

Evolución del contenido de amigdalina y prunasina durante el desarrollo de la almendra (*Prunus dulcis* Miller)

Evolution of the amygdalin and prunasin content during the development of almond (*Prunus dulcis* Miller)

G. Arrázola Paternina¹, F. Dicenta lopez-Higuera² y N. Grané Teruel³

¹Universidad de Córdoba. Programa de Ingeniería de Alimentos. Facultad de Ciencias Agrícolas. Grupo de Investigación Procesos y Agroindustria de Vegetales. Carrera 6 N°76-103, Km 3, vía Cereté. Córdoba, Colombia. ²Departamento de Mejora y Sanidad Vegetal, CE-BAS. CSIC. España. ³Departamento de Química Analítica y Bromatología. Universidad Alicante. España.

Resumen

Los compuestos cianogénicos, como compuestos del metabolismo del almendra, sufren cambios durante la formación de la semilla, si bien no hay mucha información sobre este proceso, aún hoy existen pocos estudios del comportamiento de estos compuestos durante su maduración en almendras. El conocimiento de la composición química de la almendra permite tener información sobre el valor alimenticio o nutritivo y sobre las posibles aplicaciones industriales de ésta. Con el objetivo de comparar los contenidos obtenidos de prunasina y amigdalina durante el desarrollo de la almendra, en esta investigación se han estudiado doce (12) variedades de almendra, tres (3) de las cuales son amargas (S3067, S3062, S3056), cuatro (4) ligeramente amargas (S3065, Garrigues, Genco y Tuono) y cinco (5) dulces (Marcona, Del Cid, Peraleja, Ferragnès y Atocha). Los valores de estos compuestos determinados mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) fueron transformados a cianuro total (mg.100g⁻¹). Utilizando la microdifusión sobre todo para las almendras amargas. El compuesto cianogénico encontrado al inicio de la formación del fruto fue la prunasina, mientras que en la maduración sólo fue detectado el diglucósido amigdalina.

Palabras clave: Compuestos cianogénicos, evolución, maduración, modelación, amigdalina.

Abstract

Cyanogenic compounds, such as almond compound metabolism, undergo changes during seed formation, and little is known about this process. There are few studies of the behavior of these compounds during ripening in almonds. The knowledge of the chemical composition of the kernel allows obtaining information of the dietary or nutritional value and possible industrial applications of this. Twelve varieties of almonds were studied, three of which are bitter (S3067, S3062, S3056), (4) four slightly bitter (S3065, Garrigues, Genco and Tuono) and (5) five sweets (Marcona, Del Cid, Peraleja Ferragnès and Atocha). In order to compare the amygdalin and prunasin contents obtained during the development of the kernel, the values of these compounds determined by HPLC were converted to total cyanide ($\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$), using the microdiffusion especially for bitter almonds. The cyanogenic compound found at the beginning of fruit formation was the prunasin while in the maturation was only detected diglucoside amygdalin.

Key words: Cyanogenic compounds, evolution, maturation, modeling, amygdalin.

Introducción

Todos los frutos sufren una serie de cambios físicos y químicos desde la fecundación del óvulo hasta la maduración, cuyo objetivo final es la formación de una semilla viable que garantice la conservación de la especie. Durante todo el proceso de formación del fruto la semilla va acumulando materia seca, que tiene su origen en los hidratos de carbono sintetizados en las hojas y en los elementos minerales tomados del suelo por las raíces (Mikkelsen, 2000). Algunos compuestos permanecen en la semilla como tales y otros se transforman como los glucósidos cianogénicos que actúan como mecanismos de defensas ante ataques de artrópodos, aves, a soportes energéticos para su crecimiento. (Conn, 1988) y Serafimov (1981), estudiaron el desarrollo del fruto de tres variedades de almendro y observaron que el mayor crecimiento en materia seca se produce entre las ocho y las

Introduction

All fruits suffer different physical and chemical changes since the fecundation of the ovule until ripening, which final objective is the formation of a viable seed that would guarantee the preservation of the specie. During all the formation process of the fruit, the seed accumulates dry matter, which origin comes from synthesize carbon hydrate in the leaves and in the mineral elements taken from the soil by the roots (Mikkelsen, 2000).

Some compounds remain in the seed and others transform, such as the cyanogenic glucosides, which act as defense mechanisms towards attacks of arthropods, birds, energetic supports for their growing. Conn (1988) and Serafimov (1981), studied the development of the fruit in three varieties of almonds, and observed that the highest growing in dry matter was produced within eight and four weeks before maturing. Maturing of almond

cuatro semanas antes de la maduración. La maduración de los frutos en el almendro es una característica varietal que resulta ser independiente de la época de floración, de manera que hay variedades de floración temprana que maduran pronto (como Ramillete), o tarde (Desmayo Largueta) y de floración tardía que maduran temprano (Guara y Antoñeta) o tarde (Wawona). En una misma localización se pueden encontrar diferencias de maduración entre variedades de hasta dos meses (Dicenta y García, 1993).

El almendro, es una especie con una gran variabilidad genética como consecuencia de esto es la gran cantidad de variedades que se encuentran. Durante la cosecha del almendro frecuentemente se encuentran almendras amargas, debido a la presencia del glucósido cianogénico amigdalina Conn (1980); Polesello y Rizzolo (1989); Frehner *et al.* (1990), estos glucósidos cianogénicos, tienen la capacidad de producir ácido cianhídrico en condiciones muy determinadas de pH y en presencia de enzimas específicas (Vetter 2000), lo que conlleva a niveles de toxicidad.

Los compuestos cianogénicos encontrados al inicio de la formación del fruto son los monoglucosidos prunasina mientras que en la maduración sólo fueron detectados los diglucósido amigdalina almendro (Frehner *et al.* 1990). Durante los últimos doce años, se ha logrado establecer y comprender la biosíntesis de los glucósidos cianogénicos (Kakes, 1990) y glucosinolatos (Bath, 1983; Du *et al.* 1995; Jones, 1998; Wittstock y Halkier, (2002); Vetter, (2000); Gleadow y Woodrow, (2002);

fruits is a varietal characteristic that is independent the flowering season; thus, there are early flowering phases that mature soon (such as Ramillete) or delay (Desmayo Largueta), and late flowering that mature early (Guara and Antoñeta) or late (Wawona). In the same location, there might be ripening differences among varieties o even two months (Dicenta and García, 1993).

Almond, is a specie with great genetic variability; consequently, the great quantity of variables present on it. During its harvest, bitter almonds are frequently found, due to the presence of the cyanogenic glucoside amygdalin Conn (1980); Polesello and Rizzolo (1989); Frehner *et al.* (1990), these cyanogenic glucosides have the capacity of producing hydrocyanic acid in determined pH conditions and in presence of specific enzymes (Vetter, 2000), which causes toxicity levels.

The cyanogenic compounds found at the beginning of the fruit formation are prunasin monoglucosides; meanwhile, in the ripening only diglucoside amygdalin was found in almond (Frehner *et al.*, 1990). For twelve years, the biosynthesis of the cyanogenic glucosides has been established and understood (Kakes, 1990) y glucosinolatos (Bath, 1983; Du *et al.*, 1995; Jones, 1998; Wittstock and Halkier, (2002); Vetter, (2000); Gleadow and Woodrow, (2002); Zagrobely *et al.* (2004); Sánchez-Pérez *et al.* (2008), Arrázola *et al.* (2012). The cyanogenic compounds, such as metabolism compounds of almonds, suffer changes during the seed formation, and there is little information about it. Freshner *et al.*

Zagrobelny *et al.* (2004); Sánchez-Pérez *et al.* (2008), Arrázola *et al.* (2012).

Los compuestos cianogénicos, como compuestos del metabolismo del almendro, sufren cambios durante la formación de la semilla, si bien no hay mucha información sobre este proceso. Frehner *et al.* (1990) estudiaron la evolución de estos compuestos en judía de lima, en semillas de lino y en almendras amargas. Durante la investigación comprobaron que en el almendro los compuestos cianogénicos empezaron a aumentar justo después de la floración, estabilizándose antes de la maduración. Por el contrario, en el lino las flores tuvieron un mayor contenido (Frehner *et al.* 1990). Algunos resultados muestran que los cambios en la calidad y atributos de los productos alimenticios en general, obedecen a cinéticas de orden cero, primer y segundo orden, Jensen y Risbo, (2007); Palazón *et al.* (2009). Por lo tanto, estos tipos de cinética y su respectivo pseudo orden fueron utilizados en los análisis Vega-Galvez *et al.* (2008), Saavedra *et al.* (2013). Arrázola *et al.* (2014) estudió los niveles y concentraciones de compuestos cianogénicos en almendras, permitiendo clasificar las variedades en amargas y no amargas, lo cual permitirá mejorar y disminuir los problemas de sabor en la industria del turrón, mazapán y amaretto.

El objetivo de esta investigación fue estudiar la evolución de la amigdalina y la prunasina durante el desarrollo de la almendra, con el objeto de conocer su metabolismo y de predecir mediante un modelo matemático (Arrhenius) el contenido de estos compuestos cianogénicos en

(1990) studied the evolution of these compounds in lima bean, linseed and bitter almonds. During their research, the authors proved that in almond the cyanogenic compounds started to increase after flowering, stabilizing after ripening. On the contrary, in linseed, the flowers had a higher content (Frehner *et al.*, 1990). Some results show that the changes in the quality and attributes of food products in general, obey to zero, first and second order kinetics, Jensen and Risbo, (2007); Palazón *et al.* (2009). Therefore, these types of kinetics and their corresponding pseudo order were used in the analyses carried out by Vega-Galvez *et al.* (2008), Saavedra *et al.* (2013). Arrázola *et al.* (2014), who studied the levels and concentrations of cyanogenic compounds in almonds, allowing to classify the bitter and non-bitter varieties, which will allow to improve and reduce the taste problems in the nougat, marzipan and amaretto industry.

The objective of this research was to study the amygdalin and prunasine evolution during the development of the almond, with the aim of knowing their metabolisms and predict, through a mathematician model (Arrhenius) the content of these cyanogenic compounds in a specific moment of the fruit's development.

Materials and methods

The almond varieties studied in the current research were selected from the experimental farm "Tres Caminos", which belong to the Soil and Applied Biology of Segura (CEBAS), Superior Board of Scientific Research

un momento dado del desarrollo del fruto.

Materiales y métodos

Las variedades de almendro estudiadas en el presente trabajo se seleccionaron de la finca experimental “Tres Caminos” del Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS), del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). La finca está situada en Santomera (Murcia), a una altitud media de 130 metros, con veranos muy calurosos e inviernos suaves y con temperaturas mínimas que no suelen bajar de 0°C. Los árboles, de edades diferentes, se encuentran con riego localizado y a diferente marco de plantación según los casos.

Se estudiaron doce variedades de almendra, tres de las cuales son amargas (S3067, S3062, S3056), cuatro ligeramente amargas (S3065, Garrigues, Genco y Tuono) y cinco dulces (Marcona, Del Cid, Peraleja, Ferragnès y Atocha). El estudio se llevó a cabo durante dos años consecutivos, (2012- 2013). Cada año, por separado, una muestra de 50 almendras de cada variedad fue tomada aleatoriamente a intervalos de 30 días desde la floración hasta maduración del fruto. La maduración del fruto, se produce entre las 25 y las 30 semanas tras la floración, dependiendo de la variedad y de las condiciones medio ambientales del cultivo. Las muestras fueron preparadas, las almendras fueron desprovistas del mesocarpo e introducidas en bolsas de malla, debidamente etiquetadas. Posteriormente, las muestras se llevaron al laboratorio del De-

(CSIC). The farm is located in Santomera (Murcia) at a mean altitude of 130 meters, with very hot summers and soft winters, with minimum temperatures that normally do not reduce to 0°C. The trees with different ages are under located irrigation and at different cropping according to the cases.

Twelve almond varieties were studied, three of which are bitter (S3067, S3062, S3056), four slightly bitter (S3065, Garrigues, Genco and Tuono) and five sweets (Marcona, Del Cid, Peraleja, Ferragnès and Atocha). The research was carried out for two years in a row (2012-2013). A sample of 50 almonds was taken from each variety and each year, separately. The sample was taken at random at 30-day intervals from the flowering to the ripening of the fruit. The fruit ripening is produced from 25 to 30 weeks after flowering, depending on the variety and the environmental conditions of the crop. The samples were prepared, the mesocarp was eliminated from the almonds and these were introduced in mesh bags, and labeled. Subsequently, were taken to the laboratory that belongs to the Analytical Chemistry Department of the Alicante University, for their analyses.

Once in the laboratory, the almonds dehusked manually using a hammer, a taking care of not damaging the seed; later, were prepared for their preservation without eliminating the tegument, since naturally it works as a protector and helps controlling rooting. In the current research, the samples were preserved lyophilized, with the aim of guaranteeing that the physic-chemical

partamento de Química Analítica de la Universidad de Alicante para su análisis.

Una vez en el laboratorio las almendras se descascararon manualmente con un martillo, teniendo especial cuidado de no dañar la semilla y se prepararon para su conservación, sin eliminación del tegumento, pues de manera natural este sirve de protección y ayuda a controlar enranciamiento. En el presente trabajo las muestras se conservaron liofilizadas, con el fin de garantizar que las características fisicoquímicas y organolépticas no se alteraran. La determinación de los compuestos cianogénicos se realizó mediante uso de la técnica HPLC, para poder comparar los contenidos obtenidos de prunasina y amigdalina durante el desarrollo de la almendra, los valores de estos compuestos fueron transformados a cianuro total ($\text{mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$) (Gradziel *et al.* 2001). Dado que el contenido relativo de humedad de la almendra disminuye enormemente durante su desarrollo y al objeto de poder estudiar el desarrollo de la concentración de los compuestos cianogénicos, las concentraciones de prunasina, amigdalina y cianuro total se han referido a peso fresco (Tatsuma, 1996).

Determinación de los glucósidos cianogénicos por HPLC. Se pesaron 0,2 g de almendra si esta es amarga y 0,4 g si la almendra es dulce o ligeramente amarga. Se introdujeron en un tubo de centrifuga junto con 5 mL de metanol de grado HPLC, se taparon y se dejaron durante 12 y 30 horas en baño con agitación a 30°C. Culminado este tiempo, las muestras se centrifugaron durante 5

and organoleptic characteristics would not alter. The determination of the cyanogenic compounds was done using the HPLC technique, to compare the prunasin and amygdalin contents obtained during the development of the almond, the values of these compounds were transformed to total cyanide ($\text{mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$) (Gradziel *et al.*, 2001). Since the relative humidity content of almond reduces during its development, and with the aim of studying the concentration development of cyanogenic compounds, the prunasin, amygdalin and total cyanide concentrations have referred to a fresh weight (Tatsuma, 1996).

Determination of the cyanogenic glucosides by HPLC.

0.2 g of the almond was weighted if the almond was bitter and 0.4 g if the almond was sweet or slightly bitter. Were introduced into a centrifuge tube along to 5 mL of methanol and covered and sat still for 12 and 30 hours, agitating at 30°C. After this time, the samples were centrifuged for 5 minutes at 3000 rpm and left to stand trying not to mix again the sediment formed. The supernatant was taken with a syringe, filtering it through a nylon Millipore disc of 0.45 μm , to eliminate the impureness that might affect the resolution of the chromatogram and shorten the useful life of the chromatographic column. When the sample obtained belongs to sweet or slightly bitter almonds, the filtered extract is injected directly, but in the case of the bitter, depending on the analyte concentration in the sample, it must reduce 1:5, 1:10 or even 1:20.

minutos a 3000 rpm se dejaron reposar tratando de no mezclar nuevamente el sedimento formado. El sobrenadante se tomó con una jeringa apropiada filtrándola a través de un disco Millipore de Nylon de 0,45 μm , para eliminar las impurezas que pueden afectar en la resolución del cromatograma y acortar la vida útil de la columna cromatográfica. Cuando la muestra obtenida es de almendras dulces ligeramente amargas se inyecta el extracto filtrado directamente, pero en el caso de las amargas dependiendo de la concentración del analito en la muestra se tiene que diluir 1:5, 1:10 o incluso 1:20.

Condiciones cromatográficas. Se utilizó un cromatógrafo líquido de alta eficiencia marca Waters Modelo 600 Controller, entrega de solventes con gradiente cuaternario modelo 600E, Inyector manual Rheodine 7125, Detector de Arreglo de Diodos Waters modelo 996, columna (Symmetry C18, Waters, 250 x 4.6 mm, 5 μm), además una pre columna C18 con objeto de preservar la columna, software millenium 2008. Otras condiciones cromatograficas fueron, volumen de muestra 20 μL , Flujo de la fase móvil 1,3 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, composición de la fase móvil: acetonitrilo: agua (20:80% v/v) isocrática, tiempo de elución: 10 minutos.

Puesta a punto del método de microdifusión. El análisis por microdifusión se divide en dos etapas:

La primera de ellas consiste en la hidrólisis de los glucósidos cianogénicos de la muestra y la posterior difusión del ácido cianhídrico generado.

Chromatographic conditions.

A high efficient liquid chromatographer brand Waters model 600 controller was used, as well as solvent with quaternary gradient model 600E, manual injector Rheodine 7125, Diode arrangement detector Waters model 996, column (Symmetry C18, Waters, 250 x 4.6 mm, 5 μm), also a pre-column C18 with the aim of preserving the column, a millennium software 2008. Other chromatographic conditions were sample volume 20 μL , flow of the mobile phase 1.3 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, composition of the mobile phase: acetonitrile : water (20:80% v/v) isocratic, elution time: 10 minutes.

Microdiffusion method. The microdiffusion analysis is divided into two phases:

The first consists on the hydrolysis of cyanogenic glucosides of the sample and the posterior diffusion of the hydrocyanic acid generated.

The second phase consists on the quantitative determination of the cyanide generated by the diffusion of hydrocyanic acid, which reacts to a dissolution of sodium hydroxide that is in a collector for that purpose inside the reaction glass. The determination was carried out by different methods depending on the concentration level of the cyanogenic glucoside. For samples with cyanide content under 41.9 $\text{mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$ the colorimetric determination was used; for samples with cyanide content over 41.9 $\text{mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$ the determination is used with gravimetric valuing. The cyanide concentration after amygdalin or prunasin is obtained with the following calculus:

La segunda etapa consiste en la determinación cuantitativa del cianuro generado por la difusión del ácido cianhídrico, que reacciona con una disolución de hidróxido sódico contenido en un recipiente colector dispuesto para tal fin dentro del vaso de reacción. La determinación se lleva cabo por distintos métodos dependiendo del nivel de concentración del glucósido cianogénico: Para muestras con contenido en cianuro por debajo de 41,9 mg.100 g⁻¹, se utiliza la determinación colorimétrica, para muestras con contenido en cianuro por encima de 41,9 mg.100 g⁻¹, se realiza la determinación mediante valoración gravimétrica. La concentración de cianuro a partir de amigdalina o prunasina se obtiene mediante el siguiente cálculo:
mg cianuro.100 g⁻¹ muestra seca =

$$\left[\frac{M * Pm * V}{Pi} \right] * 100$$

M = Molaridad de amigdalina o prunasina

Pi = Peso de la muestra (g).

Pm = Masa molecular del cianuro

V = volumen de extractante (μL)

Análisis estadístico. Los datos del contenido de amigdalina (mg.100 g⁻¹ de muestra seca) del conjunto de variedades durante los dos años de estudio, fueron sometidos a un análisis de la varianza para determinar las diferencias entre años y variedades, realizando posteriormente una comparación de medias mediante la prueba de Tukey. Este mismo análisis se repitió considerando únicamente las variedades dulces y ligeramente amargas. Todos los resultados se expresaron como media ± desviación estándar, de tres réplicas para cada

mg cianide. 100 g⁻¹ dry sample =

$$\left[\frac{M * Pm * V}{Pi} \right] * 100$$

M = Molarity of amygdalin and prunasin

Pi = Sample weight (g).

Pm = Molecular mass of the cyanide

V = Extracting volumen (μL)

Statistical analysis. The data of the amygdalin content (mg.100 g⁻¹ of dry sample) of the varieties throughout the two years under research were submitted to a variance analysis for determining the differences among years and varieties, with a posterior mean comparison using Tukey test. The same analysis repeated only considering the sweet and slightly bitter varieties.

All the results were expressed as mean ± standard deviation of three replicates for each experimental condition. To value the kinetic behavior of the cyanogenic compounds the amygdaline concentrations converted to cyanide were obtained using the equation (1), for different kinetic orders (n= 0, n=1, n=2) and the adjustment of the experimental data through an adjustment procedure of minimal squares. The data analysis was determined with a mathematical model with a second order approximation of a differential equation that allows knowing the content of these compounds in a given variety, in function of its development phase.

Results and discussion

Table 1 shows the mean values of the cyanide content for two years

condición experimental. Para valorar el comportamiento cinético de los compuestos cianogénicos se obtuvo las concentraciones de amigdalina convertidos a cianuro, mediante la ecuación (1), para diferentes órdenes cinéticos ($n=0$, $n=1$, $n=2$) y el ajuste de los datos experimentales a través de un procedimiento de ajuste de mínimos cuadrados. El análisis de los datos se determinó con un modelo matemático mediante aproximación de segundo orden de una ecuación diferencial, que permite conocer el contenido de estos compuestos en una variedad dada, en función de su estado de desarrollo.

Resultados y discusión

El cuadro 1 muestra los valores medios del contenido de cianuro durante dos años, obtenidos a partir de la amigdalina y prunasina (mediante HPLC) y de cianuro total obtenidos mediante microdifusión, expresados en mg cianuro.100 g⁻¹ de muestra fresca, el modelo ajusta antes de llegar a la concentración casi constante que es en los últimos días de las tomas de muestras, días 180-240, para los parámetros (m , b , k , R^2 y A_0). Se observó un comportamiento similar de la evolución de los compuestos cianogénicos dentro de cada grupo de variedades (dulces, ligeramente amargas y amargas). Resultados similares fueron reportados por (Jones, 1998). Por ello en la figura 1 se ha representado la evolución de algunos compuestos durante el desarrollo de la almendra para cada uno de los grupos citados (ligeramente amargas). Se observa una buena correspondencia entre los contenidos de cianuro obtenido mediante HPLC (equivalentes

obtenido after the amygdalin and prunasin (with HPLC) and total cyanide obtained with microdiffusion, expressed in mg cyanide.100 g⁻¹ of fresh matter, the model adjusts before reaching the almost steady concentration, which is in the last days of sampling, days 180-240 for the parameters (m , b , k , R^2 and A_0). A similar behavior of the evolution of cyanogenic compounds was observed on each group of varieties (sweet, slightly bitter and bitter). Similar results were reported by Jones (1998). In figure 1 is represented the evolution of some compounds during the development of the almond for each of the cited groups (slightly bitter). A good correspondence among the cyanide content obtained through HPLC is observed (equal to amygdalin + prunasin) in all the cases, which confirms that amygdalin and prunasin are the only cyanogenic glucosides present in almond.

The evolution of the total cyanide and amygdaline was similar in the three variety groups (sweet, bitter and slightly bitter, figures 3 and 4). Until day 120, the cyanide levels were practical inexistent. Later, an increment is experience approximately from days 120 to 180 until stabilizing, especially after day 210. The prunasin content kept very low generally throughout the development of the fruit (absent in some cases of sweet almonds) to disappear in all the cases when the almond was ripened. Since prunasin is the monoglucoside present in the vegetative phase and this compound is not found on the ripened almond, the aim is to deepen in the role of this compound in the amygdalin

Cuadro 1. Valores medios de contenido de cianuro obtenido por HPLC (mg de cianuro. 100 g⁻¹ de muestra seca).

Cultivar	mgCN.100 g ⁻¹												
	2012					2013							
	Floración	Maduración	Floración	Maduración	Maduración	Floración	Maduración	m	b (-)	k	R ²	A ₀	
Dulces													
Ferragnes	57±1	230±2	59±1,3	234.8±1,7	0,0362	-0,78	0,0362	0,99	0,004				
Del Cid	52±2	230±3,2	53±2	239.2±0,9	0,0330	-0,79	0,0362	0,99	0,003				
Peraleja	49±1,3	212±1	52±1	215.1±2,5	0,0399	-9,49	0,0399	0,98	0,001				
Marcona	53±1	236±1,4	56±1,4	278.4±3	0,0313	-7,97	0,0313	0,99	0,003				
Atocha	44±0,6	212±2,1	49±1,6	235.2±2,4	0,0312	-6,57	0,0312	0,98	0,001				
Ligeramente amargas													
Genco	62±0,9	237±3	61±3	242.0±2	0,0297	-5,63	0,0297	0,99	0,003				
Garrigues	41±0,8	224±2,2	59±1	220.5±3,1	0,0306	-5,44	0,0306	0,97	0,004				
Tuono	61±1	212±1	63±2,1	223.6±1,5	0,0327	-5,79	0,0327	0,99	0,003				
S3065	44±0,9	215±3,1	49±1,6	213.7±2	0,0478	-6,10	0,0478	0,99	0,002				
Amargas													
S3062	44±0,6	206±1	48±2	274.6±1	0,0559	-4,62	0,0559	0,99	0,009				
S3056	44±0,9	210±1,9	51±1	221.5±2	0,0551	-4,85	0,0551	0,99	0,007				
S3067	44±0,7	215±1,8	40±1,4	231.5±2,1	0,0531	-3,53	0,0531	0,99	0,029				

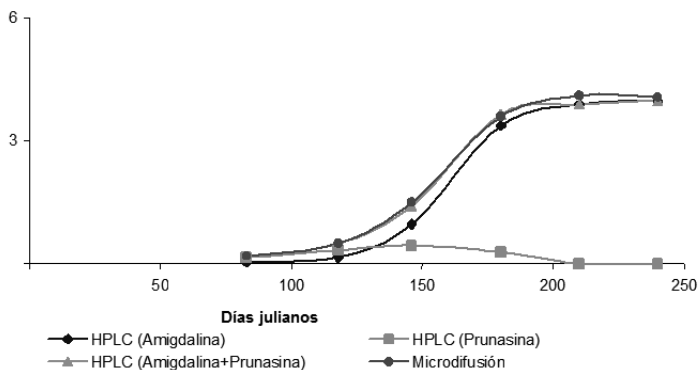


Figura 1. Evolución del contenido de cianuro ($\text{mg}/100 \text{ g}^{-1}$ de muestra fresca) calculado a partir del contenido de amigdalina y prunasina (HPLC) y mediante microdifusión en almendras ligeramente amargas (S3065, Garrigues, Tuono y Genco).

Figure 1. Evolution of the cyanide content ($\text{mg}/100 \text{ g}^{-1}$ of fresh sample) calculated after the amygdalin and prunasin content (HPLC) and through the micro-difussion in slightly bitter almonds (S3065, Garrigues, Tuono and Genco).

de amigdalina + prunasina) en todos los casos, lo que confirma que la amigdalina y la prunasina son los únicos glucósidos cianogénicos presentes en la almendra.

La evolución del cianuro total y de la amigdalina fue similar en los tres grupos de variedades (dulces, amargas y ligeramente amargas, figuras 3 y 4). Hasta el día 120 los niveles de cianuro son prácticamente inexistentes. Luego se experimenta un incremento aproximadamente entre los días 120 y 180 para luego estabilizarse, sobre todo a partir del día 210. El contenido en prunasina se mantuvo muy bajo en general a lo largo del desarrollo del fruto (ausente en algunos casos de las dulces), para desaparecer en todos los casos cuando la almendra estuvo madura. Dado que la prunasina es el mono glucósido presente en la parte

accumulation in the almond. In figures 2 and 3, is shown the total cyanide percentage due to the amygdalin and prunasine during the development of the almond, in the case of bitter and slightly bitter almonds, respectively. It can be observed that the contribution of amygdalin to the total cyanide content increases throughout successive development phases of the fruit, until becoming the only cyanide source when the almond is ripened. In all the cases, a lineal variation for the temperature has been supposed throughout the maturation period, considering a mean temperature of 10°C for the day 83 until a mean temperature of 25°C for the day 240 of the year.

Since all the variables have a similar behavior regarding the cyanide evolution in the seed, a mathematical

vegetativa y que este compuesto no se encuentra en la almendra madura, se ha querido profundizar en el papel de este compuesto en la acumulación de amigdalina en la almendra. En las figuras (2 y 3), se muestra el porcentaje del cianuro total debido a la amigdalina y a la prunasina durante el desarrollo de la almendra, en el caso de las amargas y las ligeramente amargas respectivamente. Puede observarse que la contribución de amigdalina al contenido de cianuro total va incrementándose a lo largo de las sucesivas etapas del desarrollo del fruto, hasta llegar a ser la única fuente de cianuro cuando la almendra está madura. En todos los casos se ha supuesto una variación de tipo lineal para la temperatura a lo largo del periodo de maduración, considerando una tem-

model established that would allow estimating the cyanide concentration in the seed in function to its development and independence of the variety considered. Considering the importance of the environment temperature in the biochemical processes and taking into account that it increases gradually during the development of the fruit, a kinetic model is used, that contemplates the temperature variations in the seed evolution Goula *et al.*, 2006; Kirca and Cemeroglu (2003), Kaymak-Ertekin and Gedik (2005), Di Scalaa and Crapiste (2008). If considering the transformation of a reactive® in a product (P) with a kinetic order of “n”, the appearance speed of the product is expressed with the following differential equation:

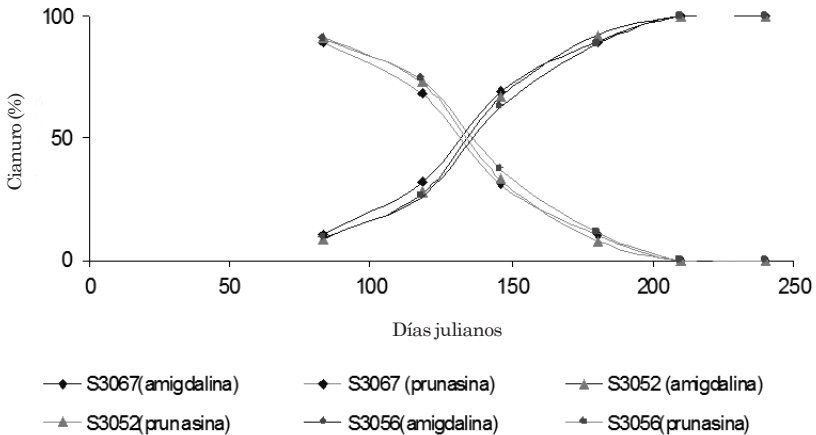


Figura 2. Porcentaje del cianuro total debido a la amigdalina y a la prunasina (determinadas con HPLC) durante el desarrollo de la almendra para muestras amargas. S3056, S3062, S3067.

Figure 2. Total cyanide percentage due to amygdalin and prunasin (determined with HPLC) during the development of the almond for bitter samples. S3056, S3062, S3067.

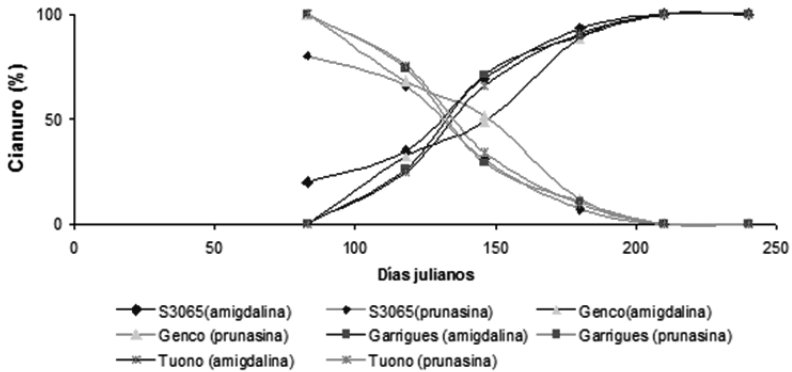


Figura 3. Porcentaje del cianuro total debido a la amigdalina y a la Prunasina (determinadas con HPLC) durante el desarrollo de la almendra para muestras ligeramente amargas.

Figure 3. Total cyanide percentage due to amygdalin and prunasin (determined with HPLC) during the development of the almond for slightly bitter samples.

peratura media de 10°C para el día 83 del año hasta una temperatura media de 25°C para el día 240 del año.

Dado que todas las variedades siguen una pauta similar respecto a la evolución de cianuro en la semilla, se estableció un modelo matemático que permitiera estimar la concentración de cianuro en la semilla en función de su estado de desarrollo y la independencia de la variedad considerada. Esto teniendo en cuenta la importancia de la temperatura ambiente en los procesos bioquímicos y considerando que ésta aumenta gradualmente durante el desarrollo del fruto, se utiliza un modelo cinético que contempla las variaciones de temperatura a lo largo de la evolución de la semilla, Goula *et al.* 2006; Kirca and Cemeroglu (2003), Kaymak-Ertekin and Gedik (2005), Di Scalaa and Crapiste (2008). Si se parte de la trans-

$$\frac{d[P]}{dt} = K[P]^n \quad (1)$$

Where, [P] = product concentration, t = Time, K = reaction constant. If considering the effect caused by the temperature variation, the K constant will be:

$$K = K_0 \cdot e^{-E/RT} \text{ (Arrhenius equation)} \quad (2)$$

Where, K_0 = constant, E = activation energy, R = gases constant, T = temperature.

Therefore, the differential expression of the speed apparition of a product (P) is:

$$\frac{d[P]}{dt} = K_0 \cdot e^{-E/RT} \cdot [P]^n, \quad (3)$$

Doing the corresponding transformations, considering the temperatures and the concentration

formación de un reactivo (R) en un producto (P) que sigue una cinética de orden “n”, la velocidad de aparición del producto se expresa mediante la siguiente ecuación diferencial:

$$\frac{d[P]}{dt} = K[P]^n \quad (1)$$

Donde, [P] = Concentración de producto, t = Tiempo, K = Constante de reacción. Si se considera el efecto provocado por la variación de la temperatura, la constante K vendrá dada por:

$$K = K_0 \cdot e^{-E/RT} \text{ (Ecuación Arrhenius) (2)}$$

Donde, K_0 = Constante, E = Energía de activación, R = Constante de los gases, T = Temperatura.

Por tanto la expresión diferencial de la velocidad de aparición de un producto (P) queda de la forma:

$$\frac{d[P]}{dt} = K_0 \cdot e^{-E/RT} \cdot [P]^n, \quad (3)$$

Realizando las transformaciones correspondientes, teniendo en cuenta las temperaturas y las variaciones de concentración del producto (cianógeno) a través del tiempo, se obtiene la expresión:

$$\frac{d[P]}{dt} = K_0 \cdot e^{-E/R[1/T - 1/T_0]} \cdot [P]^n \quad (4)$$

Donde, K_0' = Constante, T_0 = Temperatura inicial, T = Temperatura en cada tiempo t, Siendo:

$$K_0' = K_0 \cdot e^{-E/RT_0} \text{ Por lo tanto:}$$

$$\Delta[P] = K_0' \cdot e^{-E/R[1/T - 1/T_0]} \cdot [P]^n \cdot \Delta t \quad (5)$$

$\Delta[P]$ = Variación de la concentración de producto formado en un incremento de tiempo Δt

variations of the product (cyanogens) through the time, the following expression is obtained:

$$\frac{d[P]}{dt} = K_0 \cdot e^{-E/R[1/T - 1/T_0]} \cdot [P]^n \quad (4)$$

Where, K_0' = Constant, T_0 = initial temperature, T = Temperature on each time t, being:

$$K_0' = K_0 \cdot e^{-E/RT_0} \text{ Therefore:}$$

$$\Delta[P] = K_0' \cdot e^{-E/R[1/T - 1/T_0]} \cdot [P]^n \cdot \Delta t \quad (5)$$

$\Delta[P]$ = Concentration variation of the product formed in a time increment Δt .

Δt = Time increment. Obtaining the value [P] applying the Euler method:

Considering the product concentration in the time (t- Δt), $\Delta[P]$ = increment in the product concentration in the time Δt . Adjusting the data obtained in the equation to the experimental data for each sample, previously normalized with the aim of performing an homogenization that would allow the posterior mathematical treatment, is obtained: an average value of order reaction n= 2; an average constant reaction value $K_0' = 0.55$; a mean value of E/R = 62330.

Using as adjustment optimization criteria of the mathematical model, that the square sum of the differences among the [P] values calculated by the proposed model and the [P] values experimentally obtained, be minimal. This corresponds to the adjustment method by minimum non linear squares, where the solution is the one that minimizes the sum of residual squares. The regression method is known as non linear regression with

Δt = Incremento de tiempo. Obteniendo el valor de [P] en cada instante aplicando el método de Euler:

Teniendo en cuenta la concentración de producto en el tiempo ($t-\Delta t$), $\Delta[P]$ = Incremento en la concentración de producto en el tiempo Δt . Ajustando los datos obtenidos en esta ecuación a los datos experimentales para cada muestra, previamente normalizados con el objeto de realizar una homogeneización que permita su posterior tratamiento matemático, se obtiene: Un valor promedio de orden de reacción $n=2$; Un valor promedio de constante de reacción $K_0'=0,55$; Un valor medio de $E/R=62330$. Utilizando para ello como criterio de optimización del ajuste del modelo matemático, el que la suma de los cuadrados de las diferencias entre los valores de [P] calculado por el modelo propuesto y los valores de [P] obtenidos experimentalmente, sea mínima. Esto corresponde al método de ajuste por mínimos cuadrados no lineales en el cual la solución es aquella que minimiza la suma de cuadrados residuales. Es el método de regresión conocido como regresión no lineal para el cual hay varios algoritmos implementados en los software de estadística el más utilizado es el método de Levenberg-Marquardt.

En las almendras dulces (Marcona, Del Cid, Peraleja, Atocha y Ferragnès), únicamente se ha detectado amigdalina, y en cantidades muy pequeñas (figura 4). Las amargas (S3067, S3062, S3056) y ligeramente amargas (S3065, Genco, Tuono y Garrigues), presentan a lo largo del desarrollo cantidades variables tanto de amigdalina como de prunasina, si-

lots of algorithms implemented in the statistical software, and the most used is the Levenberg-Marquardt method.

In sweet almonds (Marcona, Del Cid, Peraleja, Atocha and Ferragnès), have only detected amygdalin and in small quantities (figure 4). Bitter almonds (S3067, S3062, S3056) and slightly bitter (S3065, Genco, Tuono and Garrigues), present throughout the development variable quantities of both amygdaline and prunasin, following all the cultivars analyzed the same behavior for both compounds, only differentiating in the concentrations. It is observed a good correspondence among the cyanide contents obtained with HPLC (equal to amygdalin + prunasin) in all the cases, which confirms that the amygdalin and prunasin are the only cyanogenic glucosides present in the almond.

It is verified that the cyanide concentrations measured with the model (Arrhenius) proposed, adjust correctly to the experimental data obtained (figures 3 and 4); thus, the model is valid for the sweet, slightly bitter and bitter varieties studied, figures 1, 2 and 3. The model allows estimating the total cyanide content throughout the development of the almond; even though the real kinetic is not as simple as the proposal, since an amount of prunasin must be produced by the plant and it must consume and amygdalin. Therefore, one part produces an amount of prunasin and the other causes a reduction, due to a transformation reaction of prunasin in amygdalin. The model adjusts well to the need of quantifying in any day, the quantity of compound

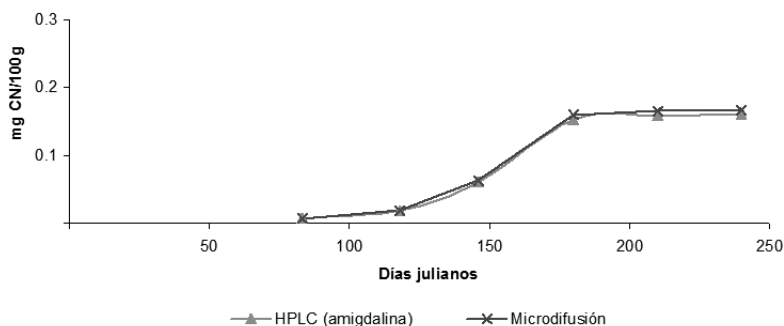


Figura 4. Variación del contenido de cianuro ($\text{mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$ de muestra fresca) calculado a partir del contenido de amigdalina (HPLC) y mediante microdifusión en almendras dulces (Marcona, Del Cid, Peraleja, Ferragnès y Atocha).

Figure 4. Variation of the cyanide content $\text{mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$ of fresh sample) calculated after the amygdalin content (HPLC) and through microdiffusion in sweet almonds (Marcona, Del Cid, Peraleja, Ferragnès and Atocha).

guiendo todos los cultivares analizados el mismo comportamiento para ambos compuestos diferenciándose únicamente en las concentraciones. Se observa una buena correspondencia entre los contenidos de cianuro obtenidos mediante HPLC (equivalentes de amigdalina + prunasina) en todos los casos, lo que confirma que la amigdalina y la prunasina son los únicos glucósidos cianogénicos presentes en la almendra.

Se verifica que las concentraciones de cianuro calculadas con el modelo (Arrhenius) propuesto se ajustan bien a los datos experimentales obtenidos (figuras 3 y 4), por lo que el modelo es válido para las variedades dulces, ligeramente amargas y amargas estudiadas, figuras (1, 2 y 3). El modelo permite estimar el contenido de cianuro total a lo largo del desarrollo de la almendra, si bien la cinética real

produced in the fruit during its ripening. The evolution of the total cyanide and/or amygdalin was similar in the three variety groups (sweet, bitter and slightly bitter), mainly increasing between days 120 and 180, and the final concentrations were evidently superior in the bitter almonds. The amygdalin is presented in minimal concentrations in sweet almonds, mean values in the slightly bitter and high in bitter (table 1). Enriquez *et al.* (2014) evaluated the behavior and degradation of phenolic compounds in apple peels, using the Arrhenius equation. On the other hand, Bosh (2013) evaluated the degradation of vitamin C or ascorbic acid in compote using the Arrhenius equation, determining the lost or stability during the processing time and storing, considering the temperature to evaluate the evolution

no es tan sencilla como la propuesta, ya que se debe producir un aporte de prunasina por parte de la planta, y ésta se debe ir consumiendo para formar amigdalina. Por tanto, por una parte se está produciendo un aporte de prunasina y por otra una disminución, debido a una reacción de transformación de prunasina en amigdalina. El modelo se ajusta bien a la necesidad de cuantificar en cualquier día juliano la cantidad de compuesto producido en el fruto durante su maduración.

La evolución del cianuro total y/o de la amigdalina fue similar en los tres grupos de variedades (dulces, amargas y ligeramente amargas), aumentando principalmente entre los días 120 y 180, si bien las concentraciones finales fueron claramente superiores en las amargas. La amigdalina está presente en concentraciones mínimas en las almendras dulces, valores medios en las ligeramente amargas y elevadas en las amargas, (cuadro 1), Enriquez *et al.* (2014), evaluaron el comportamiento y degradación de compuestos fenólicos en cáscaras de manzana, utilizando la ecuación de Arrhenius. Por otra parte, Bosh, (2013) evaluó la degradación de la vitamina C o ácido ascórbico en una compota mediante la ecuación de Arrhenius, determinando la pérdida o estabilidad durante el tiempo de procesado y almacenamiento teniendo en cuenta la temperatura, para evaluar la evolución de compuestos cianogénicos. En frutos de almendros, hoy por hoy no existen datos reportados por autor alguno, este es un gran aporte de esta investigación.

of the cyanogenic compounds. In almond fruits, there is not any data reported, thus, this research is a great contribution.

Conclusions

The evolution of cyanogenic compounds (amygdalin and prunasin) was similar in the three variety groups (sweets, in the initial phases the amygdalin content is low, but this is not the same for slightly bitter and bitter), mainly increasing from days 120 and 180, and the final concentrations were clearly superior in the bitter. A mathematical model such as the Arrhenius equation allows knowing the content of cyanogenic compounds during the fruit's development in function of the time, temperature and concentration (amygdalin and prunasin) in the almond.

End of english version

Conclusiones

La evolución de los compuestos cianogénicos (amigdalina y prunasina) fue similar en los tres grupos de variedades, (dulces, en sus etapas iniciales el contenido de amigdalina es bajo, no así para las ligeramente amargas y amargas), aumentando principalmente entre los días 120 y 180 si bien las concentraciones finales fueron claramente superiores en las amargas. Un modelo matemático como la ecuación de Arrhenius, permite conocer el contenido de los compuestos cianogénicos

durante el desarrollo del fruto en función del tiempo, temperatura y concentración (amigdalina y prunasina) en la almendra.

Literatura citada

- Arrázola, G., N. Grané, F. Dicenta. 2014. Importancia de los glucósidos cianogénicos en el sabor de frutos de almendros (*Prunus dulcis* Miller) y su incidencia en la agroindustria. Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas - Vol. 8(1):57-66.
- Arrázola, G., R. Sánchez, F. Dicenta and N. Grané. 2012. Content of the cyanogenic glucoside amygdalin in almond seeds related to the bitterness genotype. Agronomía Colombiana 30(2):260-265.
- Bath, D. 1983. *Update on the feeding value of almond hulls*. Berkeley Coop. Ext. Serv. University California pp. 13-15.
- Bosch, V., A. Cilla, G. García-Llatas, V. Gilabert, R. Boix, A. Alegría. 2013. Kinetics of ascorbic acid degradation in fruit-based infant foods during storage. Journal of Food Engineering 116, 298-303.
- Conn, E.E. 1988. *Cyanide Compounds in Biology*. Ciba Foundation Symposium 14 John Wiley & Sons Ltd. Eds. Chichester, pp. 261.
- Conn EE. 1980. Cyanogenic compound Ann. Rev. Plant Physiology. 31, pp. 433-451.
- Dicenta, F. y J. E. García, 1993. *Inheritance of the kernel flavour in almond*. Heredity 70, pp. 308-312.
- Di Scalaa, K., G. Crapiste. 2008. Drying kinetics and quality changes during drying of red pepper. LWT – Food Sci. Technol. 41, 789-795.
- Du, L., M. Bokanga, B.L. Moller y B.A. 1995. Halkier, *The biosynthesis of cyanogenic glucosides in roots cassava*. Phytochemistry 39(5):323-326.
- Henríquez, C., A. Córdova, S. Almonacid, y J. Saavedra. 2014. *Kinetic modeling of phenolic compound degradation during drum-drying of apple peel by-products*. Journal of Food Engineering 143, 146-153.
- Frehner, M., M. Scalet, y EE. Conn. 1990. *Pattern of the Cyanide potential in Developing Fruits*. Plant. Physiology. 94(1):28-34.
- Goula, A., K. Adamopoulos, P. Chatzitakis, A. Vasilios, V. Nikas. 2006. Prediction of lycopene degradation during a drying process of tomato pulp. J. Food Eng. 74, 37-46.
- Gradziel T, P. Martínez-Gómez, F. Dicenta, D. Kester. 2001. The utilization of related Prunus species for almond variety improvement. J. of American Pomological Society 55, pp. 100-108.
- Gleadow, R., I. Woodrow. 2002. *Constraints on effectiveness of cyanogenic glycosides in herbivore defense*. Journal Chemical. Ecol. 28(9):1301-1313.
- Jones, D. 1998. *Why are so many food plants cyanogenic*. Phytochemistry 47(4):115-162.
- Jensen, P., J. Risbo. 2007. Oxidative stability of snack and cereal products in relation to moisture sorption. Food Chem. 103 (3):717-724.
- Kakes, P. 1990. *Properties and functions of the cyanogenic system in higher plants*. Euphytica 48, pp. 25-43 (1990).
- Kaymak-Ertekin, F., A. Gedik. 2005. *Kinetic modelling of quality deterioration in onions during drying and storage*. J. Food Eng. 68, 443-453.
- Kirca, A., B. Cemeroglu. 2003. *Degradation kinetics of anthocyanins in blood orange juice and concentrate*. Food Chem. 81, 583-587.
- Mikkelsen, R. 2000. Nutrient management for organic farming: A case study. J. Nat. Resour. Life Sci. Educ. 29(2):88-92.
- Palazón, M., D. Pérez-Conesa, P. Abellan, G. Ros, F. Romero, M. Vidal. 2009. *Determination of shelf-life of homogenized apple-based beikost storage at different temperatures*

- using Weibull hazard model. LWT-Food Science and Technology 42, 319-326.
- Polesello, A., A. Rizzolo. 1989. *Caratteristiche nutrizionali e utilizzazione industriale delle mandorle*. Frutticoltura 51 (4), pp. 43-50.
- Saavedra, J., A. Córdova, L. Gálvez, C. Quezada, R. Navarro. 2013. *Principal component analysis as an exploration tool for kinetic modelling of food quality: a case study of a dried apple cluster snack*. J. Food Eng. 119, 229-235.
- Sánchez-Pérez, R., C. Jørgensen, M. Olsen, F. Dicenta, B. Møller, B. 2008. *Bitterness in almonds*. Plant Physiology 146(9):1040-1052.
- Serafimov, S. 1981. *A spontaneous hybrid of A. kuramica and A. spinosissima from Afghanistan*. C. R. Academic. Science Agricultural, Bulgaria (4):198-206.
- Tatsuma, T. 1996. *Linamarin sensors: Amperometric sensing of linamarin using linamarase and glucose oxidase*. Journal Electroanalytical Chemistry. 407, pp. 155-159.
- Vega-Gálvez, A., M. Miranda, C. Bilbao-Sáinz, E. Uribe, R. Lemus-Mondaca. 2008. *Empirical modeling of drying process for apple (cv. Granny Smith) slices at different air temperatures*. J. Food Process. Preserv. 32, 972-986.
- Vetter, J. 2000. *Plant cyanogenic glycosides*. Toxicon 38(1):11-36.
- Wittstock, U. y B. Halkier. 2002. *Glucosinolate research in the Arabidopsis era*. Trends Plant Science 7(5):263-270
- Zagrobelyny, M., A. Bak, B. Rasmussen, C. Jørgensen, E. Naumann, B. Møller, B. 2004. *Cyanogenic glucosides and plant-insect interactions*. Phytochemistry 65(4):293-306.