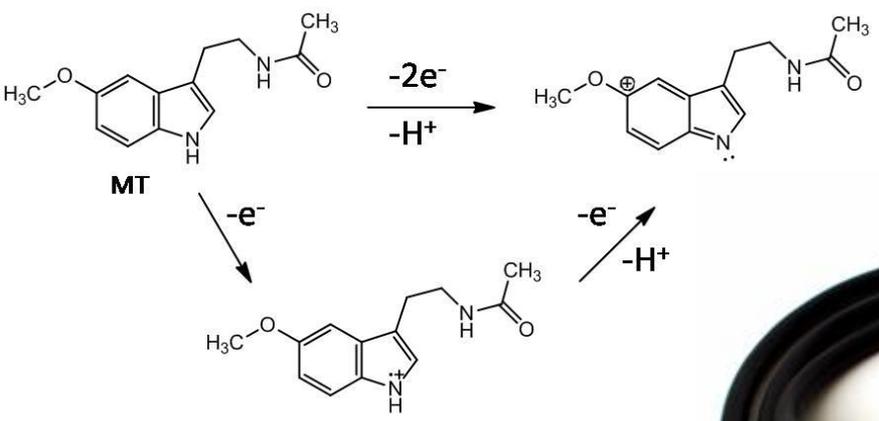
TEM



# Electrodos



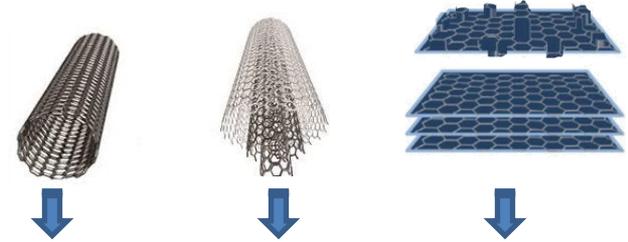
# Medida electroquímica



# Modificación Electrodo

0,5 mg/mL

SWCNT    MWCNT    GF ox y red

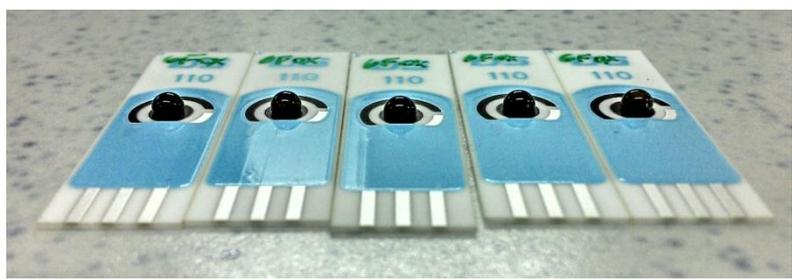


1h US

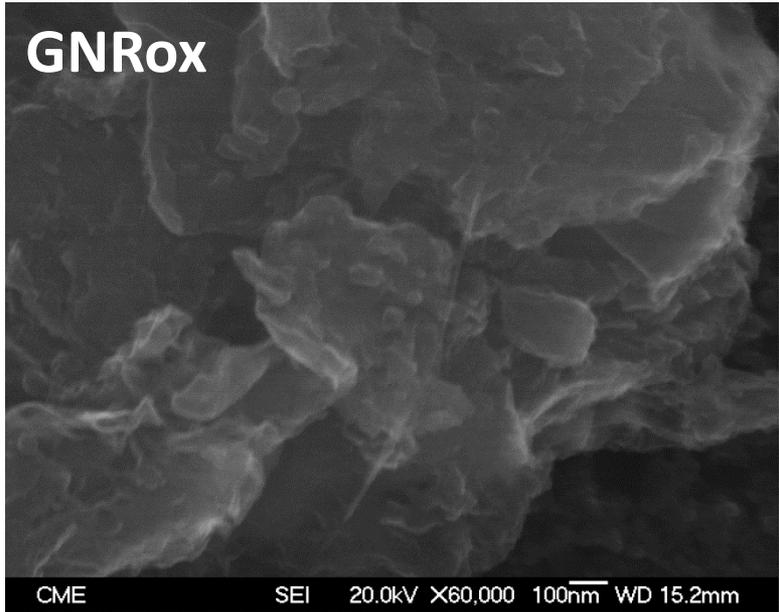
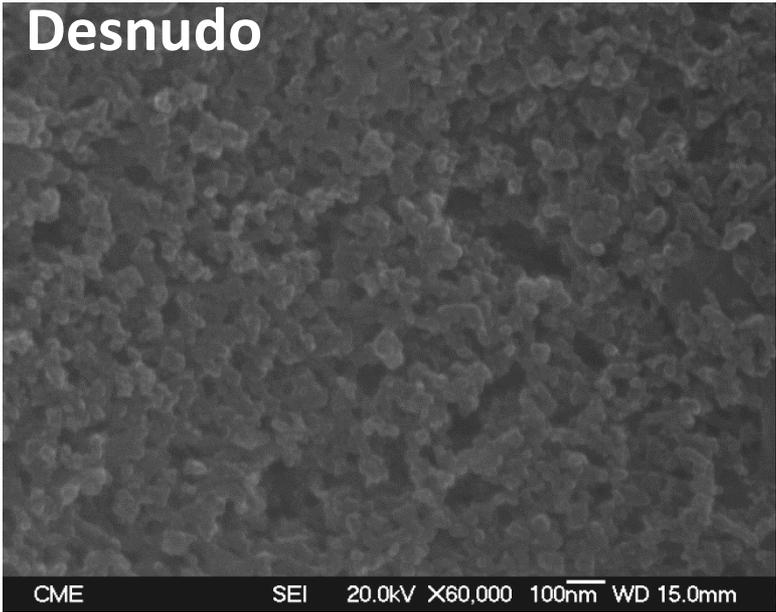
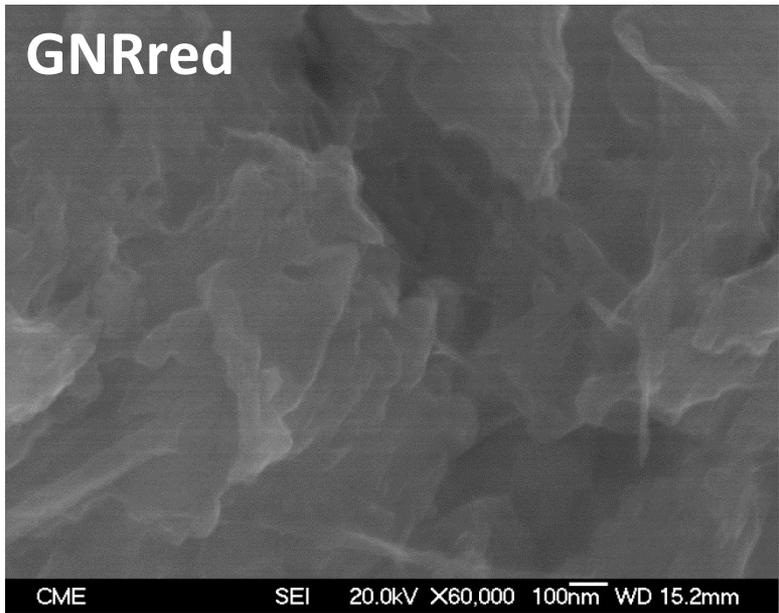
DMF    DMF    H<sub>2</sub>O y H<sub>2</sub>O/NH<sub>3</sub>



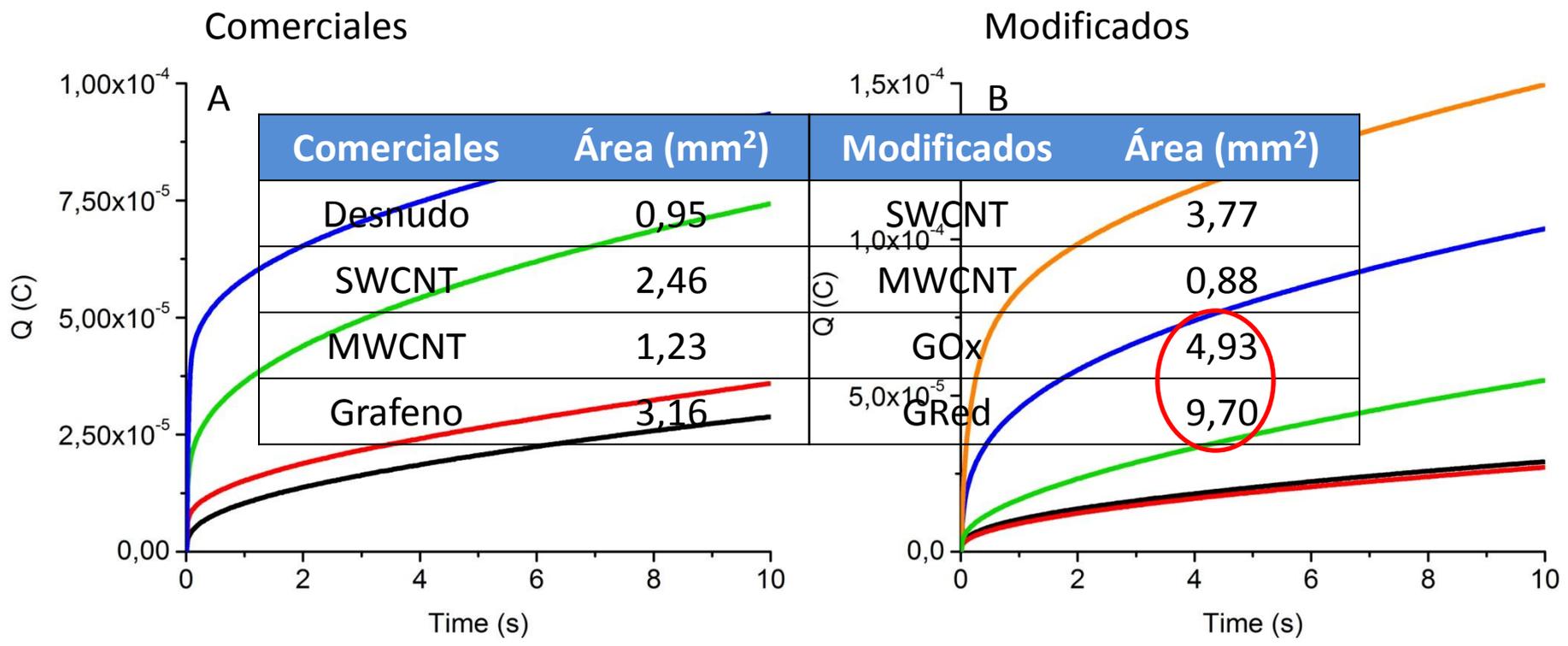
10 μL



# Caracterización mediante FESEM



# Caracterización del área efectiva mediante Cronocolumbimetría



**Desnudo**  
**SWCNT**  
**MWCNT**  
**Grafeno**

Coeficiente de difusión de  
 MT es  $7.50 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$

0,5 mM MT en 50 mM  
 PBS pH 7,6

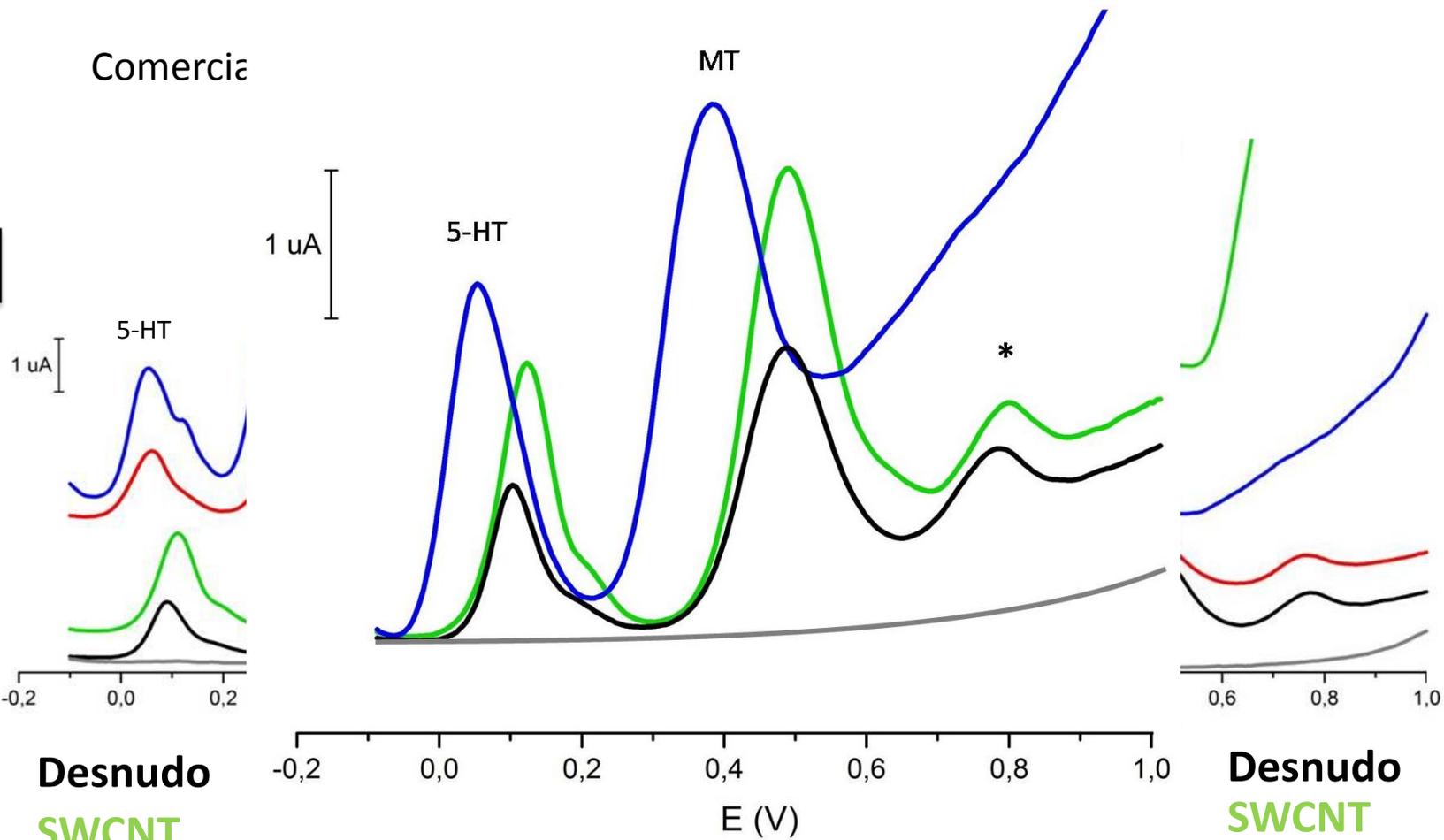
**Desnudo**  
**SWCNT**  
**MWCNT**  
**GOx**  
**GRed**

Cronocolumbimetricas para 0,5 mM de MT en 50 mM PBS pH 7,6.

# Comparación entre electrodos

Comercia

DPV

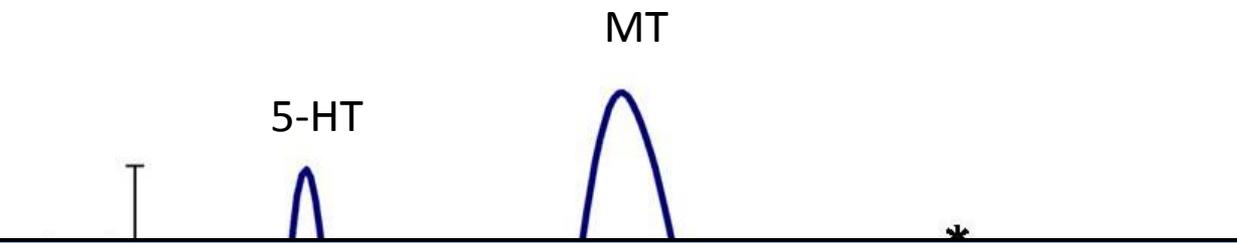
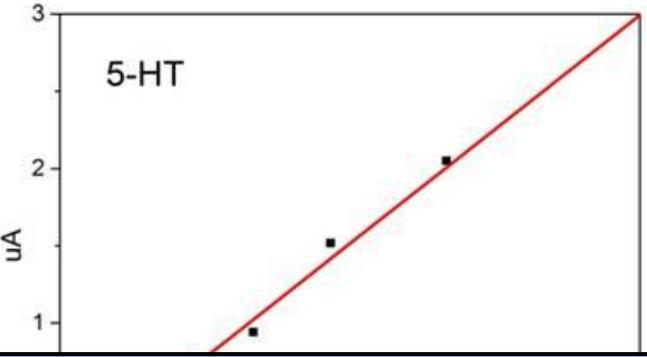


**Desnudo**  
**SWCNT**  
**MWCNT**  
**Grafeno**

**Desnudo**  
**SWCNT**  
**MWCNT**  
**GOx**  
**GRed**

0,1 5-HT y 0,5 mM MT  
en 50 mM PBS pH 7,6

DPVs para la mezcla de 0,1 mM 5-HT y 0,5 mM de MT en PBS. El asterisco (\*) corresponde a un segundo pico de oxidación de MT.



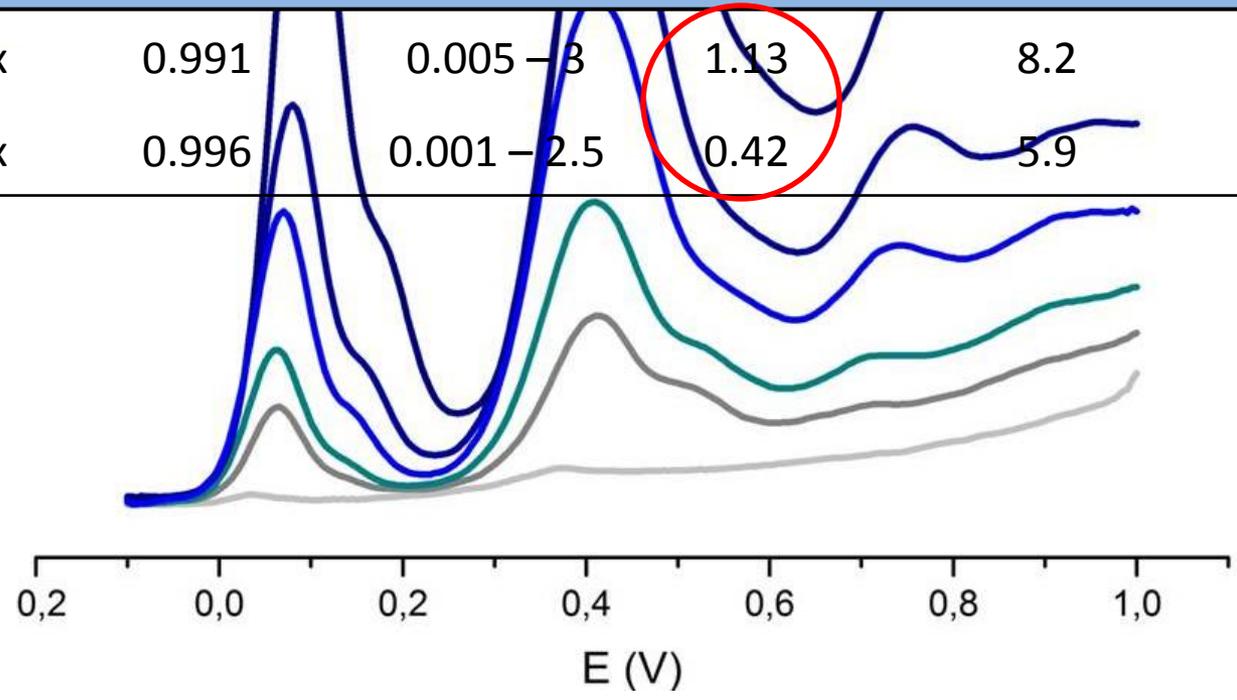
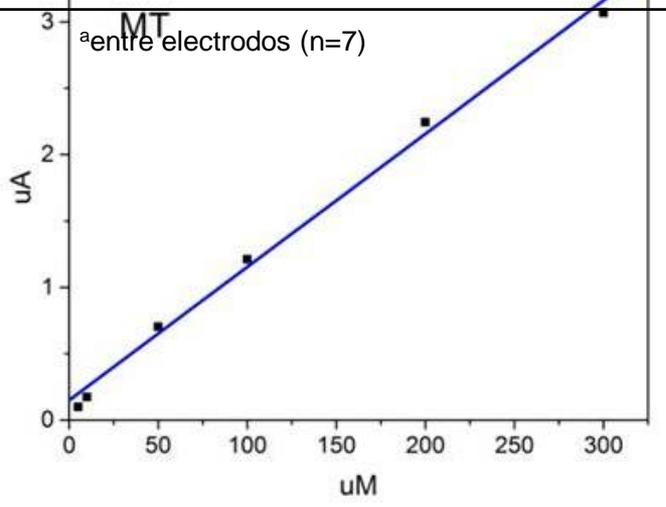
Analito	Ecuación de regresión $y = a + bx$	$R^2$	Intervalo lineal (mM)	LOD ( $\mu\text{M}$ )	Reproducibilidad RSD% <sup>a</sup>
---------	---------------------------------------	-------	-----------------------	-----------------------	------------------------------------

MT  $y = 0.134 + 0.010x$

0.991 0.005 – 3 1.13 8.2

5-HT  $y = 0.071 + 0.019x$

0.996 0.001 – 2.5 0.42 5.9



(\*) corresponde a un segundo pico de oxidación de MT.

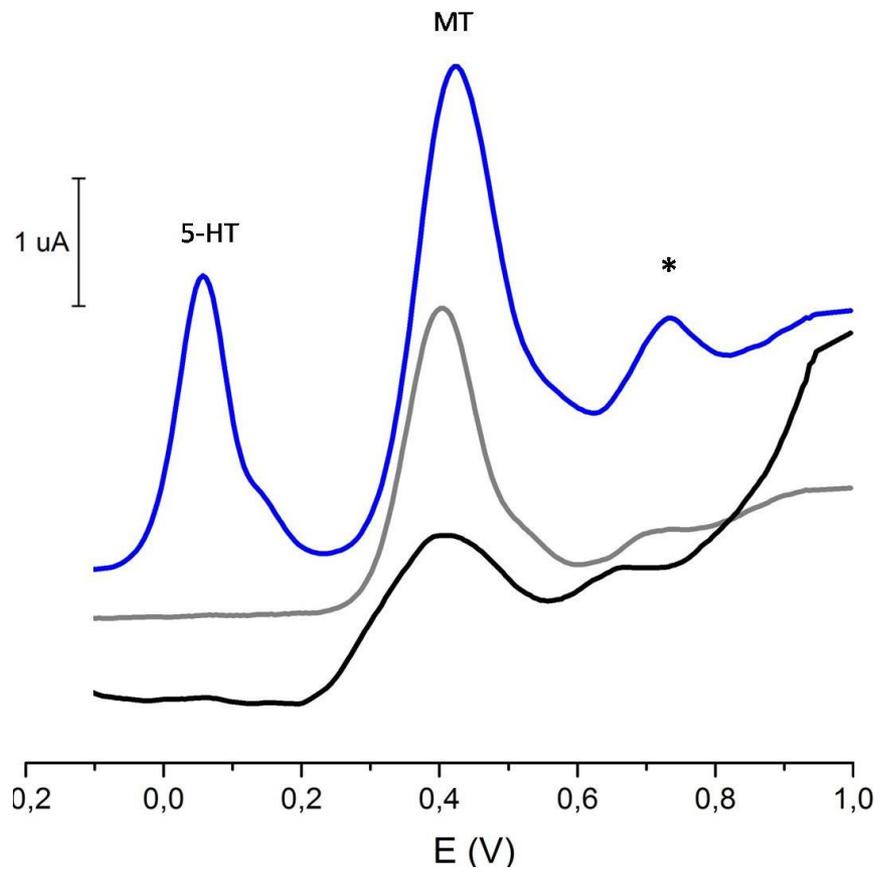
# Análisis de muestras



Cápsula + 5-HT y MT

Comprimido

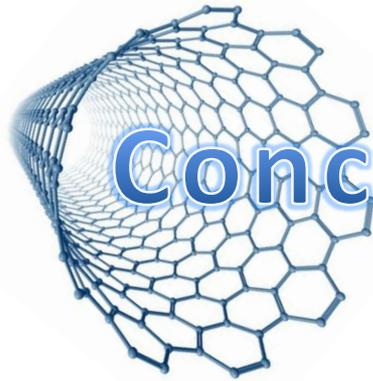
Cápsula



Tipo	MT declarada (mg)	MT encontrada (mg) <sup>a</sup>	Recuperación (%) <sup>a</sup>
Comprimido	3.00	2.95 ± 0.02	98.3 ± 0.7
Cápsula	1.80	1.76 ± 0.05	97.8 ± 2.8

<sup>a</sup>Los valores son medias ± SD

(\*) corresponde a un segundo pico de oxidación de MT.



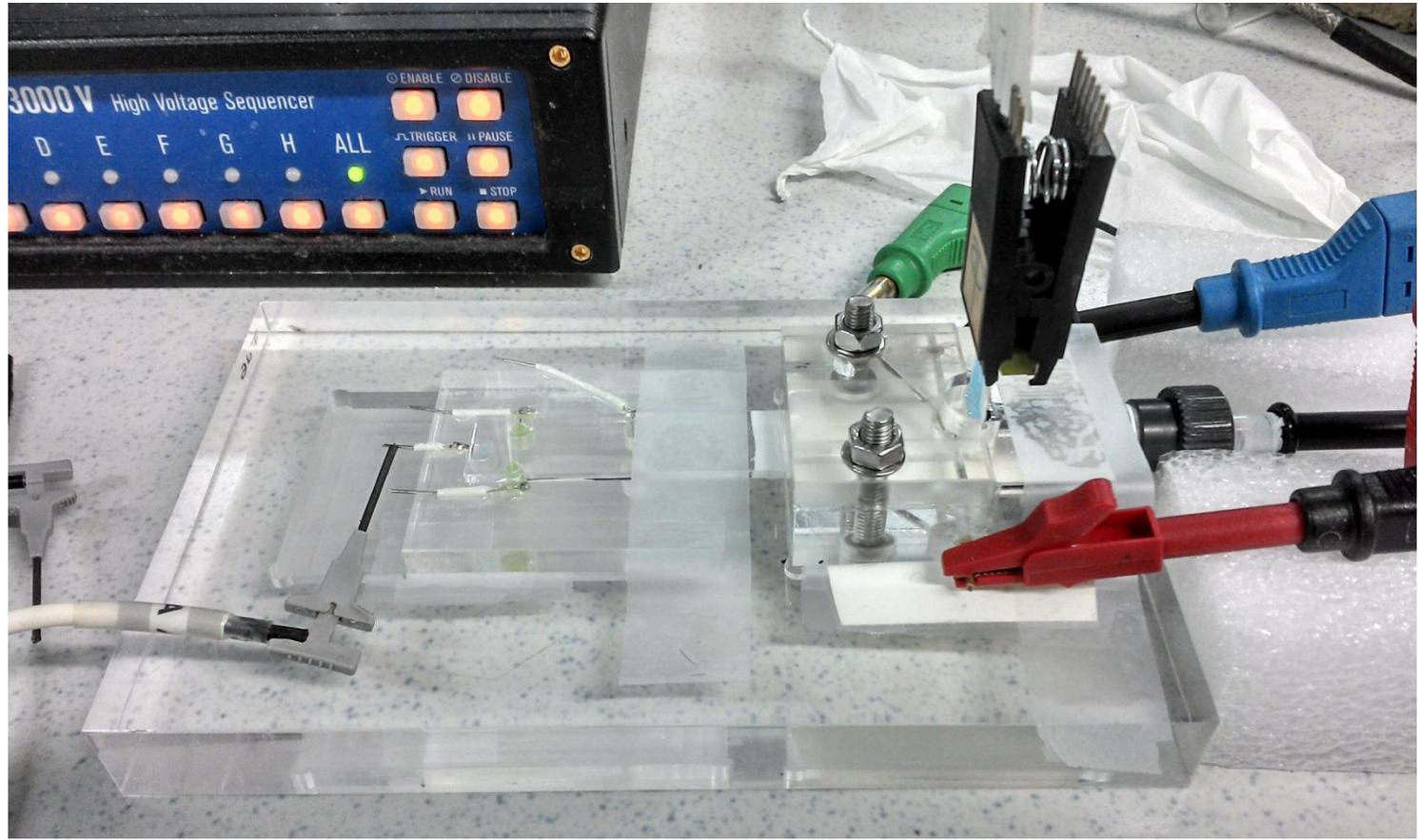
# Conclusiones Parciales

- ① Se exploró el rol de los nanomateriales de carbono como detectores electroquímicos para la determinación de 5-HT y MT
- ② Se desarrolló y caracterizó un sensor electroquímico simple, de bajo costo, portable y desechable para la determinación simultánea de 5-HT y MT
- ③ Además es la primera vez que se determina el coeficiente de difusión de MT

Desarrollo de una metodología  
mediante Chip electroforético con  
detección electroquímica para la  
determinación de melatonina y sus  
precursores



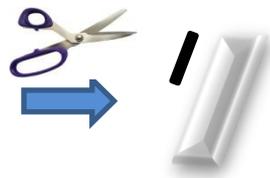
# Electroforesis en chip



# Fabricación de los electrodos



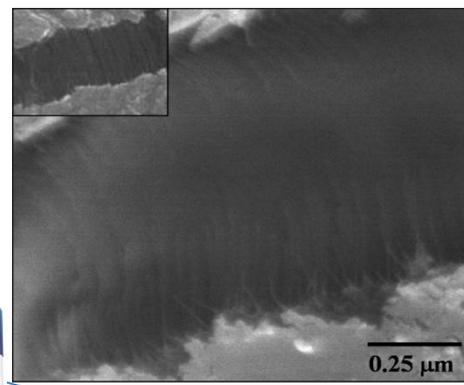
SWCNT 0,5mg  
en 100mL  
DMF



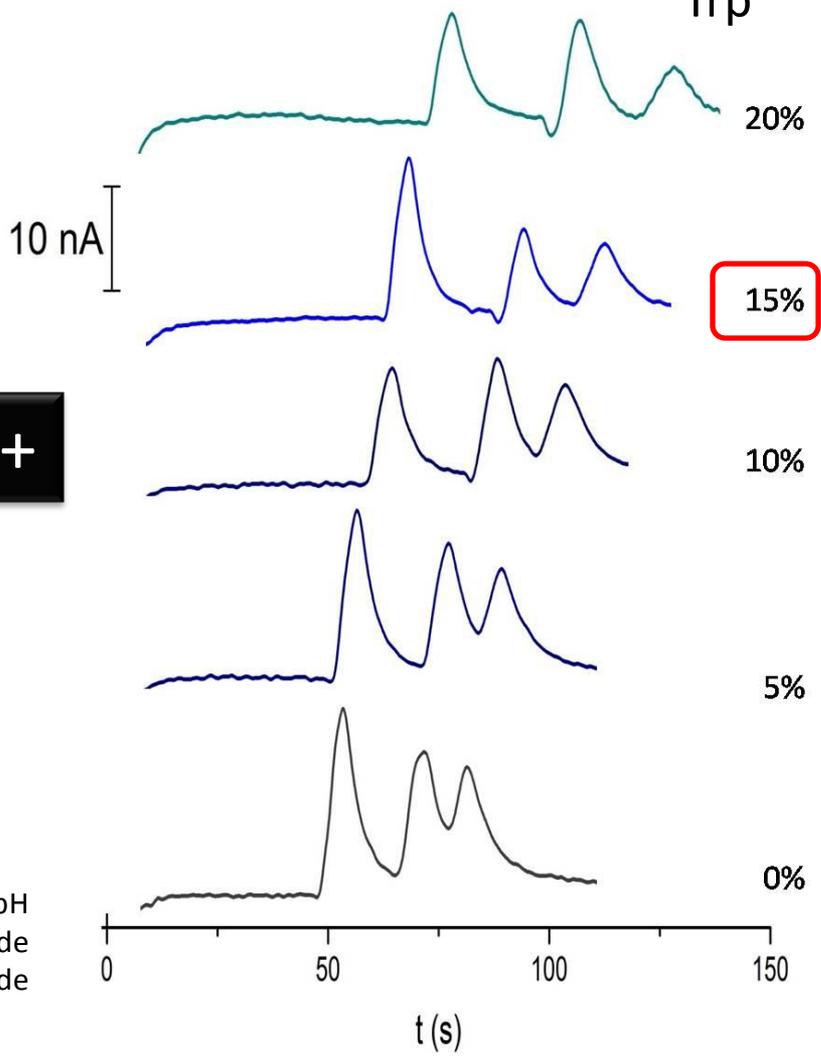
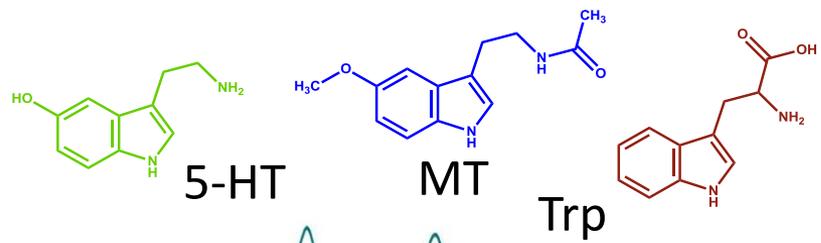
PMMA



4 Toneladas



# Optimización del BGE



20 mM Bórax pH 9,2 +

MeOH

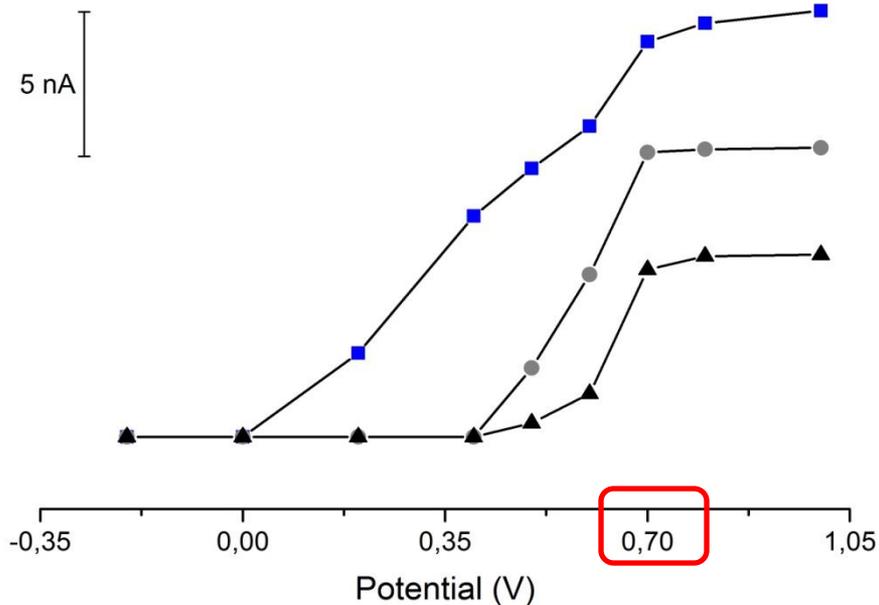
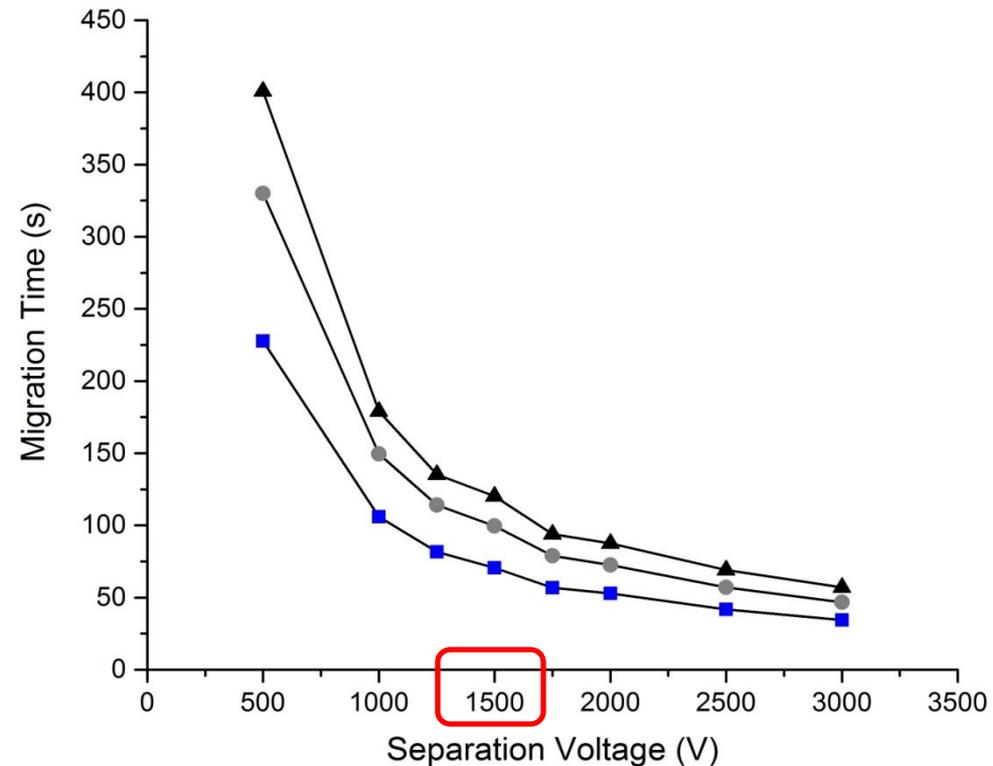
**Condiciones:** 20 mM de tetraborato de sodio (pH 9,2), voltaje de separación de +1,5 kV, voltaje de inyección 1,5 kV durante 5 segundos y potencial de detección de +0,7 V.

# Optimización de la separación y detección

5-HT

MT

Trp

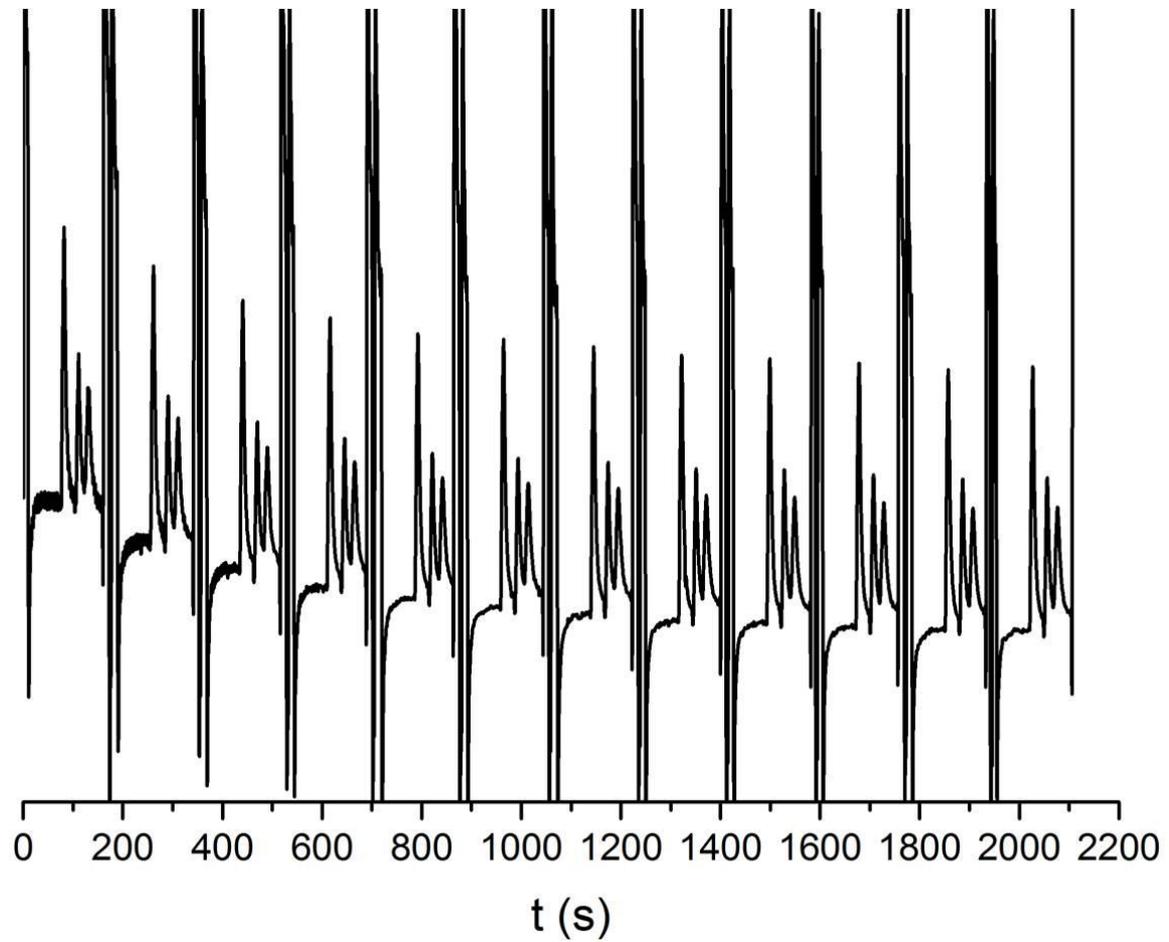


Optimización de los voltajes de separación para 0,5 mM de 5-HT (■), 1 mM de MT (●) y 1 mM de Trp (▲).

Voltamogramas hidrodinámicos (HDVs) de 0,5 mM de 5-HT (■), 1 mM de MT (●) y 1 mM de Trp (▲).

# Robustez del método

12 inyecciones consecutivas  
35 min. de análisis



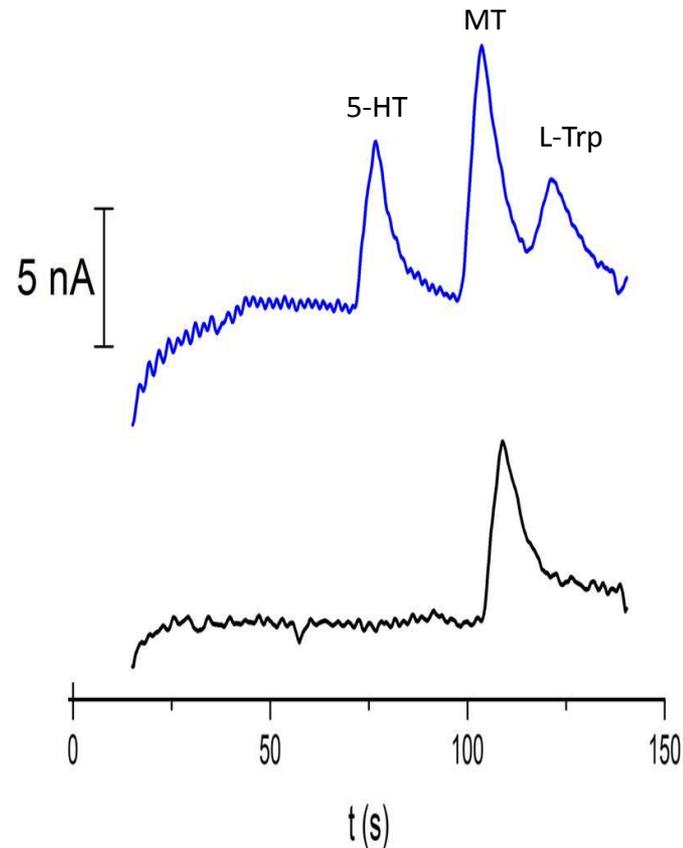
Analito	Intervalo ( $\mu\text{M}$ )	Ecuación (nA)	r
5-HT	$71,5 \pm 0,30 - 200$	$y = 153 x + 15136 \pm 0,2$	0,9992
MT	$100,6 \pm 0,50 - 500$	$y = 50 x + 8314 \pm 0,2$	0,9903
Trp	$120,9 \pm 0,50 - 500$	$y = 40 x + 5077 \pm 0,1$	0,9922

# Análisis de muestras



Cápsula + 5-HT , MT y L-Trp

Cápsula



Analito	LOD ( $\mu\text{M}$ )	LOQ ( $\mu\text{M}$ )	Agregado ( $\mu\text{M}$ )	Encontrado ( $\mu\text{M}$ ) <sup>a</sup>	Recuperación (%)
5-HT	1,17	3,93	50	48,1 $\pm$ 0.9	96,2
MT	3,58	11,98	100	101,3 $\pm$ 0.5	101,3
Trp	4,73	15,84	100	95,6 $\pm$ 1.2	95,6

## Conclusiones Parciales

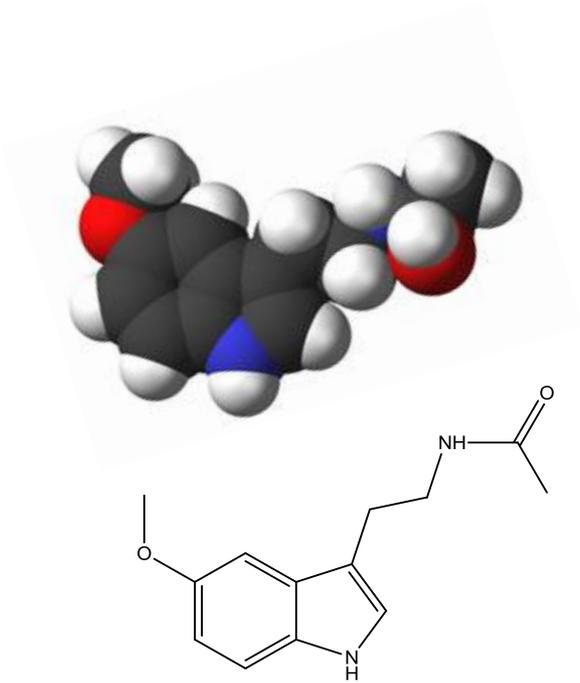
- ① Se logró separar y determinar de manera simultánea MT y sus precursores en menos de 120 segundos con excelentes resultados
- ② Se utilizaron electrodos en los cuales la detección se lleva a cabo directamente en el nanomaterial sin ningún transductor
- ③ Se desarrolló una metodología robusta, sensible, de bajo costo y sustentable



## 2<sup>da</sup> Parte

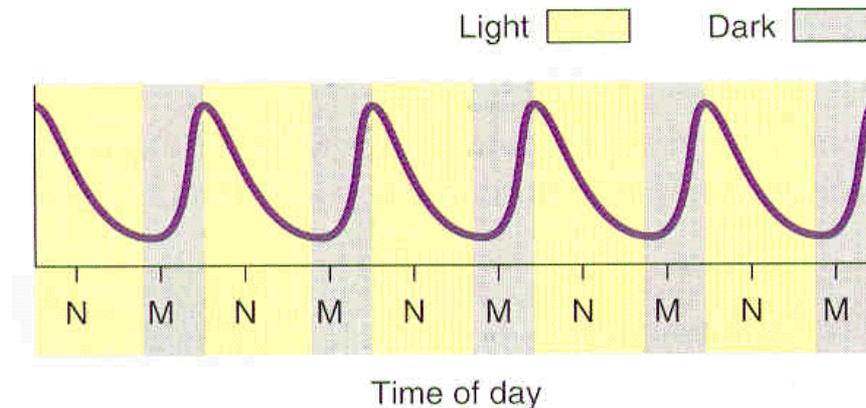
# *Melatonina en plantas*

Papel fisiológico de melatonina (MT) en plantas y factores endógenos y exógenos que modulan su abundancia.



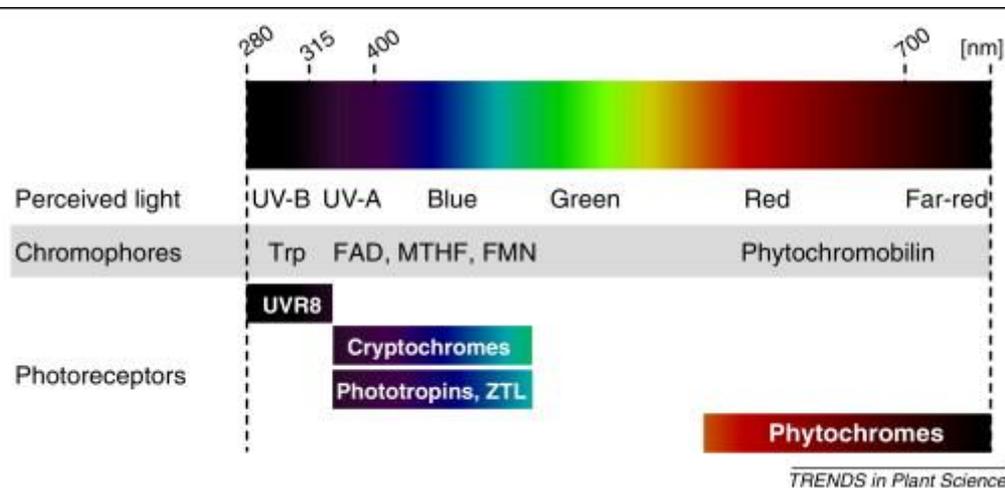
# Objetivos específicos

- 1) Caracterizar si existe fluctuación diaria en los niveles de MT.
- 2) Estudiar qué fotorreceptor regula los niveles de MT.
- 3) Identificar un mutante de la síntesis de MT.
- 4) Identificar su función *in vivo*.



# Objetivos específicos

- 1) Caracterizar si existe fluctuación diaria en los niveles de MT.
- 2) Estudiar qué fotorreceptor regula los niveles de MT.
- 3) Identificar un mutante de la síntesis de MT.
- 4) Identificar su función *in vivo*.



# Objetivos específicos

- 1) Caracterizar si existe fluctuación diaria en los niveles de MT.
- 2) Estudiar qué fotorreceptor regula los niveles de MT.
- 3) Identificar un mutante de la síntesis de MT.
- 4) Identificar su función *in vivo*.



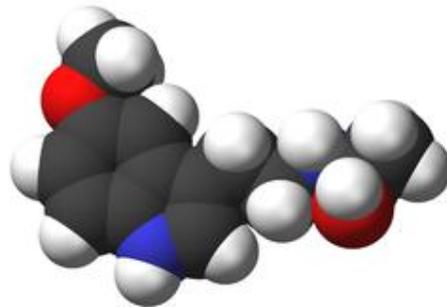
Sequences producing significant alignments:

			Score (bits)	E Value
<a href="#">AT1G21100.1</a>	Symbols:	O-methyltransferase family protei...	<a href="#">67</a>	2e-11
<a href="#">AT1G21110.1</a>	Symbols:	O-methyltransferase family protei...	<a href="#">65</a>	1e-10
<a href="#">AT1G21130.1</a>	Symbols:	O-methyltransferase family protei...	<a href="#">65</a>	1e-10
<a href="#">AT1G21120.1</a>	Symbols:	O-methyltransferase family protei...	<a href="#">65</a>	1e-10
<a href="#">AT1G76790.1</a>	Symbols:	O-methyltransferase family protei...	<a href="#">58</a>	1e-08
<a href="#">AT4G35160.1</a>	Symbols:	O-methyltransferase family protei...	<a href="#">57</a>	3e-08
<a href="#">AT4G35150.1</a>	Symbols:	O-methyltransferase family protei...	<a href="#">56</a>	5e-08
<a href="#">AT1G63140.2</a>	Symbols:	O-methyltransferase family protei...	<a href="#">55</a>	1e-07
<a href="#">AT1G51990.1</a>	Symbols:	O-methyltransferase family protei...	<a href="#">54</a>	2e-07
<a href="#">AT1G51990.2</a>	Symbols:	O-methyltransferase family protei...	<a href="#">54</a>	2e-07
<a href="#">AT1G62900.1</a>	Symbols:	S-adenosyl-L-methionine-dependen...	<a href="#">54</a>	2e-07
<a href="#">AT1G77520.1</a>	Symbols:	O-methyltransferase family protei...	<a href="#">54</a>	3e-07
<a href="#">AT5G54160.1</a>	Symbols:	ATOMT1, OMT1   O-methyltransferase 1...	<a href="#">51</a>	1e-06
<a href="#">AT5G53810.1</a>	Symbols:	O-methyltransferase family protei...	<a href="#">50</a>	3e-06
<a href="#">AT1G33030.1</a>	Symbols:	O-methyltransferase family protei...	<a href="#">49</a>	5e-06
<a href="#">AT1G21130.2</a>	Symbols:	O-methyltransferase family protei...	<a href="#">49</a>	7e-06
<a href="#">AT1G63140.1</a>	Symbols:	O-methyltransferase family protei...	<a href="#">45</a>	1e-04
<a href="#">AT1G77530.1</a>	Symbols:	O-methyltransferase family protei...	<a href="#">44</a>	3e-04
<a href="#">AT1G17495.1</a>	Symbols:	transposable element gene   chr1:...	<a href="#">37</a>	0.035
<a href="#">AT2G10610.1</a>	Symbols:	transposable element gene   chr2:...	<a href="#">32</a>	0.73
<a href="#">AT1G33817.1</a>	Symbols:	transposable element gene   chr1:...	<a href="#">31</a>	1.6
<a href="#">AT5G34863.1</a>	Symbols:	transposable element gene   chr5:...	<a href="#">31</a>	1.9
<a href="#">AT3G25450.1</a>	Symbols:	transposable element gene   chr3:...	<a href="#">30</a>	5.0
<a href="#">AT4G37705.1</a>	Symbols:	transposable element gene   chr4:...	<a href="#">29</a>	7.6
<a href="#">AT3G33070.1</a>	Symbols:	transposable element gene   chr3:...	<a href="#">29</a>	8.4



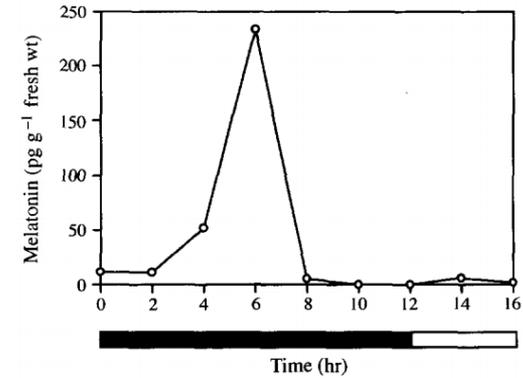
# Objetivos específicos

- 1) Caracterizar si existe fluctuación diaria en los niveles de MT.
- 2) Estudiar qué fotorreceptor regula los niveles de MT.
- 3) Identificar un mutante de la síntesis de MT.
- 4) Identificar su función *in vivo*.

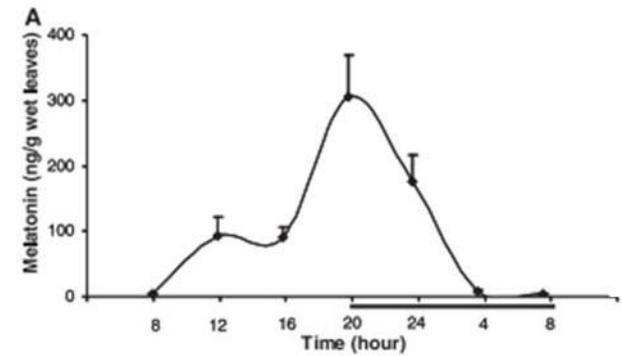


# Determinación de MT a lo largo del día

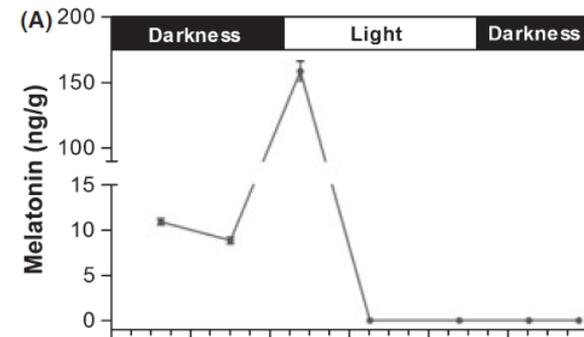
*Chenopodium rubrum*  
Kolar y col. 1997



*Eichhornia crassipes*  
Tan y col. 2007



*Vitis vinifera*  
Boccalandro y col. 2011



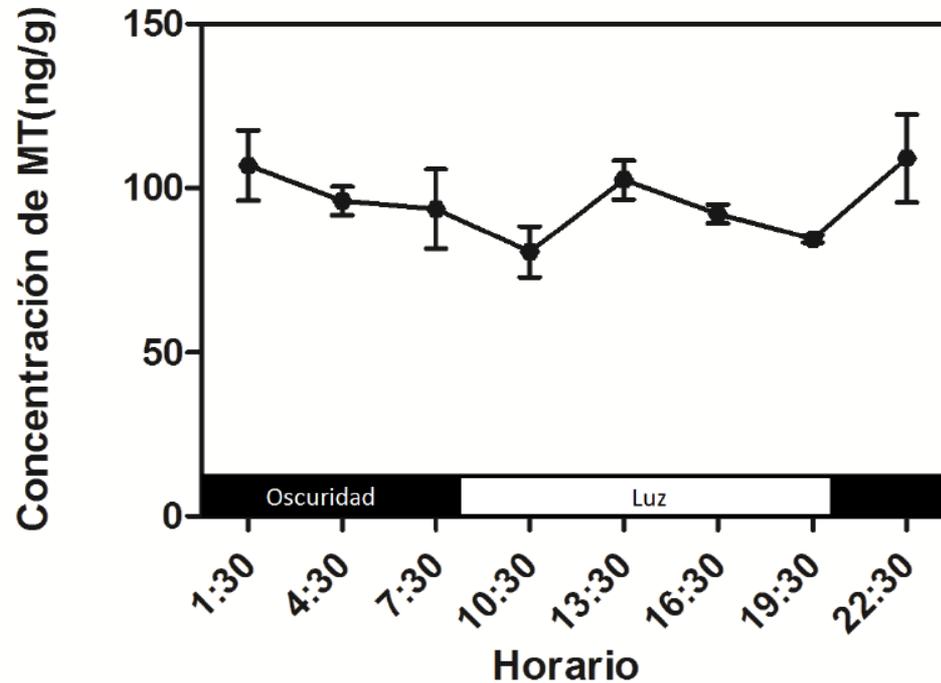
# Determinación de MT a lo largo del día



*Pharbitis nil* y *Solanum lycopersicum*  
Tan y col. 2001



# Determinación de MT a lo largo del día en *Arabidopsis thaliana*



Concentración de melatonina en hojas de *Arabidopsis thaliana* cultivadas en invernáculo, muestreadas cada 3 horas a lo largo de un día. Los datos están representados como la media  $\pm$  SE de tres muestras por horario donde, a su vez, cada muestra está compuesta por tres plantas. No se observaron diferencias significativas entre las concentraciones en los diferentes horarios de muestreo según ANOVA y posterior test de Bonferroni ( $p > 0,05$ )

# Niveles de MT bajo diferentes condiciones de cultivo



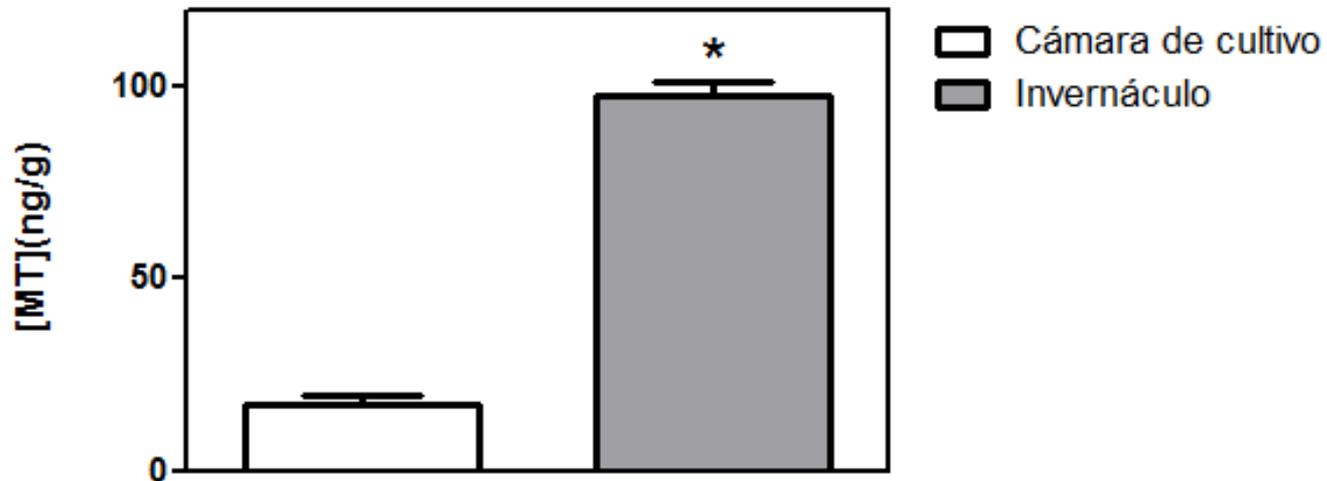
*Eichhornia crassipes*  
Tan y col. 2007



*Solanum lycopersicum*  
Arnao y Hernández Ruiz 2013

Elevados niveles de MT en plantas cultivadas bajo radiación solar

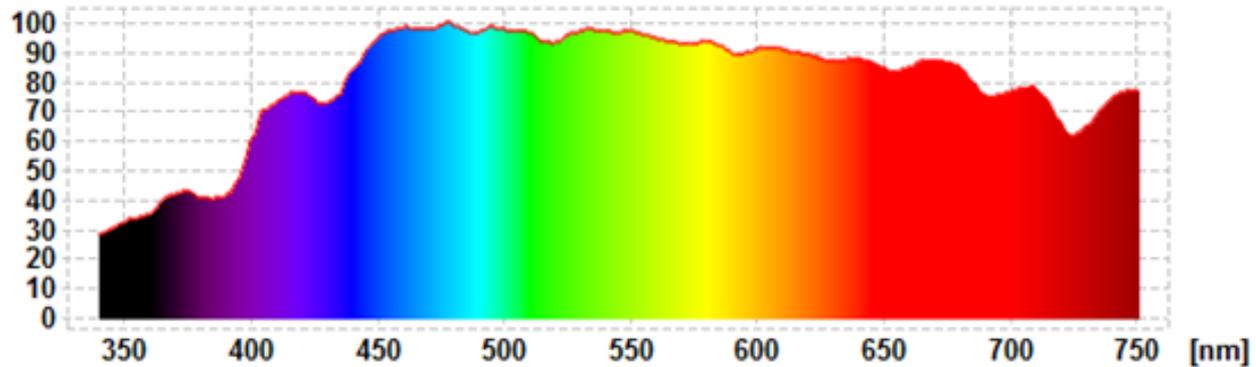
# MT en plantas cultivadas en cámara y en invernáculo



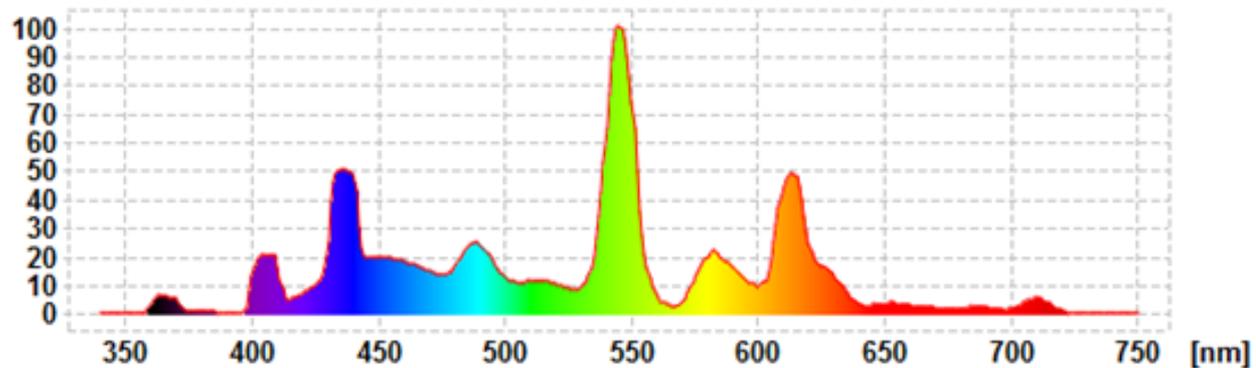
Concentración de melatonina expresada en ng/g de materia seca, en hojas de *Arabidopsis thaliana* cultivadas en cámara de cultivo y en invernáculo. Los datos se muestran como la media  $\pm$  SE de 5 muestras. El asterisco (\*) indica diferencias significativas ( $p < 0,01$ ) según t test (t de Student). Las muestras fueron tomadas al mediodía solar en invernáculo (13:30 hs) y en el punto medio del fotoperíodo dentro de la cámara de cultivo.

# MT en plantas cultivadas en cámara y en invernáculo

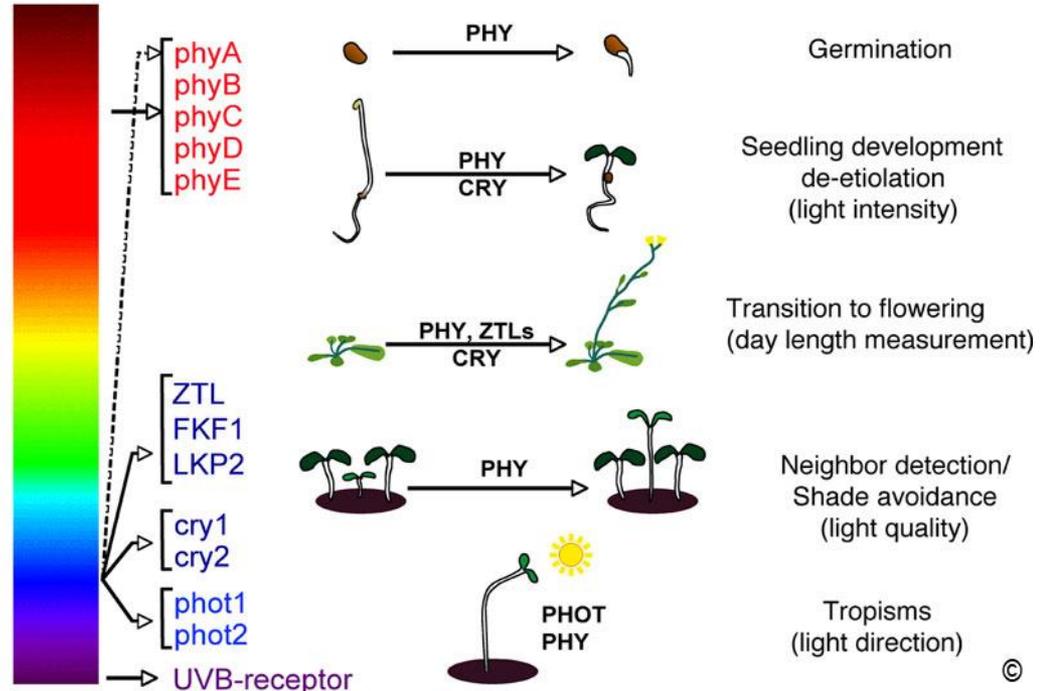
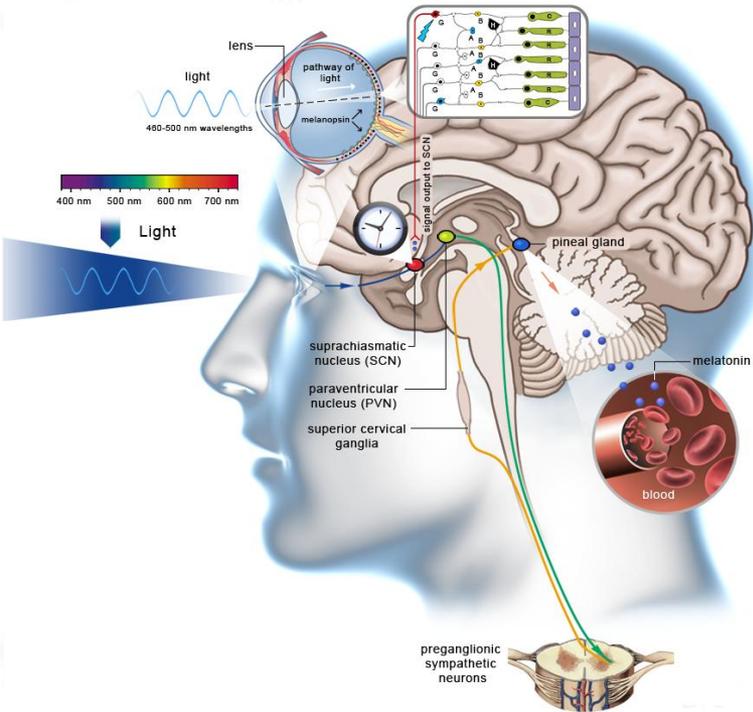
Espectro lumínico bajo luz solar (invernáculo)



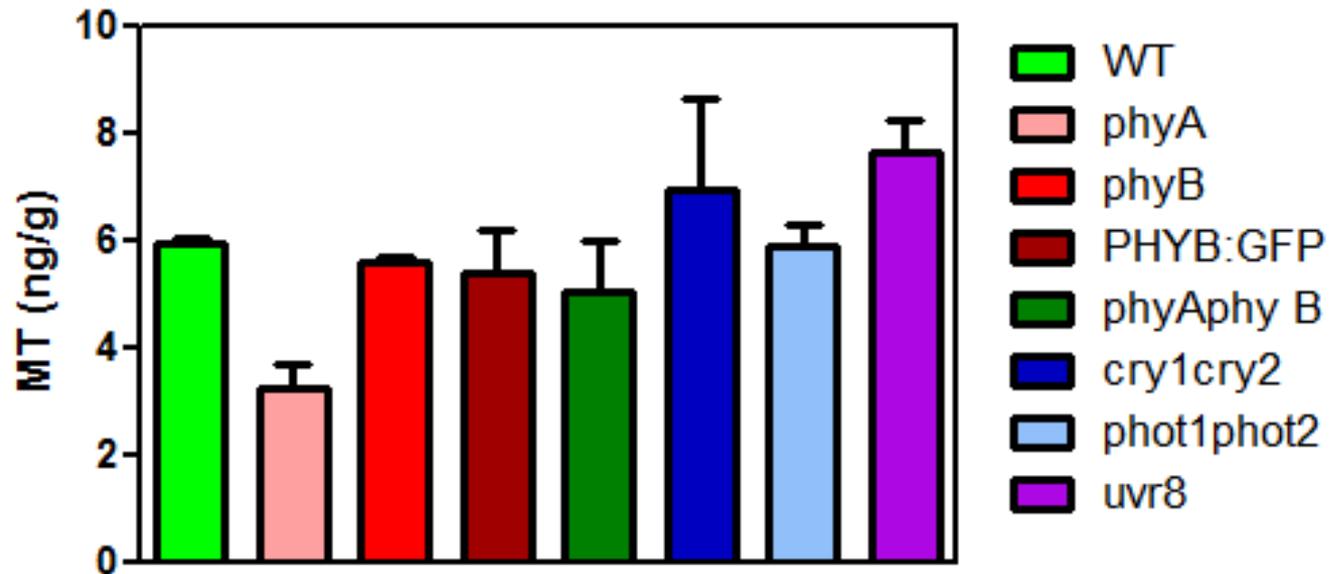
Espectro lumínico bajo tubo fluorescente (cámara de cultivo)



# MT en plantas mutantes de fotorreceptores

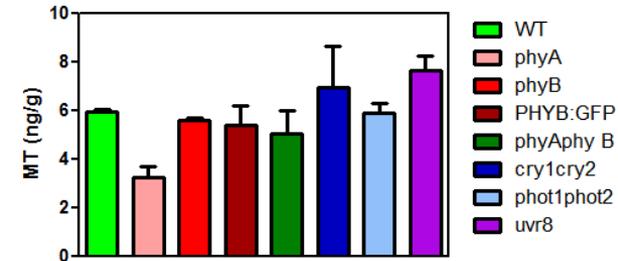
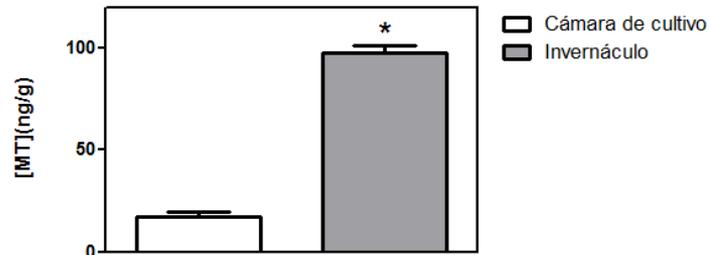
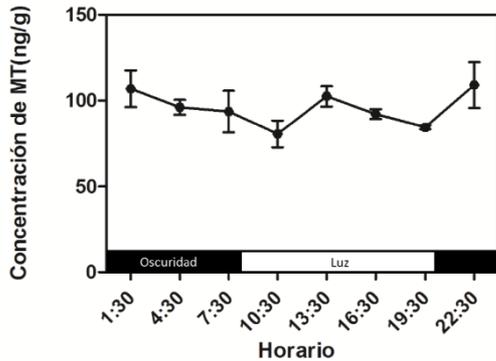


# MT en plantas mutantes de fotorreceptores



Concentraciones de MT, expresadas en ng/g de materia seca, en plantas de *Arabidopsis* de cinco semanas de edad cultivadas en invernáculo WT (*wild type*), *phyA*, *phyB* y *phyAphyB*, *PHYB:GFP*, *cry 1cry2*, *phot 1 phot 2* y *uvr8*. Muestras cosechadas al mediodía solar (13:30 hs). Datos expresados como la media  $\pm$  SE de tres muestras de hojas de tres plantas. Se realizó ANOVA.

# Conclusiones Parciales

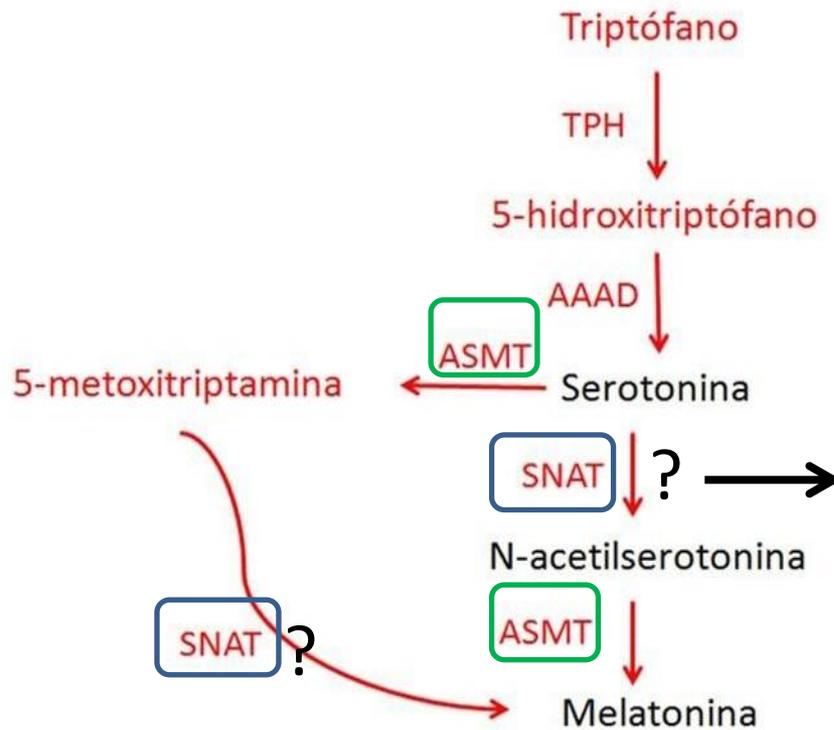


Los niveles de MT no varían a lo largo del día en hojas de *Arabidopsis thaliana* como ha sido reportado en otras especies.

Los niveles de MT dependen marcadamente de las condiciones de cultivo.

Los fotorreceptores de plantas no cumplirían un rol en la promoción ni en la inhibición de la síntesis de MT.

# Identificar un mutante de síntesis de MT



*J. Pineal Res.* 2012  
Doi:10.1111/jpi.12011

© 2012 John Wiley & Sons A/S  
Journal of Pineal Research

Molecular cloning of rice serotonin *N*-acetyltransferase, the penultimate gene in plant melatonin biosynthesis

Abstract: Because of the absence of an arylalkylamine *N*-acetyltransferase (*AANAT*) homolog in the plant genome, the proposal was made that a *GCN5*-related *N*-acetyltransferase superfamily gene (*GNAT*) could be substituted for *AANAT*. To clone rice serotonin *N*-acetyltransferase (*SNAT*), we expressed 31 rice *GNAT* cDNAs in *Escherichia coli* and screened *SNAT* activity by measuring *N*-acetyltryptamine after application with 1 mM tryptamine. *GNAT5* was shown to produce high levels of *N*-acetyltryptamine in *E. coli*,

Kiyoon Kang<sup>1,2,†</sup>, Kyungjin Lee<sup>1,†</sup>, Sangkyu Park<sup>1</sup>, Yeong Byeon<sup>1</sup> and Kyoungwan Back<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Biotechnology, Bioenergy Research Center, Chonnam National University, Gwangju, Korea; <sup>2</sup>Michigan State University, East Lansing, MI, 48824, USA

# Resultado de TBLASTN



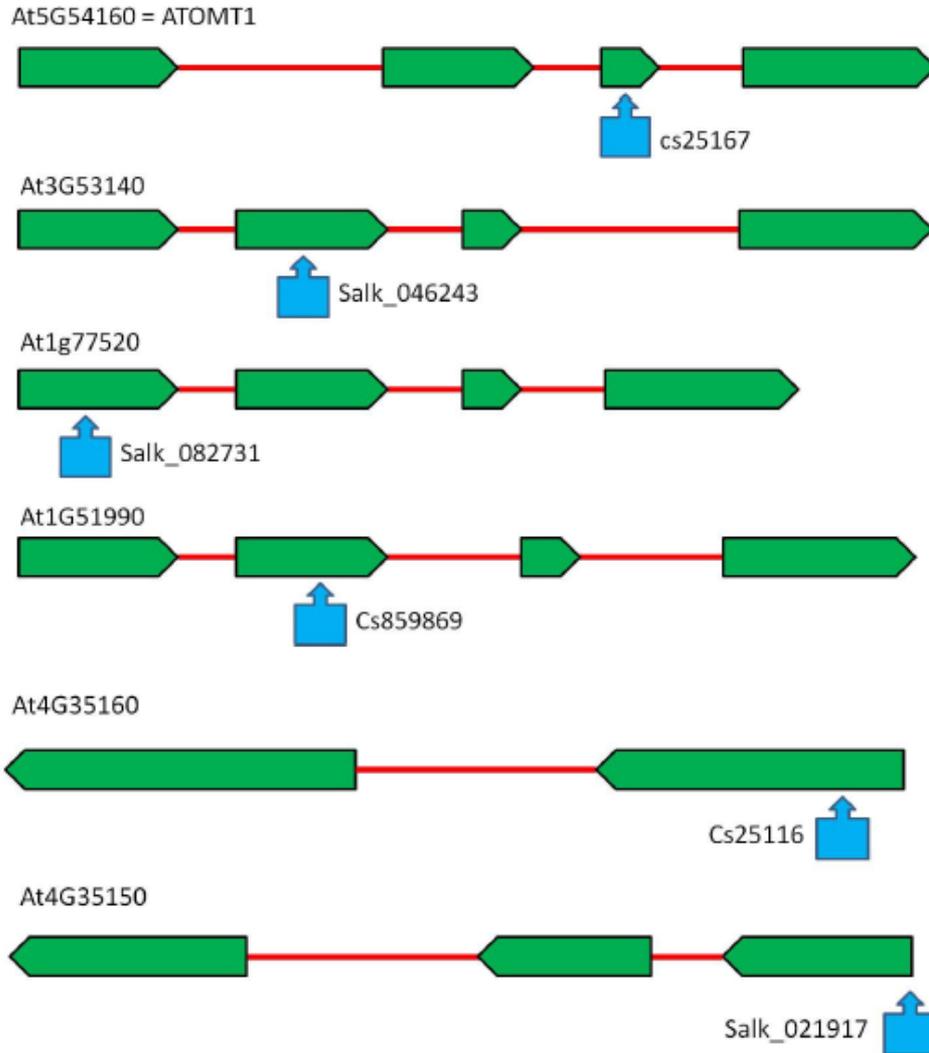
Sequences producing significant alignments:			Score (bits)	E Value
<a href="#">AT1G21100.1</a>	Symbols:	O-methyltransferase family protei...	<a href="#">67</a>	2e-11
<a href="#">AT1G21110.1</a>	Symbols:	O-methyltransferase family protei...	<a href="#">65</a>	1e-10
<a href="#">AT1G21130.1</a>	Symbols:	O-methyltransferase family protei...	<a href="#">65</a>	1e-10
<a href="#">AT1G21120.1</a>	Symbols:	O-methyltransferase family protei...	<a href="#">65</a>	1e-10
<a href="#">AT1G76790.1</a>	Symbols:	O-methyltransferase family protei...	<a href="#">58</a>	1e-08
▶ <a href="#">AT4G35160.1</a>	Symbols:	O-methyltransferase family protei...	<a href="#">57</a>	3e-08
▶ <a href="#">AT4G35150.1</a>	Symbols:	O-methyltransferase family protei...	<a href="#">56</a>	5e-08
<a href="#">AT1G63140.2</a>	Symbols:	O-methyltransferase family protei...	<a href="#">55</a>	1e-07
<a href="#">AT1G51990.1</a>	Symbols:	O-methyltransferase family protei...	<a href="#">54</a>	2e-07
▶ <a href="#">AT1G51990.2</a>	Symbols:	O-methyltransferase family protei...	<a href="#">54</a>	2e-07
<a href="#">AT1G62900.1</a>	Symbols:	S-adenosyl-L-methionine-dependent...	<a href="#">54</a>	2e-07
▶ <a href="#">AT1G77520.1</a>	Symbols:	O-methyltransferase family protei...	<a href="#">54</a>	3e-07
▶ <a href="#">AT5G54160.1</a>	Symbols: ATOMT1, OMT1	O-methyltransferase 1...	<a href="#">51</a>	1e-06
<a href="#">AT5G53810.1</a>	Symbols:	O-methyltransferase family protei...	<a href="#">50</a>	3e-06
<a href="#">AT1G33030.1</a>	Symbols:	O-methyltransferase family protei...	<a href="#">49</a>	5e-06
<a href="#">AT1G21130.2</a>	Symbols:	O-methyltransferase family protei...	<a href="#">49</a>	7e-06
<a href="#">AT1G63140.1</a>	Symbols:	O-methyltransferase family protei...	<a href="#">45</a>	1e-04
<a href="#">AT1G77530.1</a>	Symbols:	O-methyltransferase family protei...	<a href="#">44</a>	3e-04

# Resultado de BLASTP

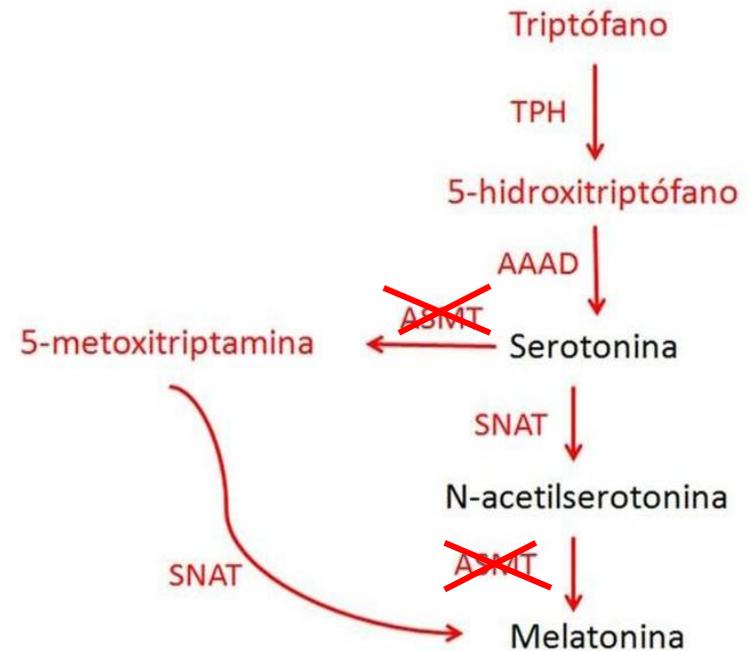


Sequences producing significant alignments:			Score	E
			(bits)	Value
<a href="#">AT1G21100.1</a>	Symbols:	O-methyltransferase family protei...	<a href="#">67</a>	2e-11
<a href="#">AT1G21110.1</a>	Symbols:	O-methyltransferase family protei...	<a href="#">65</a>	5e-11
<a href="#">AT1G21130.1</a>	Symbols:	O-methyltransferase family protei...	<a href="#">65</a>	7e-11
<a href="#">AT1G21120.1</a>	Symbols:	O-methyltransferase family protei...	<a href="#">65</a>	7e-11
<a href="#">AT1G76790.1</a>	Symbols:	O-methyltransferase family protei...	<a href="#">58</a>	7e-09
<a href="#">AT4G35160.1</a>	Symbols:	O-methyltransferase family protei...	<a href="#">57</a>	1e-08
<a href="#">AT4G35150.1</a>	Symbols:	O-methyltransferase family protei...	<a href="#">56</a>	3e-08
<a href="#">AT1G77520.1</a>	Symbols:	O-methyltransferase family protei...	<a href="#">55</a>	6e-08
<a href="#">AT1G63140.2</a>	Symbols:	O-methyltransferase family protei...	<a href="#">54</a>	1e-07
<a href="#">AT1G51990.2</a>	Symbols:	O-methyltransferase family protei...	<a href="#">54</a>	1e-07
<a href="#">AT1G51990.1</a>	Symbols:	O-methyltransferase family protei...	<a href="#">54</a>	1e-07
<a href="#">AT1G62900.1</a>	Symbols:	S-adenosyl-L-methionine-dependen...	<a href="#">54</a>	2e-07
<a href="#">AT5G54160.1</a>	Symbols:	ATOMT1, OMT1   O-methyltransferase 1...	<a href="#">51</a>	8e-07
<a href="#">AT3G53140.1</a>	Symbols:	O-methyltransferase family protei...	<a href="#">50</a>	1e-06
<a href="#">AT5G53810.1</a>	Symbols:	O-methyltransferase family protei...	<a href="#">50</a>	2e-06
<a href="#">AT1G33030.1</a>	Symbols:	O-methyltransferase family protei...	<a href="#">50</a>	3e-06
<a href="#">AT5G37170.1</a>	Symbols:	O-methyltransferase family protei...	<a href="#">45</a>	4e-05
<a href="#">AT1G77530.1</a>	Symbols:	O-methyltransferase family protei...	<a href="#">43</a>	2e-04

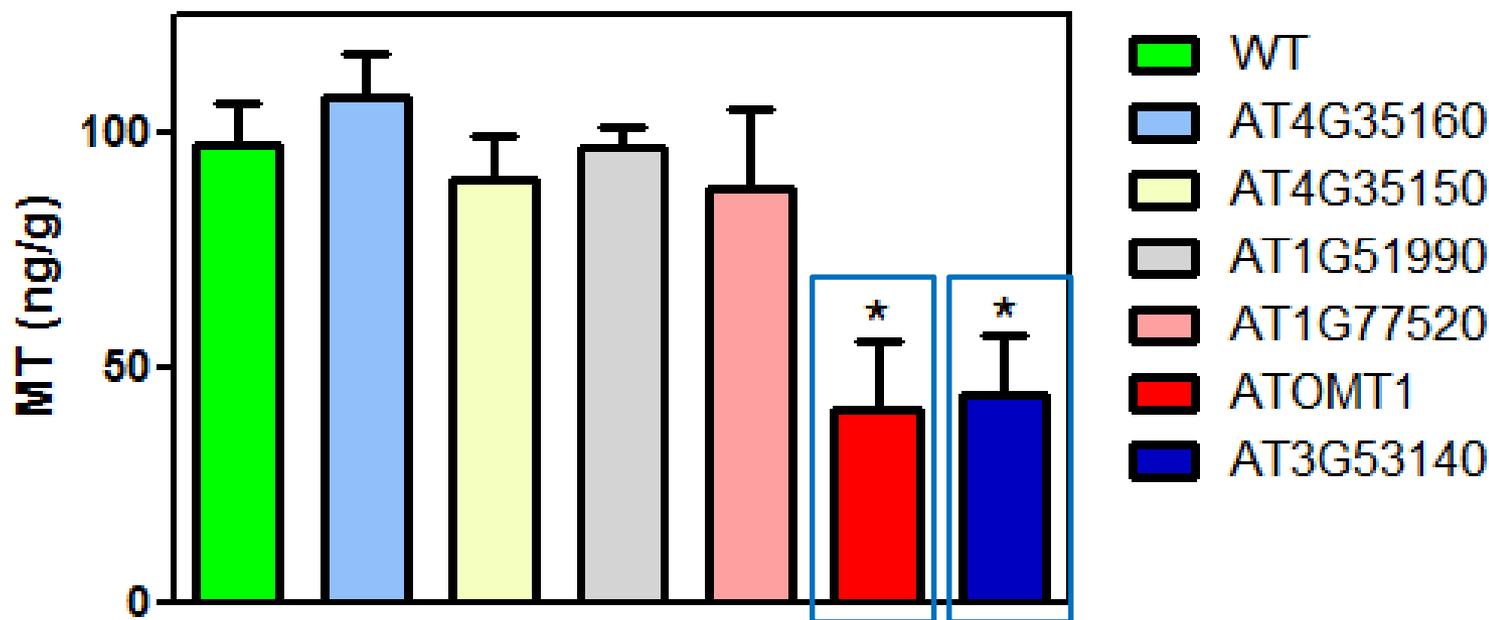
# Selección de mutantes de genes homólogos a ASMT



Se seleccionaron seis genotipos mutantes de genes con homología a HIOMT



# MT en los mutantes seleccionados



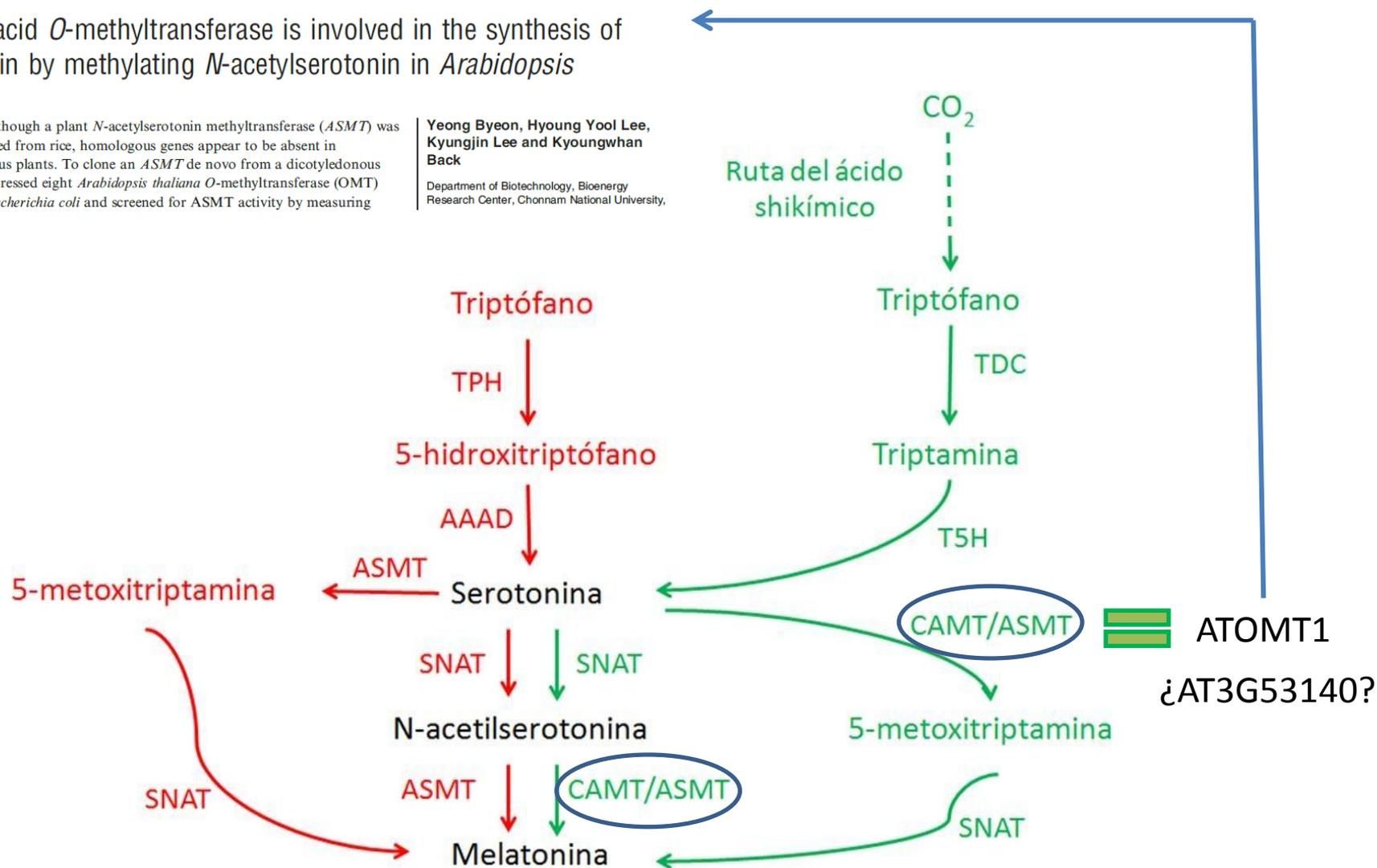
Concentración de melatonina en hojas de las diferentes líneas mutantes cultivadas en invernáculo expresadas en ng/g de materia seca. Muestras tomadas al mediodía solar (13:30 hs). Los datos están representados como la media  $\pm$  SE de tres muestras. Los asteriscos indican diferencias significativas con el control (WT) según ANOVA y posterior test de Bonferroni ( $p < 0,05$ ).

## Caffeic acid *O*-methyltransferase is involved in the synthesis of melatonin by methylating *N*-acetylserotonin in *Arabidopsis*

Abstract: Although a plant *N*-acetylserotonin methyltransferase (*ASMT*) was recently cloned from rice, homologous genes appear to be absent in dicotyledonous plants. To clone an *ASMT* de novo from a dicotyledonous plant, we expressed eight *Arabidopsis thaliana* *O*-methyltransferase (*OMT*) cDNAs in *Escherichia coli* and screened for *ASMT* activity by measuring

Yeong Byeon, Hyoung Yool Lee,  
Kyungjin Lee and Kyoungwhan  
Back

Department of Biotechnology, Bioenergy  
Research Center, Chonnam National University,



# Conclusiones Parciales

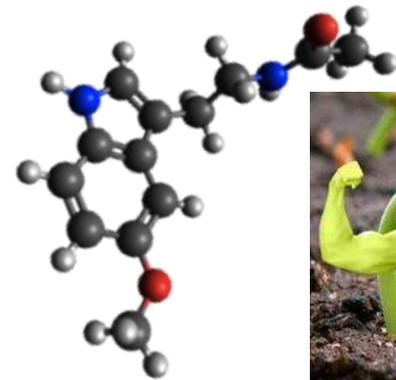
El gen ATOMT1 es el encargado de la metilación de N- acetil serotonina en plantas pero podrían existir otros genes con la misma función.

El gen AT3G53140 es candidato a ser homólogo de ATOMT1.

# Identificación de su rol *in vivo*

1<sup>ra</sup> Parte: Melatonina como antioxidante de amplio espectro

# STRESS FIGHTER



# Función antioxidante

Tolerancia a la sequía  
(Zuo y col. 2014)



*J. Pineal Res.* 2014; 57:408–417

Doi:10.1111/jpi.12180

© 2014 John Wiley & Sons A/S.  
Published by John Wiley & Sons Ltd  
Journal of Pineal Research

Overexpression of *MzASMT* improves melatonin production and enhances drought tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana* plants

Tolerancia al frío  
(Bajwa y col. 2014)



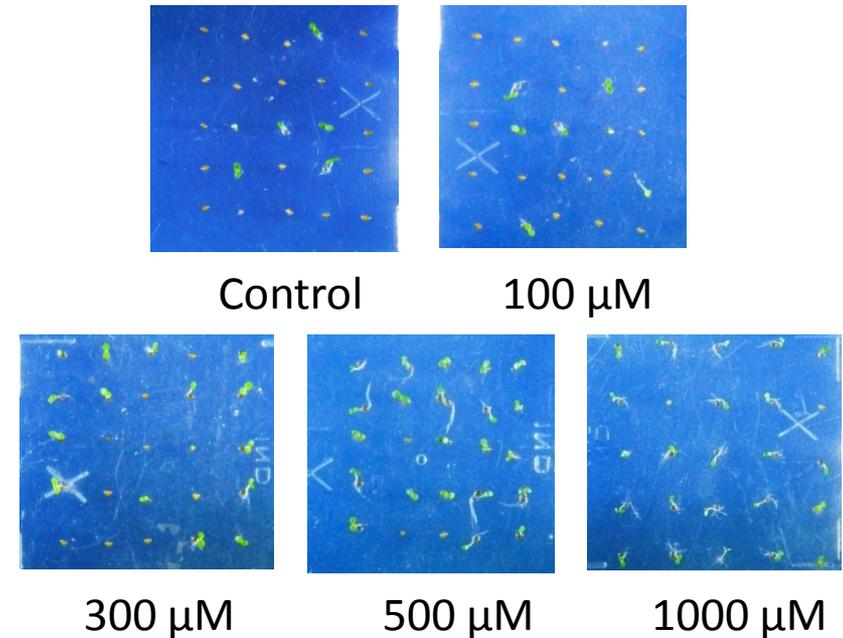
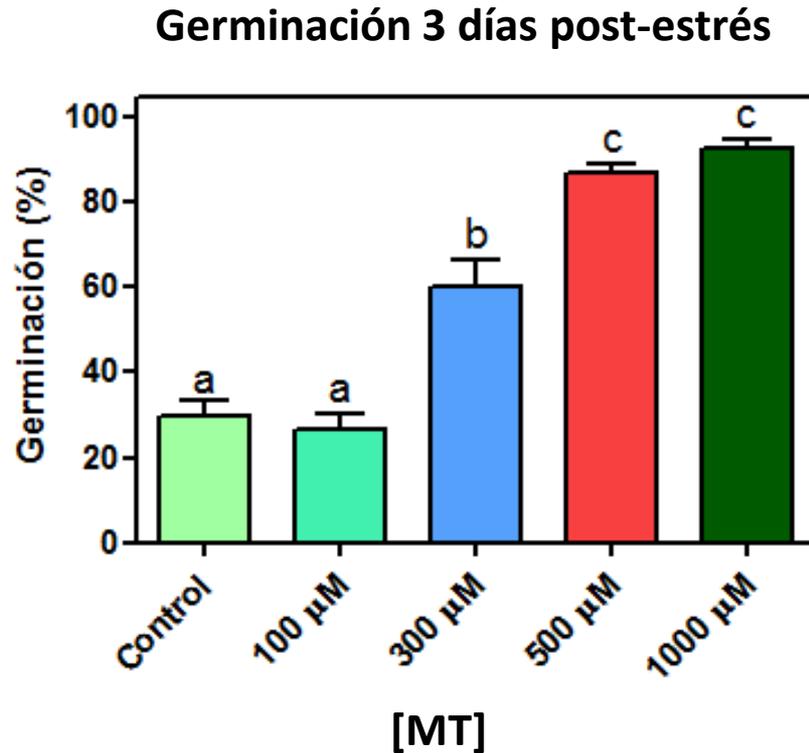
*J. Pineal Res.* 2014; 56:238–245

Doi:10.1111/jpi.12115

© 2013 John Wiley & Sons A/S.  
Published by John Wiley & Sons Ltd  
Journal of Pineal Research

Role of melatonin in alleviating cold stress in *Arabidopsis thaliana*

# MT aumenta la germinación de semillas sometidas a estrés por calor



Efecto de melatonina exógena sobre la germinación de semillas de *Arabidopsis thaliana* posterior a un estrés por calor. Los datos muestran los porcentajes de germinación + SE. Las diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas de acuerdo al ANOVA y posterior test de comparación múltiple de Bonferroni: a vs b,  $p < 0,01$ ; a vs c,  $p < 0,001$ ; b vs c,  $p < 0,01$ .

# MT aumenta la germinación de semillas sometidas a estrés por calor

¿Dormición o pérdida de viabilidad?

Balzer y Hardeland (1996) sugirieron que MT podría intervenir en la regulación de la dormición de semillas.

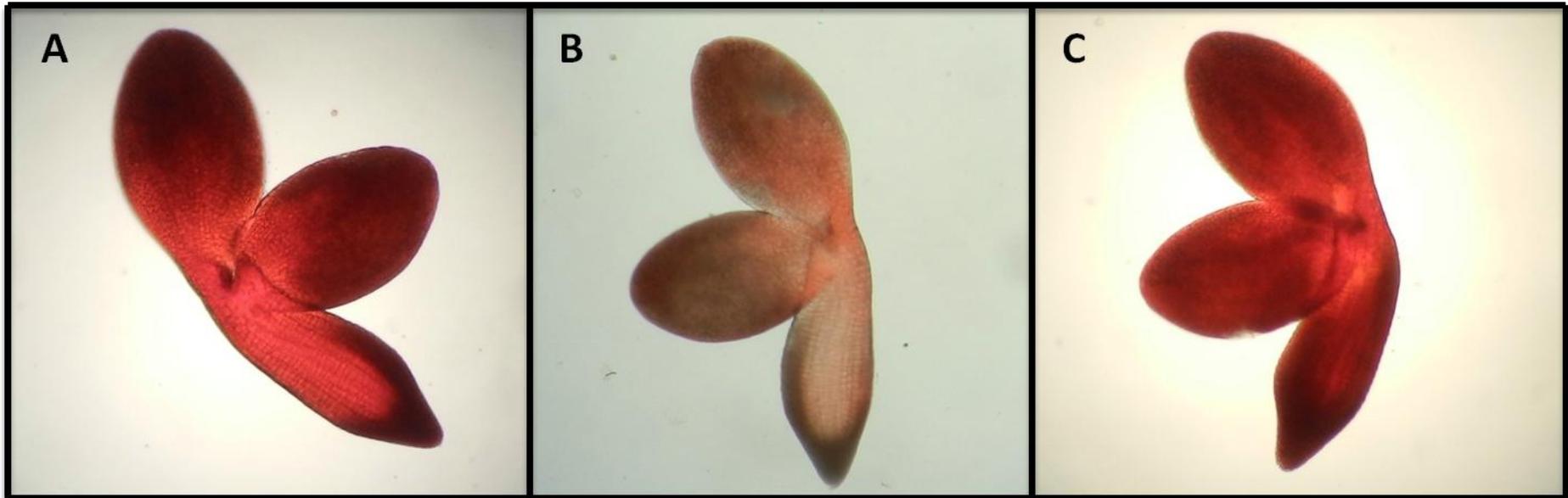


# MT mantiene la viabilidad de semillas sometidas a estrés por calor

Embrión de semilla no estresada

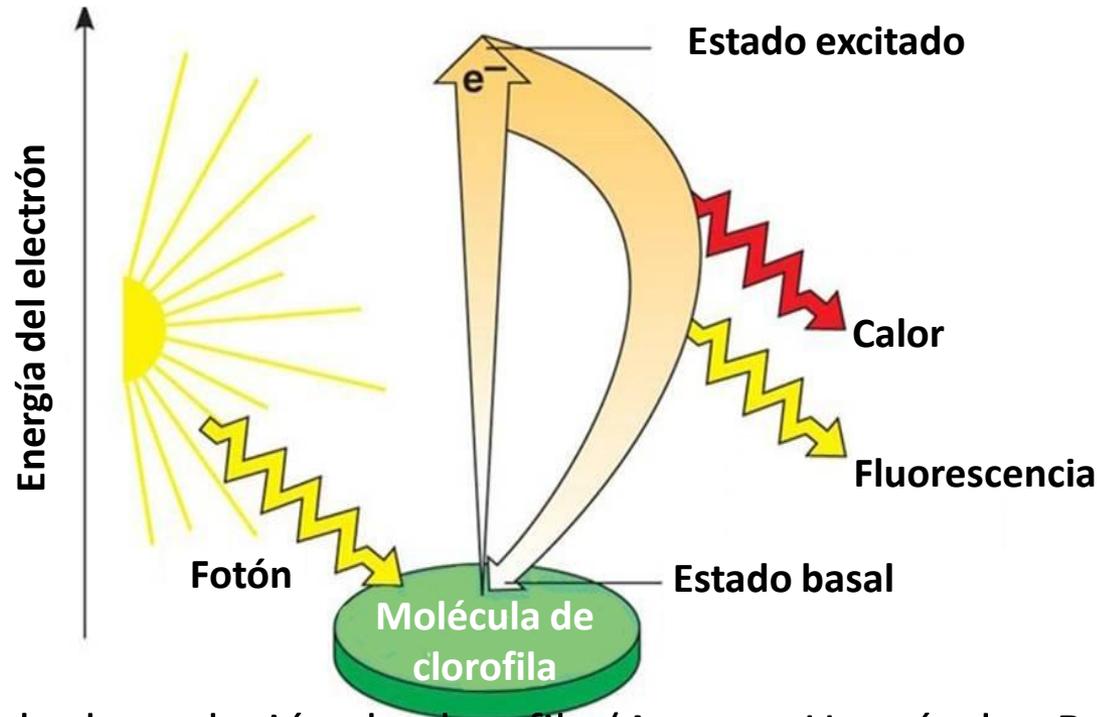
Embrión de semilla estresada control

Embrión de semilla estresada embebida en agar con MT (1000  $\mu$ M)



Fotografías representativas de embriones de semillas de *Arabidopsis thaliana* teñidos mediante el test de tetrazolio y observados bajo microscopio en donde A) semillas no estresadas (control), B) semillas estresadas sin la adición de melatonina y C) semillas estresadas embebidas en melatonina (1000  $\mu$ M).

# Estudio del rendimiento cuántico del PS II pre y post-floración



Protección ante la degradación de clorofila (Arnao y Hernández-Ruiz 2009)

*J. Pineal Res.* 2009; 46:58–63

Doi:10.1111/j.1600-079X.2008.00625.x

© 2008 The Authors  
Journal compilation © 2008 Blackwell Munksgaard  
Journal of Pineal Research

Protective effect of melatonin against chlorophyll degradation during the senescence of barley leaves

# Estudio del rendimiento cuántico del PS II pre y post-floración

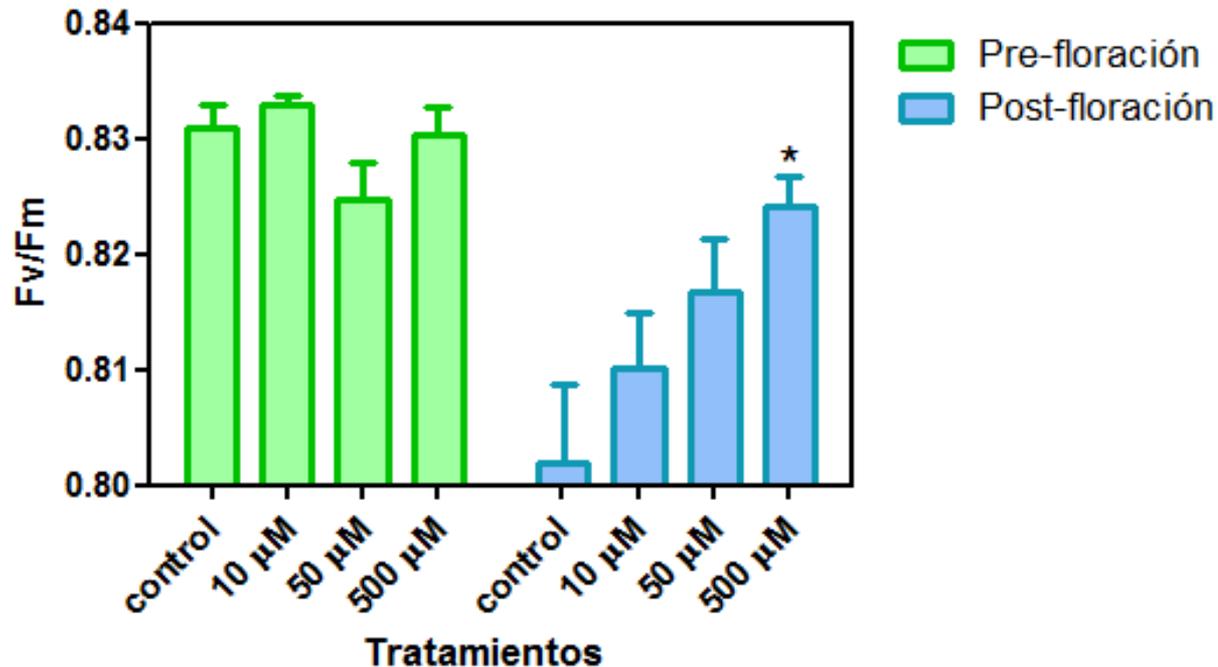
Control

MT 500  $\mu$ M



Fotografías representativas de plantas de 5 semanas de edad control y con agregado de melatonina (500  $\mu$ M) cultivadas en cámara de cultivo, con un fotoperíodo de 12 h luz/12 h oscuridad.

# MT mantiene elevados niveles de rendimiento cuántico del PS II post-floración



Los datos representan la media de la eficiencia cuántica del fotosistema II (PS II) + SE de 10 plantas por tratamiento de *Arabidopsis thaliana* cultivadas en cámara de cultivo pre y post-floración. El asterisco indica diferencias significativas entre el tratamiento 500 μM y el control en plantas post-floración, de acuerdo al test de comparación múltiple de Bonferroni ( $p < 0,05$ ).

# Identificación de su rol *in vivo*

2<sup>da</sup> Parte: Melatonina como regulador del crecimiento



# Regulador del crecimiento

Crecimiento del hipocotilo en *Lupinus albus*  
(Hernández-Ruiz y Arnao, 2004)

Planta (2004) 220: 140–144  
DOI 10.1007/s00425-004-1317-3

ORIGINAL ARTICLE

Josefa Hernández-Ruiz · Antonio Cano  
Marino B. Arnao

**Melatonin: a growth-stimulating compound present in lupin tissues**

Crecimiento de raíces en *B. juncea*  
(Chen y col., 2009)

Journal of Plant Physiology 166 (2009) 324–328



Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

ScienceDirect

**JOURNAL OF  
PLANT PHYSIOLOGY**

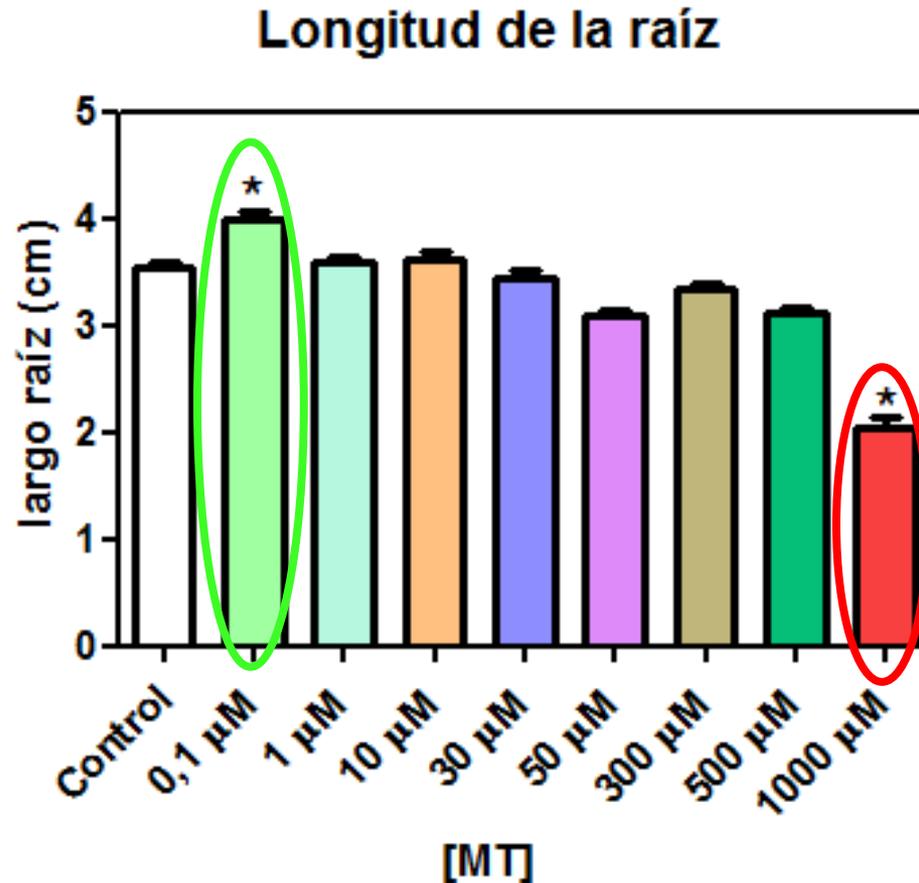
[www.elsevier.de/jplph](http://www.elsevier.de/jplph)

SHORT COMMUNICATION

**Exogenously applied melatonin stimulates root growth and raises endogenous indoleacetic acid in roots of etiolated seedlings of *Brassica juncea***

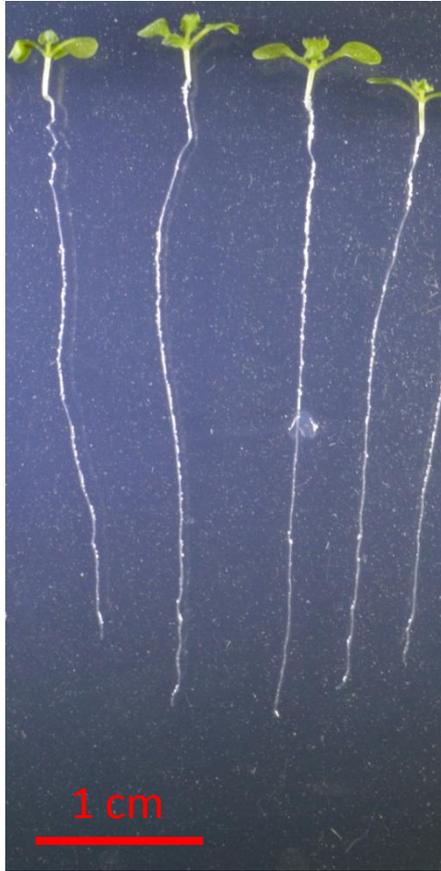
Qian Chen<sup>a,b</sup>, Wen-bo Qi<sup>c</sup>, Russel J. Reiter<sup>c</sup>, Wei Wei<sup>a,\*</sup>, Bao-min Wang<sup>d</sup>

# Efecto de diferentes concentraciones de MT en plántulas



Media + SE del largo de la raíz de 10 plántulas para cada tratamiento. Los asteriscos indican diferencias significativas entre los tratamientos y el control de acuerdo al ANOVA y posterior test de comparación múltiple de Bonferroni ( $p < 0,05$ ).

Control



MT 0,1  $\mu$ M

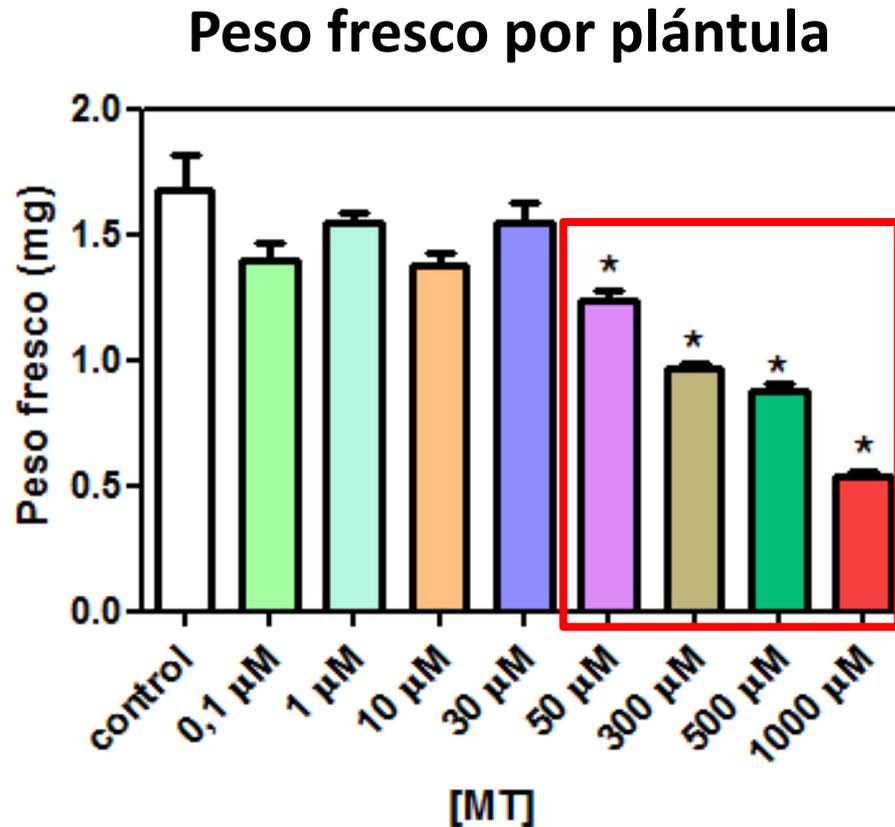


MT 1000  $\mu$ M



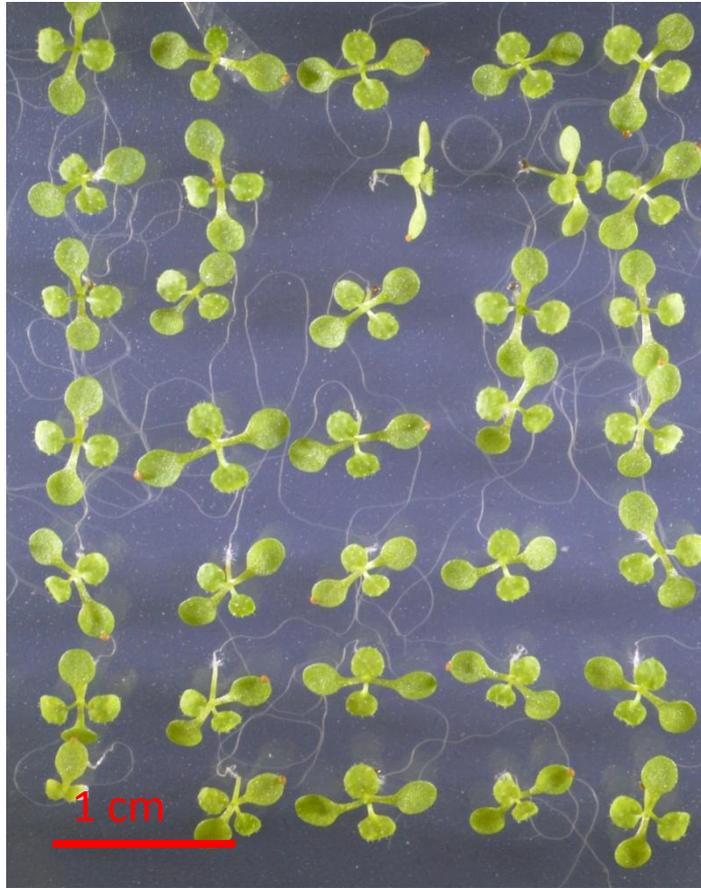
Fotos representativas de plántulas de 14 días de edad cultivadas en placas de petri en cámara de cultivo, con un fotoperíodo de 12h luz/12 h oscuridad con distintas concentraciones de MT.

# Efecto de diferentes concentraciones de MT en plántulas

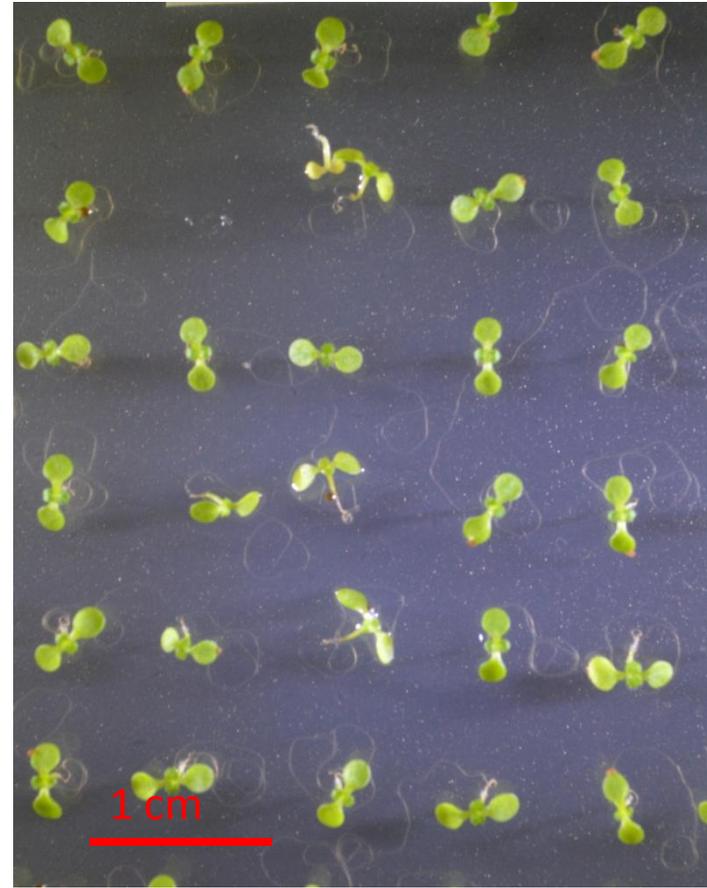


Media  $\pm$  SE del peso fresco de las plántulas. Se utilizaron 5 grupos de 10 plántulas cada uno para cada tratamiento. Los asteriscos indican diferencias significativas entre los tratamientos y el control de acuerdo al ANOVA y posterior test de comparación múltiple de Bonferroni ( $p < 0,05$ )

Control

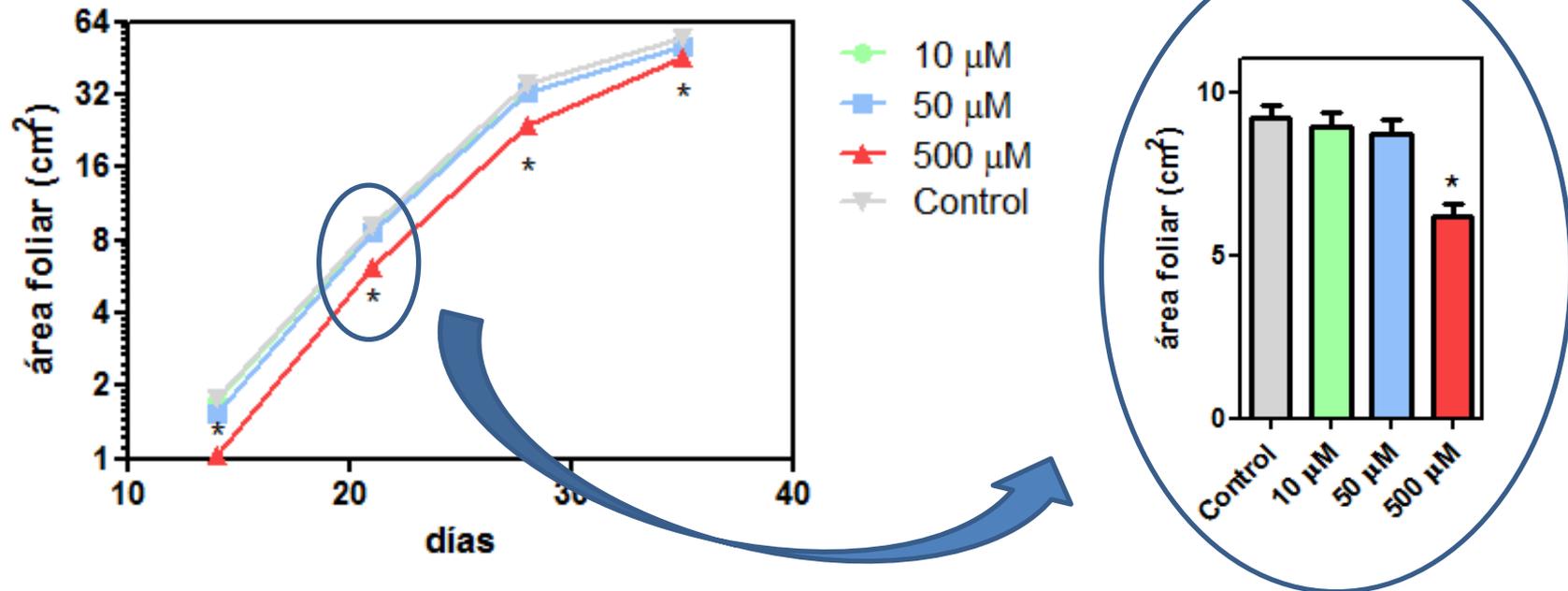


MT 500  $\mu$ M

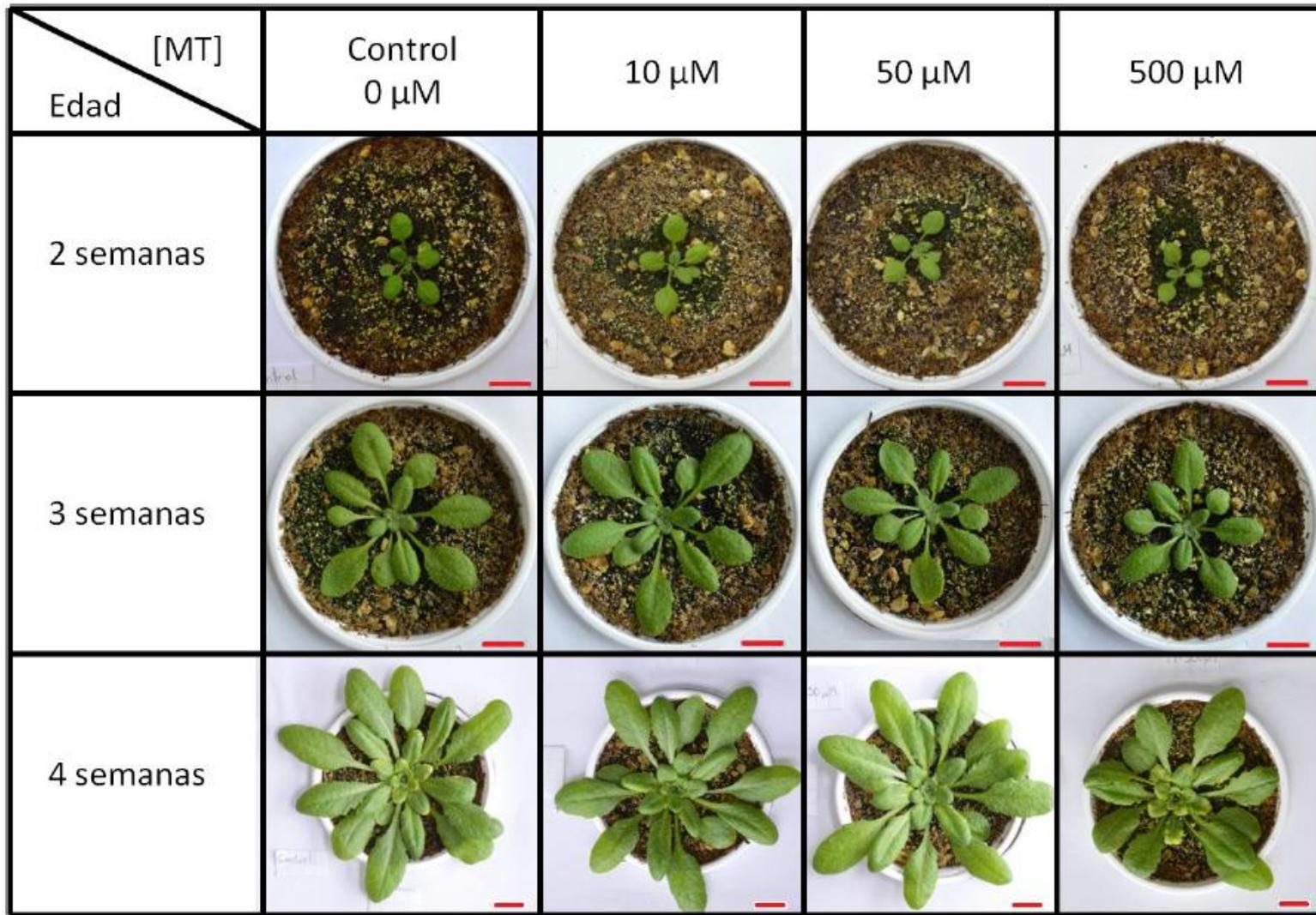


Fotografías representativas de plántulas control y con agregado de melatonina (500  $\mu$ M) cultivadas en placas de petri en cámara de cultivo, con un fotoperíodo de 12h luz/12 h oscuridad.

# Elevadas concentraciones de MT reducen el área foliar

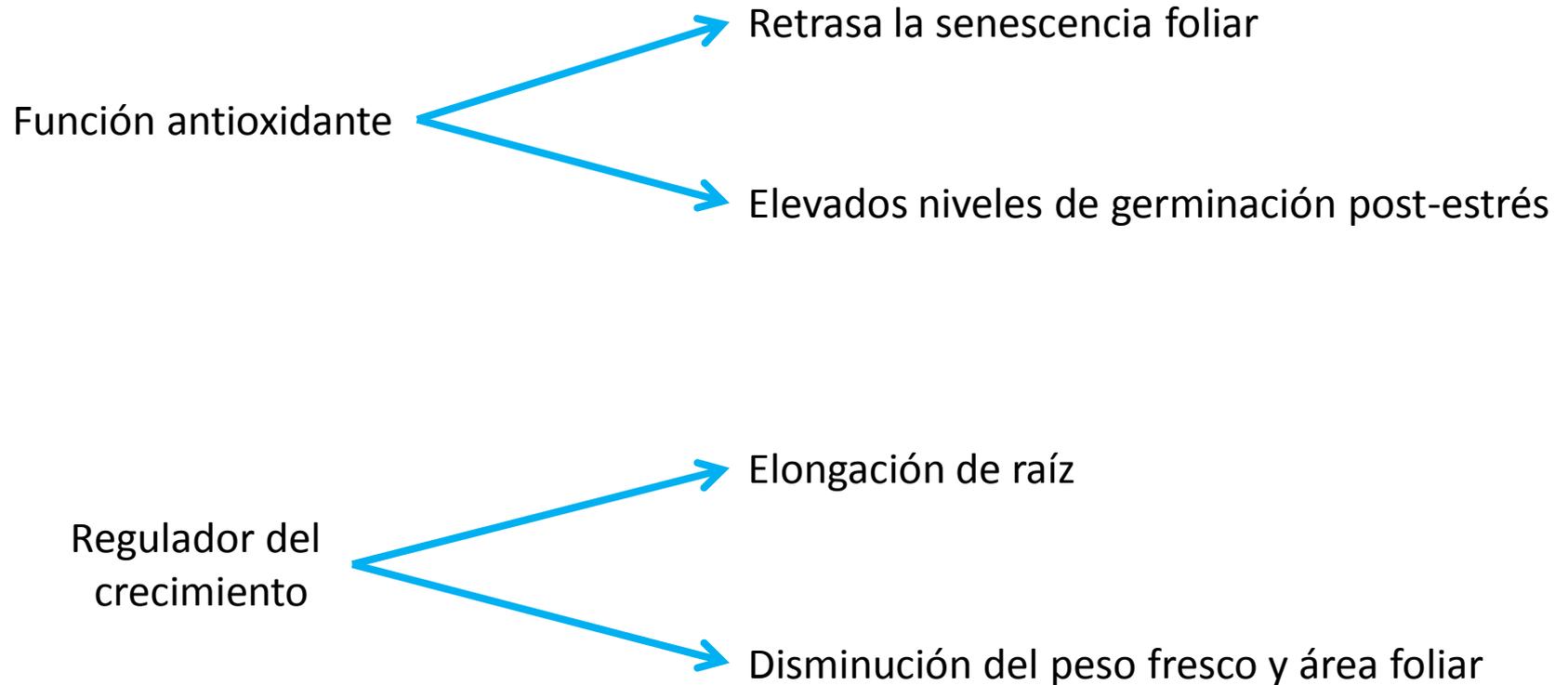


Efecto de melatonina exógena sobre el área foliar de plantas de *Arabidopsis thaliana* enriquecidas con 1 mL de diferentes soluciones de melatonina tres veces por semana. Los datos se expresan como la media  $\pm$  SE de al menos diez réplicas. Los asteriscos (\*) indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos y el control de acuerdo al ANOVA y posterior test de comparación múltiple de Bonferroni ( $P < 0,05$ ).



Fotografías representativas del tamaño de las plantas en los diferentes tratamientos con MT (control, 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$ ) a las 2, 3 y 4 semanas de edad. La barra roja representa una longitud de 1cm.

# Conclusiones Parciales



# Conclusiones Generales

- Se desarrollaron metodologías analíticas novedosas para la determinación de MT y compuestos relacionados en diversas matrices vegetales y vinos.
- No se detectó MT en vinos terminados. En su lugar se identificó un isómero, cuya biosíntesis ocurriría durante la fermentación.
- *Saccaromices* juega un rol crucial en la producción de melatonina y su isómero. Además, se observó que triptófano (precursor de MT) estimula la síntesis del isómero en vinos.

# Conclusiones Generales

- MT no presenta una fluctuación diaria en *Arabidopsis* como ha sido reportado en otras plantas.
- Existe al menos un gen homólogo a la HIOMT en *Arabidopsis thaliana*.
- MT cumple un rol antioxidante en plantas aliviando el estrés por calor en semillas y retrasando la senescencia foliar en plantas adultas.
- MT cumple un rol similar al de auxinas.
- Se han logrado importantes avances en la generación de conocimiento para dilucidar el rol biológico de MT en plantas.



GRACIAS

Bathbells