

EXTRACCIÓN DE AMIGDALINA A PARTIR DE SEMILLAS DE *Prunus persica* L.
“DURAZNO” E HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA ENTEROBACTERIANA
AMIGDALINE EXTRACTION FROM PEACH SEEDS (*Prunus persica* L.) AND
ENZYMATIC ENTEROBACTERIAL HYDROLYSIS

Ruiz, M.¹ & García, F.^{1,2}

¹Universidad Ricardo Palma, Facultad de Ciencias Biológicas. Lima – Perú.

²Jefe del Laboratorio de Bioquímica y Nutrición. Universidad Ricardo Palma

fgarcia_2000_pe@yahoo.com/ mario.ruizb@urp.pe

Recibido: 30/04/2018

Aceptado: 26/06/2018

Resumen

El objetivo de este trabajo fue extraer la amigdalina a partir de semillas de *Prunus persica* L. y evaluar la liberación de cianuro por hidrólisis enzimática enterobacteriana. Los cristales de amigdalina fueron extraídos de semillas de duraznos, mediante extracción continua con reflujo simple y soxhlet, empleando agua destilada y etanol 96 ° respectivamente. Se realizó la hidrólisis de amigdalina en caldo de cultivo bacteriano de heces de rata para verificar la liberación de cianuro con nitrato de plata. Se obtuvo 1.3 gramos de amigdalina (5.2%) y se formó un precipitado pardo negruzco en el caldo de cultivo bacteriano, confirmando la presencia de amigdalina.

Palabras claves: Amigdalina, Cianuro, Hidrolisis enterobacteriana, *Prunus*

Abstract

The aim of this work was to extract the amygdalin from seeds of *Prunus persica* L. and evaluate the release of cyanide by enterobacterial enzymatic hydrolysis. Amygdalin crystals were isolated from peach seeds, by continuous extraction with simple reflux and soxhlet, using distilled water and 96 ° ethanol respectively. Amygdalin hydrolysis was carried out in the bacterial culture broth of rat faeces to verify the release of cyanide with silver nitrate. 1.3 grams of amygdalin (5.2%) was obtained and a blackish- brown precipitate formed in the bacterial culture broth, confirming the presence of amygdalin.

Keywords: Amygdalin, Cyanide, Enterobacterial hydrolysis, *Prunus*

1. Introducción

La amigdalina es una toxina vegetal natural correspondiente al grupo de los glucósidos cianogénicos, que se encuentran en los huesos de los frutos de los miembros de las familias Rosaceae, Fabaceae, Poaceae, Araceae, Euphorbiaceae y Passifloraceae., ampliamente distribuidos en el reino vegetal, estando presentes en más de 2500 especies, y en este caso, en la familia Rosaceae, en particular, en las semillas del género *Prunus* (Subfam. *Amygdaloideae*, Tribu *Amygdaleae*) (Arrázola et al., 2013; Ganjewala et al., 2010). Químicamente, se le conoce como D-Mandelonitrilo-beta-genciobiósido.

Se compone de dos unidades de glucosa (genciobiosa), una unidad de benzaldehído y una de cianuro. Este glucósido es sólido y cristalino, con 457,42 g/mol de peso molecular y un punto de fusión de 223-226 °C. Es muy soluble en agua, poco soluble en metanol frío y moderadamente soluble en metanol caliente (Lide, 2003).

Los glucósidos cianogénicos se almacenan en vacuolas dentro de las células vegetales, son biosintetizados a partir de estos dos aminoácidos: L-fenilalanina (L-Phe) o L - tirosina (L - Tyr). Forman aldooximas y luego hidroxinitrilos con ayuda del citocromo P450 en ambos procesos, y al final, se forma el glucósido cianogénico con la enzima.

UDP – glucosiltransferasa (Arrázola et al., 2013; Ganjewala et al., 2010).

Cuando los tejidos se rompen, por ejemplo, por cuando un animal consume estas plantas, los glicósidos cianogénicos entran en contacto con enzimas del tracto digestivo (intestino grueso) y de bacterias entéricas (b-glucosidasas y a-hidroxinitrilo-liasas) las cuales hidrolizan la genciobiosa, lo cual facilita la disociación del mandelonitrilo en benzaldehído, resultando en la liberación de cianuro de hidrógeno (Zagrobely et al., 2004). Es por esta razón que los glucósidos cianogénicos sirven como defensa química contra herbívoros (Ganjewala et al., 2010; Zagrobely et al., 2004).

La amigdalina se ha empleado diversamente como una panacea contra el cáncer., sin embargo, no se ha probado si en verdad tiene efecto anticancerígeno. Debido a esto, las personas que

toman la amigdalina por vía oral, son susceptibles de ser expuestos a niveles de cianuro en exceso. Más aún, se afirmó que los pacientes que tomaban amigdalina, redujeron su esperanza de vida, tanto por falta de atención médica adecuada como por envenenamiento crónico por cianuro. (Duke et al., 2003; Newton et al., 1981). Por lo tanto, el consumo de plantas cianogénicas puede causar una intoxicación subaguda por cianuro con síntomas como ansiedad, dolor de cabeza, mareos y confusión o un envenenamiento agudo, cuyos síntomas son, disminución de la conciencia, hipotensión, parálisis, coma e incluso la muerte. En el 2011, Sahin reportó casos de intoxicación en la ingestión de granos de albaricoque, y Sánchez-Verlaan, en almendras (Citado por Bolarinwa et al., 2015), Sin embargo, existe un mecanismo de desintoxicación mediado por la enzima rodanasa (tiosulfato transferasa). Ésta neutraliza al cianuro y lo transforma en tiocianato, que a la vez, oxida el benzaldehído y lo convierte en un compuesto no tóxico: el ácido benzoico (Cipollone et al., 2008; Duke et al., 2003; Newton et al., 1981).

Por tanto, el objetivo de este trabajo fue extraer amigdalina a partir de semillas de *Prunus persica* L. “durazno” y realizar cualitativamente la hidrólisis enzimática enterobacteriana.

2. Materiales y Métodos

2.1. Material biológico

Los duraznos de aproximadamente de 70 gramos cada uno se adquirieron en hipermercados “Minka” del Callao y se transportaron al laboratorio de Bioquímica y Nutrición de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Ricardo Palma, Las muestras se descarnaron, y los huesos (endocarpio) se limpiaron para luego secarlos la estufa a 50° por una semana (Bolarinwa et al., 2014).

El pool bacteriano se colectó de heces de ratas del bioterio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Ricardo Palma.

2.2. Reactivos

Solución de nitrato de plata 0,2 M, etanol de 96° grados. Caldo nutritivo de Difco.

2.3. Extracción de amigdalina

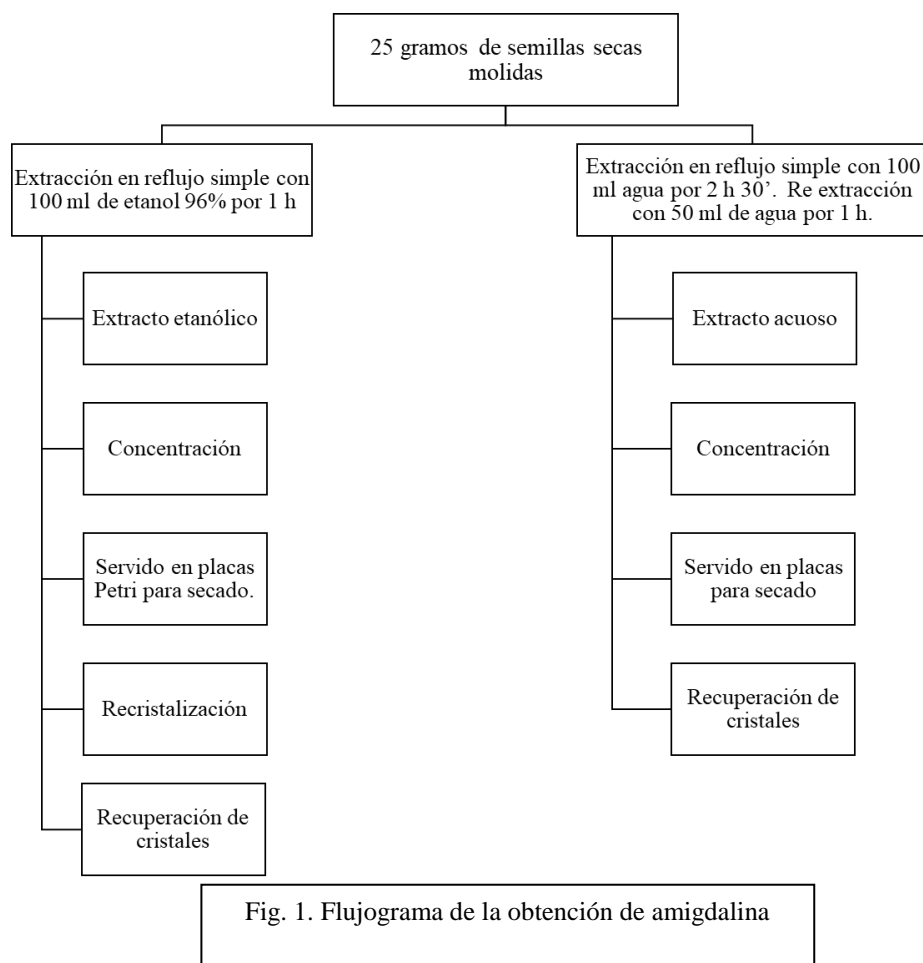
Se secaron 25 g de semillas a estufa a 40 grados y se molieron en un procesador de alimentos (Bolarinwa et al., 2014, 2015).

Una cantidad de muestra seca molida (5 g.) fue extraída mediante reflujo simple, con 100 mL de etanol 96% por una hora. Al final del proceso se filtró el extracto etanólico al vacío en un embudo buchner con papel Whatman N° 1 (Bolarinwa et al., 2015; Wei-Feng et al., 2005; Yang et al., 2014).

Posteriormente, otra cantidad de muestra seca molida (5 g.) fue extraída mediante reflujo simple con 100 ml de agua por 2 horas y media a 100°C. Se filtró el extracto acuoso al vacío en un embudo buchner con papel Whatman N° 1 y el residuo se llevó otra vez a reflujo simple en 50 ml de agua por una hora. (Hwang et al., 2002; Wei-Feng et al., 2005). Al final se combinaron los dos extractos acuosos, teniendo un volumen final de 150 ml. Todas las extracciones se realizaron por duplicado.

Ambos extractos, el acuoso y el etanólico se concentraron y se secaron en placas

petri en la estufa a 56° por 2 días. (Hwang et al., 2002).



2.4. Obtención de cristales de amígdalina

Para el caso de los desecados a partir del extracto etanólico, se recristalizó la amígdalina con etanol. Por último, se rasparon las películas formadas en las placas Petri y con ayuda de un pincel para obtener cristales pardos claros destellantes.

2.5. Hidrolisis enzimática bacteriana.

Se prepararon 4 tubos con 5 ml de caldo nutritivo Difco™. Se inoculó un hisopado de heces fecales de rata a 3 de los tubos, dejando uno sin cultivar (control 1) y incubaron por 18 horas (Cipollone et al., 2008; Newton et al., 1981). Después, se agregó 0.1 gramos de polvo de amígdalina a 2 tubos, se homogenizó bien y se dejó un solo tubo con bacterias entéricas (control 2). Se incubó

por 24 horas. Luego, a cada tubo se le añadió 0.5 ml de nitrato de plata para detectar cianuro libre (Breuer et al., 2011). Se dejó actuar por 24 horas a temperatura ambiente.

3. Resultados

3.1. Extracción de amigdalina.

De 25 gramos de semillas se obtuvo 1.3 gramos de cristales de amigdalina en total (5.2%) Este era un polvo fino, pardo, destellante, con olor a almendras e higroscópico. (fig 2)

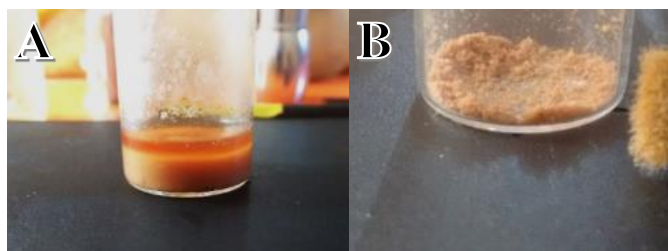


Fig. 2. Purificación de cristales de amigdalina. A. Recristalización. Fase superior: etanol con aceites y fase inferior: amigdalina. B. Cristales de amigdalina

3.2. Hidrólisis enzimática bacteriana

Se comprobó la presencia de amigdalina, ya que las bacterias fecales lograron hidrolizar los azúcares presentes en la amigdalina, liberando el cianuro. Esto se confirmó al añadir nitrato de plata, ya que se formó en los cultivos un precipitado pardo negruzco (fig. 3) a causa del sulfuro del metabolismo bacteriano y el cianuro de plata.

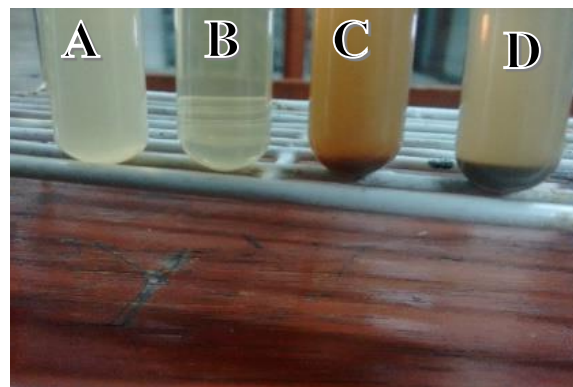


Fig. 3. Prueba cualitativa de la liberación del cianuro después de suplementar amigdalina al caldo de cultivo con enterobacterias. A. Control 2. B. Control 1. C y D: Precipitado pardo al agregar nitrato de plata.

4. Discusión

El principal objetivo de este estudio fue la extracción de amígdalina y su evaluación cualitativa de la liberación de cianuro por hidrólisis enzimática enterobacteriana.

La semilla de *Prunus persica*, posee 25500 a 60000 ppm de amígdalina, es decir, entre un 2.55% - 6% del peso seco de las semillas (Duke, 1992). En comparación con nuestros resultados, la cantidad de amígdalina obtenida (5.2% o 52000 ppm) se encuentra dentro del rango establecido por James Duke.

Algunos estudios emplearon metanol como solvente (Arrázola et al., 2013; Hwang et al., 2002; Wei-Feng et al., 2005) y en otros emplearon etanol para precipitar la amígdalina. (Yang et al., 2014). En el presente trabajo se logró extraer la amígdalina con etanol y agua.

La microflora intestinal de los mamíferos, posee enzimas capaces de hidrolizar la amígdalina liberando cianuro, causando envenenamiento (Cipollone et al., 2008). Estudios previos realizados *in vitro* permitieron cuantificar la presencia de cianuro libre, gracias a que los microorganismos empleados liberaron la enzima β -glucosidasa (Nout et al., 1995). En el trabajo citado anteriormente, los resultados parecen indicar que la flora intestinal de la rata, presentes en las heces trabaja de igual forma hidrolizando la amígdalina.

Además, se experimentó con la flora *in vivo* en dos grupos de ratas, el primero presentaba de su flora intestinal normal (control), y el segundo grupo fue tratado con neomicina, un antibiótico de amplio espectro a fin de eliminar la flora intestinal, y posteriormente se les suministró a segundo grupo una dieta suplementada con amígdalina.

Las ratas del segundo grupo no murieron ni presentaron signos de intoxicación luego del consumo de amígdalina, dado a la ausencia de bacterias que hidrolizan amígdalina y por tanto el cianuro, producto del catabolismo de la amígdalina no estaba presente (Newton et al., 1981).

Conclusiones.

La amigdalina 5.2 % fue aislada de semillas de *Prunus pérsica* L., mediante extracción acuosa y alcohólica.

Se estableció que la flora bacteriana fecal de ratas es responsable de la hidrólisis enzimática de amigdalina, de la liberación de cianuro y de su alta toxicidad.

5. Referencias Bibliográficas

- Arrázola, G., Grané, N., Martín, M. L., & Dicenta, F. 2013. Determinación compuestos cianogénicos amigdalina y prunasina en semillas de almendras (*Prunus dulcis* L.) mediante cromatografía líquida de alta resolución. *Revista Colombiana de Química*, 43(3): 23–30.
- Biosite. 2001. Amygdalin. Consultado el 15 de junio de 2015.
<<http://www.biosite.dk/leksikon/amygdalin.htm>>.
- Bolarinwa, I. F., Orfila, C., & Morgan, M. R. A. 2014. Amygdalin content of seeds, kernels and food products commercially- available in the UK. *Food Chemistry*, 152: 133–139.
- Bolarinwa, I. F., Orfila, C., & Morgan, M. R. A. 2015. Determination of amygdalin in apple seeds, fresh apples and processed apple juices. *Food Chemistry*, 170: 437–442.
- Breuer, P. L., Sutcliffe, C. A., & Meakin, R. L. 2011. Cyanide measurement by silver nitrate titration: Comparison of rhodanine and potentiometric end-points. *Hydrometallurgy*, 106(3–4): 135–140.
- Cipollone, R., Ascenzi, P., Tomao, P., Imperi, F., & Visca, P. 2008. Enzymatic detoxification of cyanide: Clues from *Pseudomonas aeruginosa* rhodanese. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 15(2–3): 199–211.
- Duke, J. 1992. *Handbook of phytochemical constituents of grass herbs and other economic plants*. Boca Raton, FL: CRC press.
- Duke, J., Bogenschutz-Godwin, M. J., DuCellier, J., & Duke, P.-A. 2003. *Handbook of Medicinal Spices*. Boca Raton, FL: CRC press.
- Ganjewala, D., Kumar, S., Devi S, A., & Ambika, K. 2010. Advances in cyanogenic glycosides

- biosynthesis and analyses in plants: A review. *Acta Biologica Szegediensis*, 54(1): 1–14.
- Hwang, E., Lee, S., Lee, J., & Hong, S. 2002. : 7 ; a Development of Quantitative Extraction Method of Amygdalin without Enzymatic Hydrolysis from T6nin (Persicae Semen) by High Performance Liquid Chromatography, 25(4): 453–456.
- Lide, D. R. 2003. CRC Handbook of Chemistry and Physics, 84th Edition, 2003-2004. *Handbook of Chemistry and Physics*, 53: 2616.
- Newton, G. W., Schmidt, E. S., Lewis, J. P., Conn, E., & Lawrence, R. 1981. Amygdalin toxicity studies in rats predict chronic cyanide poisoning in humans. *The Western Journal of Medicine*, 134(2): 97–103.
- Nout, M. J. R., Tunçel, G., & Brimer, L. 1995. Microbial degradation of amygdalin of bitter apricot seeds (*Prunus armeniaca*). *International Journal of Food Microbiology*, 24(3): 407–412.
- Wei-Feng, L., Ding, M.-Y., & Zheng, R. 2005. Isolation and quantitation of amygdalin in Apricot-kernel and *Prunus Tomentosa* Thunb. by HPLC with solid-phase extraction. *Journal of Chromatographic Science*, 43(7): 383–387.
- Yang, C., Li, X., & Rong, J. 2014. Amygdalin isolated from Semen Persicae (Tao Ren) extracts induces the expression of follistatin in HepG2 and C2C12 cell lines. *Chinese Medicine*, 9(1): 23.