



Caracterización por RMN y actividad antibacteriana de los componentes del aceite de la semilla de merey (*Anacardium occidentale* L.)

Sonia Koteich-Khatib^{1,3*}, Jesús Vivas¹, Ali Bahsas¹, Yolima Rosales-Oballos², Johnny Bullón³

¹⁾ Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear. Grupo de Productos Naturales. Departamento de Química. Facultad de Ciencias. Universidad de Los Andes. 5101 Mérida-Venezuela

²⁾ Departamento de de Microbiología y Parasitología. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes. 5101 Mérida-Venezuela

³⁾ Laboratorio de Formulación, Interfases, Reología y Procesos FIRP. Escuela de Ingeniería Química. Universidad de Los Andes. 5101 Mérida-Venezuela

(* sonia@ula.ve)

Recibido: 25/03/2019

Revisado: 20/04/2019

Aceptado: 30/04/2019

Resumen

En este trabajo se efectuó el estudio del aceite de la cáscara de la semilla del Merey (CNSL, por sus siglas en inglés), así como de cada uno de los componentes principales aislados del mismo. Se realizaron las asignaciones de desplazamiento químico por IR y RMN, utilizando métodos uni- y bi-dimensionales, confirmándose que el constituyente principal es el ácido anacárdico, encontrándose mayoritariamente la mezcla de cadenas di- y tri-insaturadas. Se evaluó el efecto antimicrobiano contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, tanto del aceite de Merey, como de cada uno de los componentes aislados del mismo. Las bacterias Gram positivas fueron más susceptibles al efecto antimicrobiano de los extractos utilizados, siendo el *Staphylococcus aureus* el microorganismo más sensible a la acción, tanto del CNSL, como de cada uno de los componentes por separado.

Palabras claves: RMN; CNSL; aceite de Merey; ácido anacárdico; actividad antimicrobiana

Abstract

In this work the study of cashew nut shell liquid (CNSL) and each of the main components isolated from it was carried out. Chemical shift assignments were made by IR and NMR, using one- and two-dimensional methods. It is confirmed that the main constituent is the anacardic acid, being found mainly di- and tri-unsaturated chains in the mixtures. The antimicrobial effect against Gram positive and Gram negative bacteria of CNSL and each one of the isolated components thereof was evaluated. Gram-positive bacteria were more susceptible to the antimicrobial effect of the extracts used, while *Staphylococcus aureus* was the microorganism most sensitive to the action, of both the CNSL, and each of the components separately.

Keywords: NMR; CNSL; Nutshell oil; Anacardic acid; Antimicrobial activity

Introducción

El *Anacardium occidentale* L. conocido como árbol de Merey, es una planta frutal que pertenece a la familia *Anacardiaceae*, nativo del norte del Brasil y de la región de las Guayanas, sin embargo, se puede conseguir en otras regiones con climas tropicales como Asia, África, Perú, Colombia y Venezuela. El fruto conocido como Merey, consta de dos partes: la nuez (figura 1) y la concha de la nuez, esta última contiene una cáscara exterior y una interior, donde se encuentra el aceite de la corteza de la semilla del Merey (CNSL, del inglés Cashew Nut Shell Liquid).

Aparte del valor nutricional de la semilla, el aceite de la corteza tiene un importante interés industrial y tecnológico, además de sus interesantes propiedades farmacológicas como antibacteriano¹; antiinflamatorio²; antioxidante³; antitumoral⁴;



Fig. 1: Nuez de la semilla del Merey.

así como propiedades insecticidas⁵, además de ser una rica fuente de compuestos para la síntesis de productos con potencial actividad surfactante⁶.

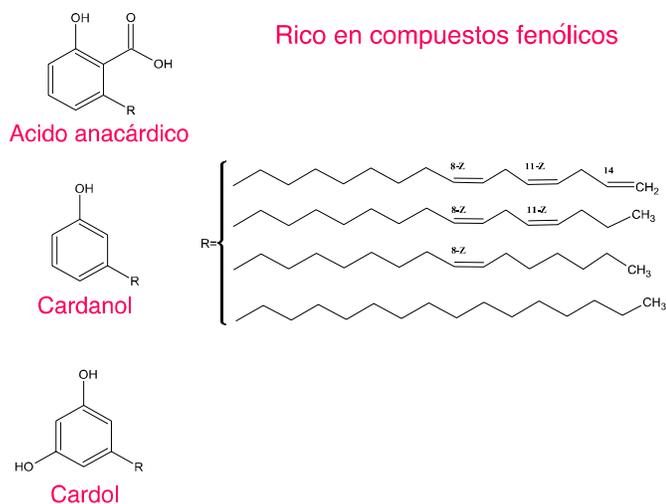


Fig. 2: Componentes mayoritarios presentes en el aceite de la corteza del merey.

El aceite de Merey es un producto natural que contiene varias especies químicas, de composición no constante dependiendo de la especie, por lo tanto, es difícil de caracterizar. Presenta, mayoritariamente, compuestos fenólicos cuyos porcentajes en peso, aproximado, son el ácido anacárdico (63 %), el cardanol (22 %) y el cardol (10,5 %), los cuales presentan una mezcla de componentes con varios grados de insaturaciones en la cadena alquímica, confiriéndoles propiedades de dienos no conjugados. El resto se refiere a otros compuestos y fenoles menos polares⁷. En la figura 2 se presenta esquemáticamente la estructura de los principales componentes del aceite de Merey.

Aun cuando se han llevado a cabo diversos estudios de análisis y separación de los componentes del CNSL, no se han descrito completamente sus tres constituyentes insaturados⁸. El objetivo de este trabajo fue aislar los componentes principales del aceite de Merey, realizar las asignaciones de desplazamientos químicos por Resonancia Magnética Nuclear (RMN), utilizando métodos uni- y bi-dimensionales, así como, evaluar su efecto antimicrobiano contra bacterias Gram positivas y Gram negativas.

Parte experimental

Extracción y purificación del aceite de la corteza de la semilla de Merey

Las semillas frescas de Merey fueron recolectadas en la zona del Moján, Municipio Mara, del Estado Zulia, en el extremo noroccidental de Venezuela, en noviembre del 2017. Las semillas fueron lavadas con agua corriente por varios minutos, luego se secaron a 50 °C durante una semana, una vez secas se separaron las cortezas y se trituraron en un mortero de porcelana.

Para obtener el aceite de Merey, se utilizó la extracción continua en un extractor Soxhlet⁹, para lo cual se agregaron 130 mL de hexano a 50 g de la corteza de las semillas de merey

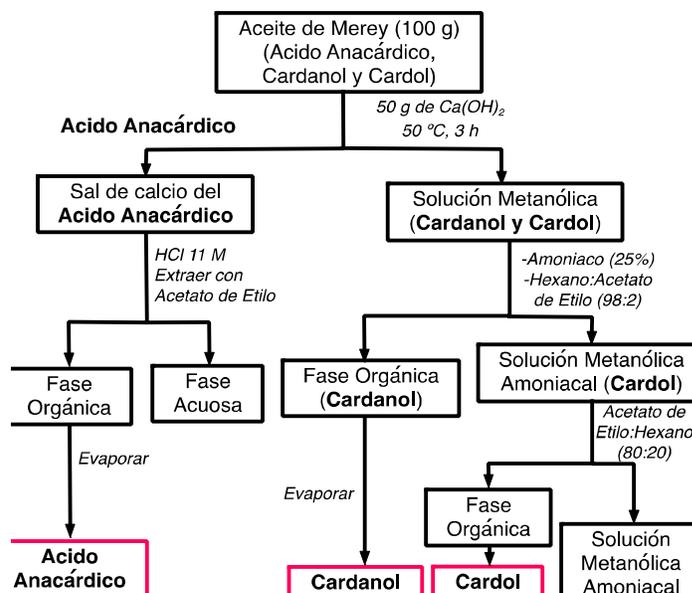


Fig. 3: Método de separación de componentes del aceite de merey, propuesto por Paramashivappa⁷.

trituras, dentro de un dedal de celulosa, calentando hasta ebullición en tres ciclos de una hora cada uno. El solvente (hexano) fue evaporado en un rotavapor, obteniendo un rendimiento global de aceite del 30 % en peso, a partir de las conchas de las semillas.

Separación de los componentes del CNSL

Para evitar la descarboxilación del ácido anacárdico durante la separación de los principales constituyentes del aceite de Merey, se utilizó el método propuesto por Paramashivappa⁷, el cual se resume en la figura 3.

Los experimentos de RMN fueron realizados en un equipo Bruker-Avance DRX400 a la frecuencia de operación de 400 MHz para el ¹H y 100 MHz para el ¹³C, utilizando benceno deuterado Merck™ (C₆D₆) 99,5%. Los espectros IR fueron tomados con un Espectrómetro Infrarrojo Perkin Elmer System 2000, en pastillas de KBr y sobre ventanas de NaCl.

Determinación de la actividad antimicrobiana

Los microorganismos de ensayo seleccionados fueron dos especies representativas de bacterias Gram positivas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212); y tres bacterias Gram negativas: *Escherichia coli* (ATCC 25992), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357), proporcionadas por el Laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de los Andes.

La técnica de la actividad antimicrobiana está basada en el método Kirby-Bauer, originalmente descrito por Bauer *et al.*¹⁰ Este método de difusión en disco o en pozo fue estandarizado, y es actualmente recomendado por el Subcomité de Ensayos de Susceptibilidad de NCCLS, de Estados Unidos¹¹.

El ensayo se realizó con un cultivo de 18 horas de cada mi-

croorganismo en 2,5 mL de caldo Müller-Hinton a 37 °C. El inóculo bacteriano se ajustó con solución salina fisiológica al patrón de turbidez de Mac Farland N° 0,5 (106-8 UFC/mL). Cada inóculo se diseminó con un hisopo sobre la superficie de una placa que contenía agar Müller-Hinton. Luego, este agar fue perforado con un sacabocado estéril de 8 mm de diámetro y en cada pozo se colocaron 20 μ L de cada muestra. Posteriormente, los medios de cultivos inoculados se incubaron a 37°C durante 24 horas, realizando las lecturas de los halos de inhibición a las 24 horas. Todos los ensayos se realizaron por duplicado. El diámetro de la zona de inhibición producto de la acción antimicrobiana de los extractos fue expresado en milímetros (mm). La prueba se consideró negativa cuando existía crecimiento microbiano alrededor del disco al igual que los controles negativos.

Como controles positivos se usaron discos estándar de los antibióticos eritromicina® (15 μ g) y amikacina® (30 μ g) y como control negativo se utilizó dimetilsulfóxido para descartar posible actividad del solvente contra las bacterias ensayadas.

Los patrones se elaboraron preparando una dilución 1:10, pesando 0,1 gramos de cada extracto y se disolvieron en 1 mL del solvente (dimetilsulfóxido), a partir de esta dilución se

preparó una dilución 1:100 para obtener una concentración final de 1 ppm.

Discusión de los resultados

A partir del aceite obtenido luego de la extracción, aproximadamente 15,01 g y utilizando el método de no descarboxilación propuesto por Paramashivappa⁷ logramos aislar un 82,10 % del compuesto principal, ácido anacárdico, cardanol en un 12,12 % y un 5,22% de cardol. La estructura de cada uno de estos componentes fue analizada por técnicas de IR y RMN.

Análisis espectroscópico del aceite de Mery.

El espectro RMN-¹H del aceite obtenido se presenta en la figura 4, éste muestra señales a campo alto, propias de compuestos con cadena lipofílica; sin embargo, en la zona de los hidrógenos aromáticos se pueden verificar algunas señales importantes.

Las señales más intensas entre $\delta = 6,50$ y $7,30$ ppm, corresponden a los protones del núcleo aromático del ácido anacárdico, lo cual permite sugerir que este componente se encuentra en mayor proporción. La señal doblete de menor intensidad (H-3, $\delta = 6,95$ ppm) se atribuye al hidrógeno *orto* al grupo hidroxilo del cardanol, sugiriendo así que éste se encuentra en menor proporción en el aceite de mery.

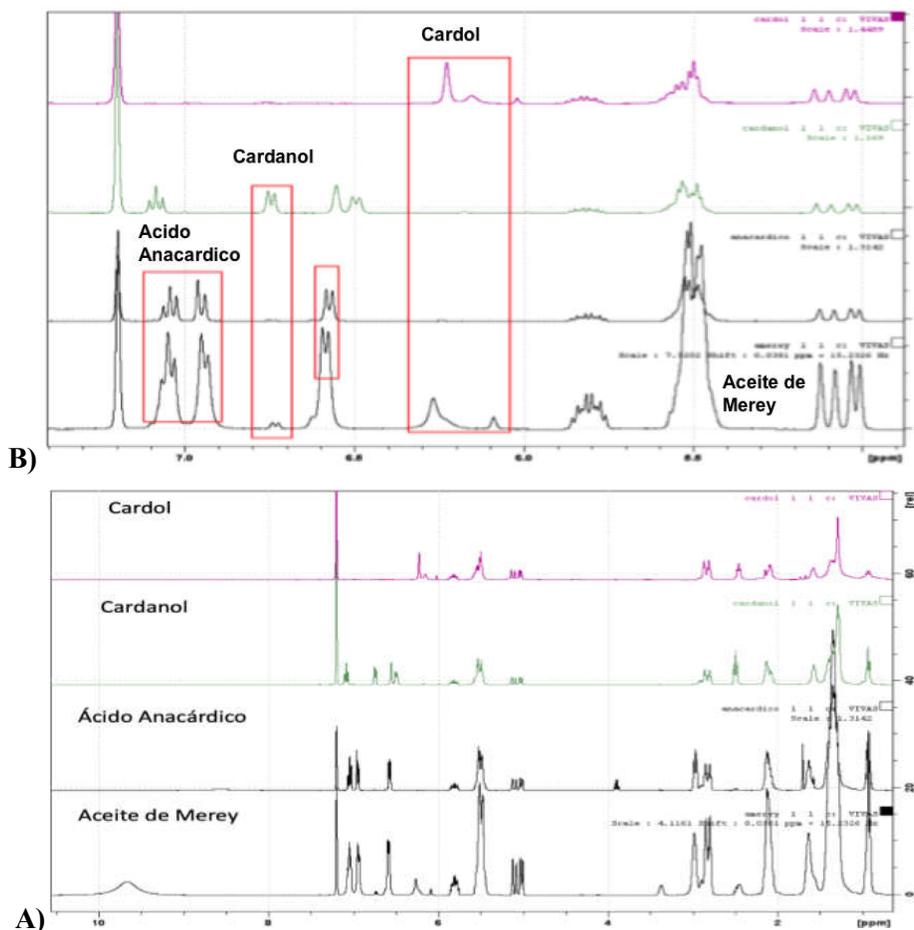


Fig. 4: A) Espectro RMN-¹H (C₆D₆, 400 MHz) del aceite obtenido y sus componentes. B) Ampliación de las zonas olefinicas y aromáticas del aceite de mery y cada uno de sus componentes.

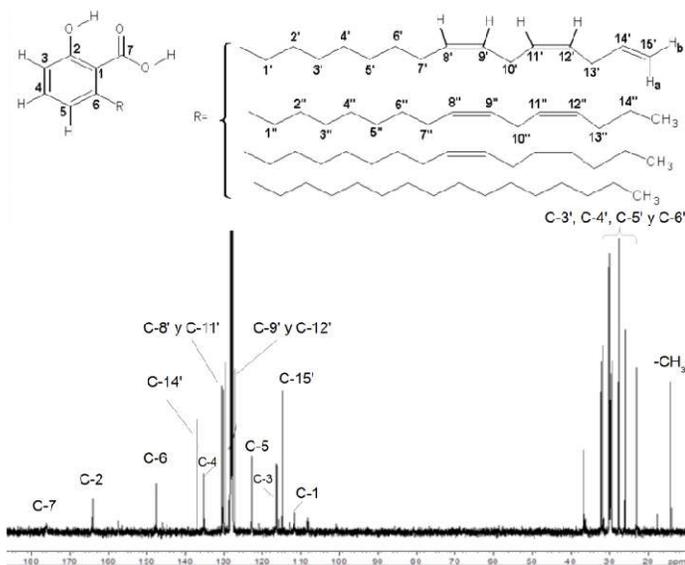


Fig. 5: Espectro RMN- ^{13}C (C_6D_6 , 100 MHz) del aceite de Mery.

En el espectro RMN- ^{13}C del aceite, presentado en la figura 5, se observa a campo bajo un pico bien diferenciado, atribuible a un carbono sp^2 , correspondiente a grupo carbonilo ($\delta = 175,9$ ppm, C-7), seguido de un carbono sp^2 oxigenado ($\delta = 165,0$ ppm, C-2), mientras que el otro carbono cuaternario corresponde a C-6 ($\delta = 147,7$ ppm). Los restantes carbonos aromáticos, presentan desplazamientos a campo alto, sugiriendo así, un anillo aromático trisustituido, como es el caso de C-3 ($\delta = 114,8$ ppm) y C-5 ($\delta = 122,0$ ppm), *orto* y *para* al grupo hidroxilo, respectivamente, mientras que el carbono en *meta* presenta un desplazamiento de $\delta = 135,0$ ppm (C-4).

Entre $\delta = 140,0$ y $112,5$ ppm se encuentran señales de carbonos vinílicos, correspondientes a las diversas cadenas insaturadas de los distintos componentes del aceite, resaltando los carbonos C-8' y C-11' ($\delta = 131,0$ ppm) y C-9' y C-12' ($\delta = 128,0$ ppm); C-14' ($\delta = 136,7$ ppm) y C-15' ($\delta = 115,5$ ppm), lo cual permite sugerir que la cadena mayoritaria es la triinsaturada. Por encima de los 40 ppm, se encuentran las señales de los carbonos con hibridación sp^3 , pertenecientes a los carbonos metilenos y metilos de las cadenas lipofílicas.

En las figuras 6(A) y 6(B) se puede observar el espectro CO-SY del aceite de Mery, el cual sugiere, en una primera lectura, que efectivamente el compuesto mayoritario es el ácido anacárdico, ya que en la zona aromática pueden verse correlaciones a tres enlaces, correspondientes a los acoplamientos de los hidrógenos aromáticos H-3 ($\delta = 6,95$ ppm) y H-5 ($\delta = 6,58$ ppm) con el protón H-4 ($\delta = 7,05$ ppm), proponiendo así un patrón de sustitución 1,2,3 que coincide con el ácido. A su vez, los protones H-13' ($\delta = 2,75$ ppm) se acoplan con los hidrógenos H-12' ($\delta = 5,41$ ppm), H-14' ($\delta = 5,81$ ppm), H-15'a ($\delta = 5,08$ ppm) y H-15'b ($\delta = 4,98$ ppm), sugiriendo así la presencia de una cadena lateral alquílica, como sustituyente del anillo aromático. La presencia de estos protones olefínicos terminales H-15'a y H-15'b, indica la presencia de una cadena triinsaturada al observarse la correlación a tres enlaces con el protón vinílico H-14' y a cuatro enlaces con H-12'; así como la presencia de otros dos pares de protones olefínicos como son H-8' y H-11' ($\delta = 5,51$ ppm) y los protones H-9' y H-12' ($\delta = 5,41$ ppm), lo cual permite proponer que la misma se encuentra en gran proporción.

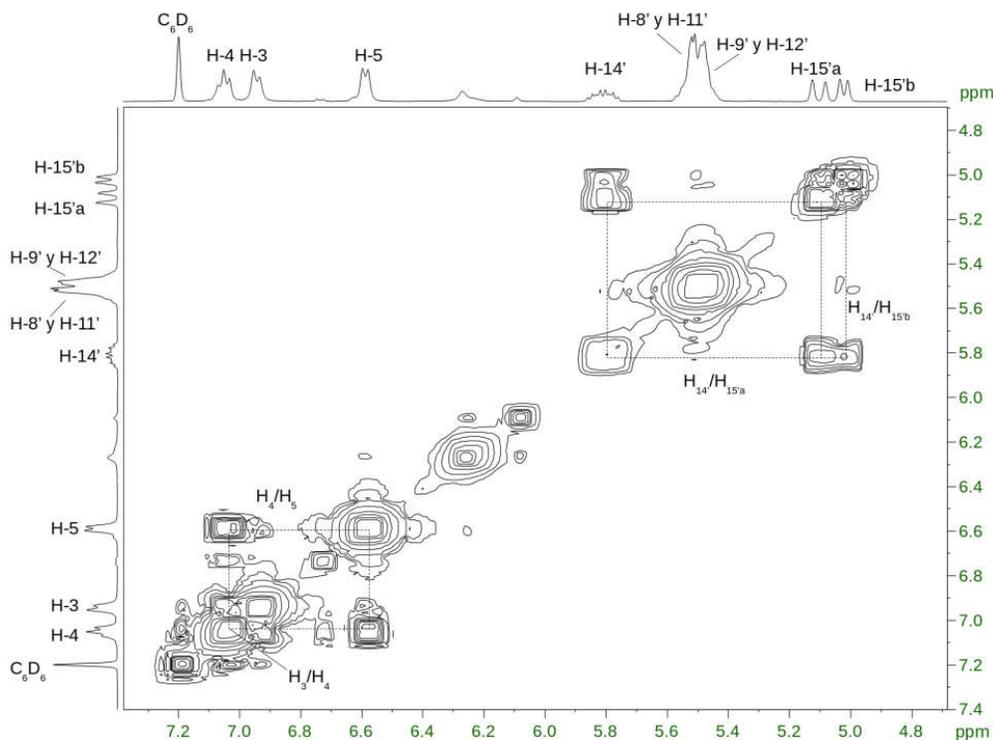


Fig. 6(A): Ampliación del espectro COSY del aceite de Mery, zona olefínica.

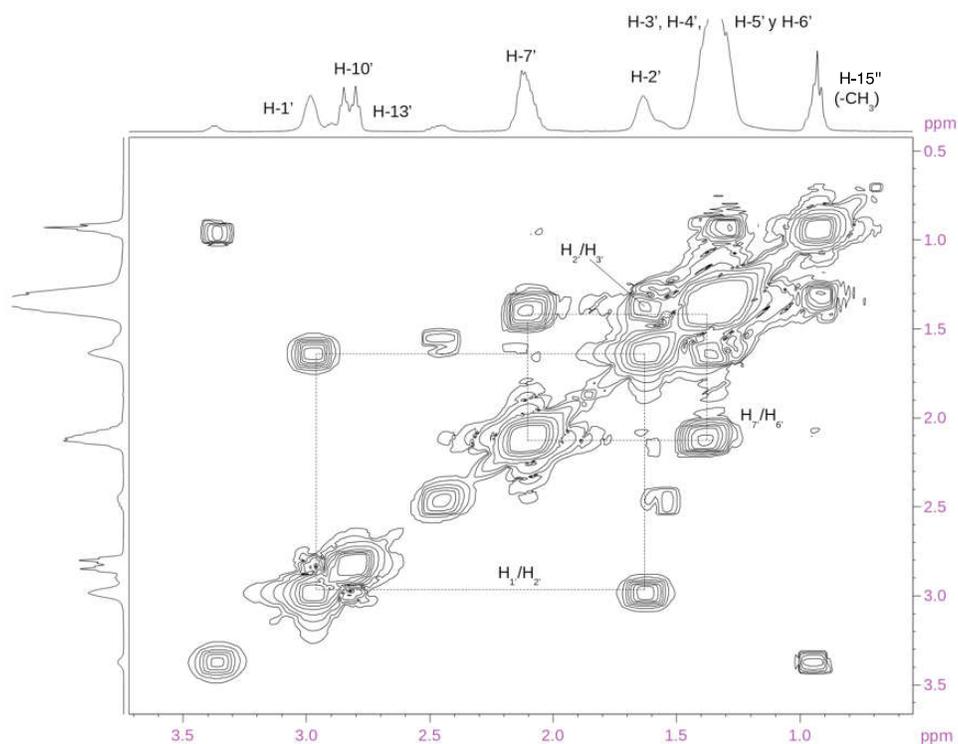


Fig. 6(B): Ampliación del espectro COSY del aceite de Mersey, zona alifática.

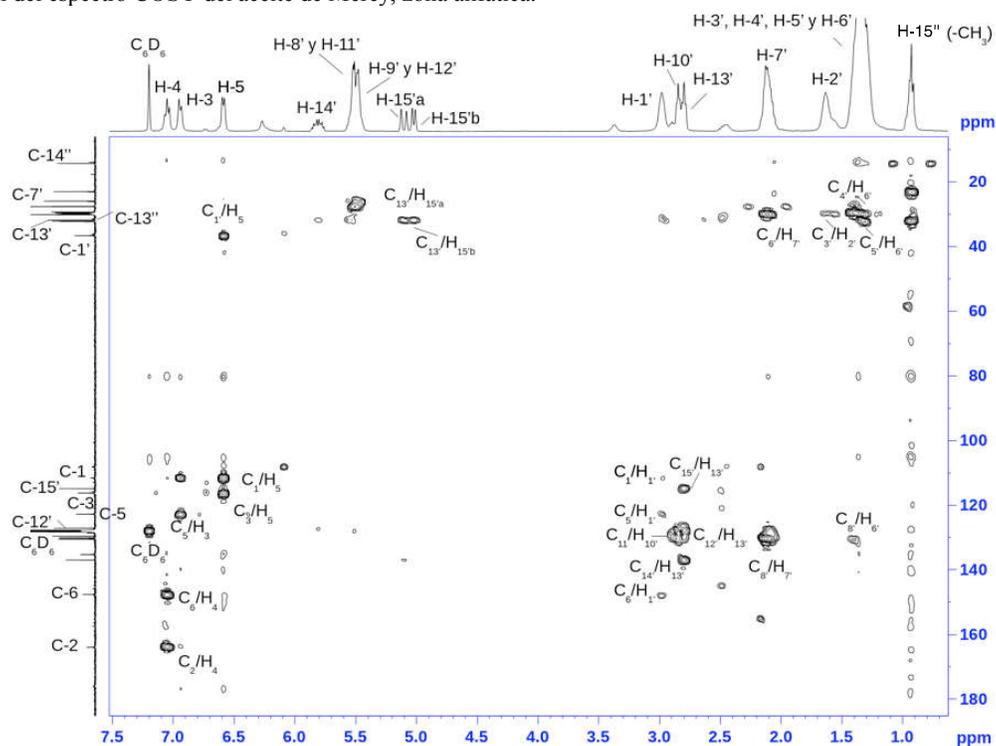


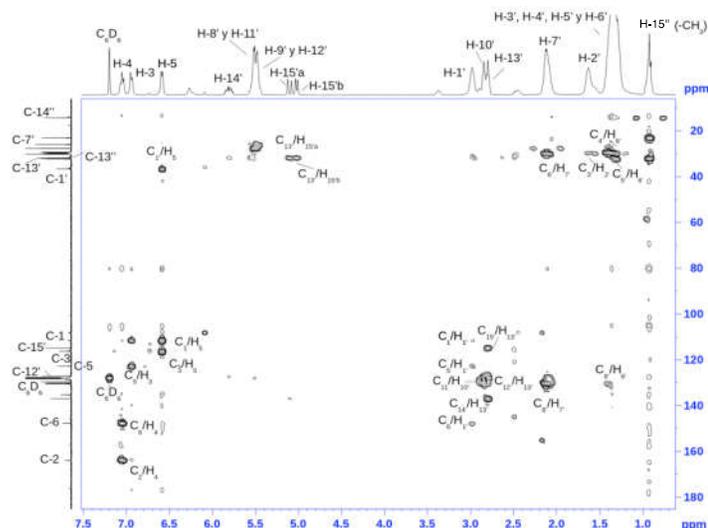
Fig. 7(A): Espectro HMBC del aceite de Mersey.

También es importante destacar la presencia de una señal triplete intensa H-14'' en $\delta = 0,95$ ppm, que presenta acoplamiento con el metileno H-13'', cuya señal multiplete en $\delta = 1,30$ ppm sugiere la presencia de una cadena di-insaturada, en menor proporción.

El espectro HMBC del aceite de Mersey se muestra en las

figuras 7(A)-(D), se observan las correlaciones a varios enlaces que confirman la presencia de ácido anacárdico como principal constituyente de este aceite.

Por ejemplo, a tres enlaces podemos observar fuertes correlaciones de H-3 ($\delta = 6,95$ ppm) con C-1 ($\delta = 110,7$ ppm) y C-5 ($\delta = 122,8$ ppm). A su vez, H-5 ($\delta = 6,58$ ppm), se



ig. 7(A): Espectro HMBC del aceite de Meroy.

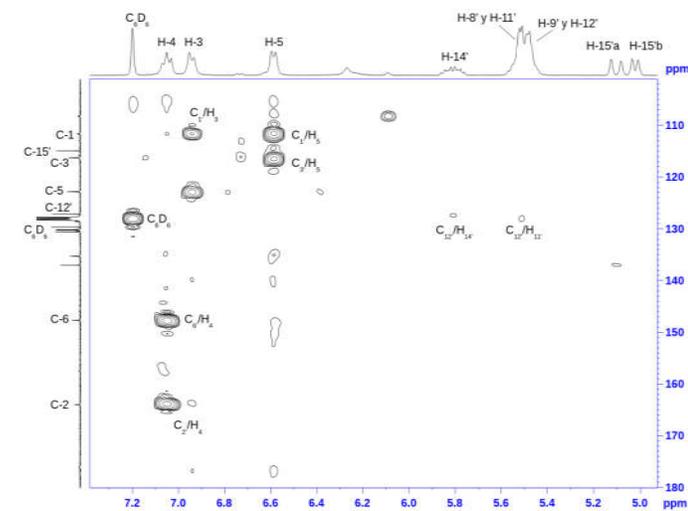


Fig. 7(B): Espectro HMBC del aceite de Meroy, zona olefínica

acopla con los carbonos C-1 y C-3 en $\delta = 110,7$ y $114,8$ ppm, respectivamente. Mientras que, H-4 ($\delta = 7,05$ ppm) se correlaciona con C-2 y C-6 ($\delta = 165,0$ y $147,7$ ppm), confirmando así el patrón aromático 1,2,3.

La ubicación de la cadena alquílica en el anillo aromático se confirma por la correlación, a dos y tres enlaces, de los protones H-1' alifático ($\delta = 2,97$ ppm), con los carbonos C-5 ($\delta = 122,8$ ppm) y C-6 ($\delta = 147,7$ ppm), del anillo benzénico. A su vez, el C-1' ($\delta = 36,2$ ppm) alquílico, exhibe una fuerte correlación con el protón aromático H-5 ($\delta = 6,58$ ppm). Y por ende, la estructura de este sistema aromático es concordante con el ácido anacárdico, confirmando así su presencia mayoritaria en el aceite de Meroy.

Por otra parte, se muestran otras correlaciones más complejas, pertenecientes a la cadena alquílica o cola lipofílica presente en estos compuestos, siendo una muy importante la correspondiente a los hidrógenos de doble enlace terminal H-15'a ($\delta = 5,08$ ppm) y H-15'b ($\delta = 4,98$ ppm), con el

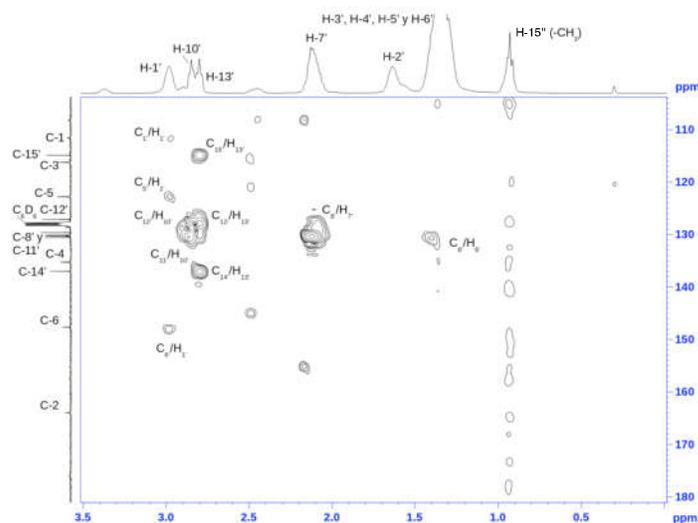


Fig. 7(C): Espectro HMBC del aceite de Meroy, zona alifática

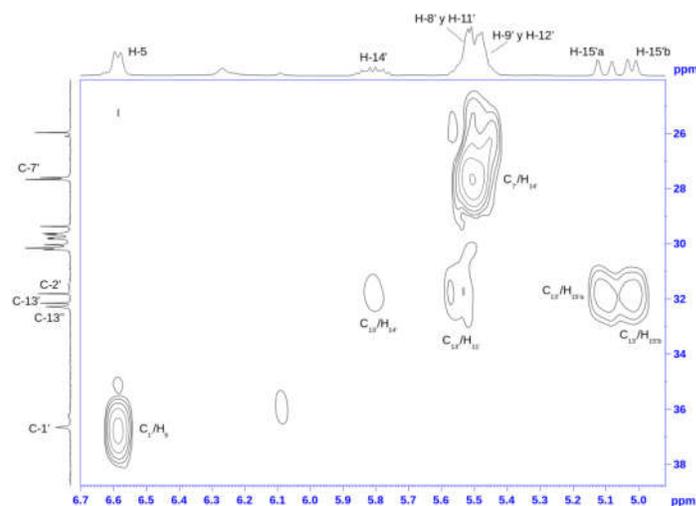


Fig. 7(D): Espectro HMBC del aceite de Meroy, zona olefínica

carbono vinílico C-13' en $\delta = 37,9$ ppm; en tanto que H-15'a ($\delta = 5,08$ ppm) exhibe una pequeña correlación con C-14' ($\delta = 136,7$ ppm), sugiriendo así la presencia de un doble enlace terminal. Por otro lado, el protón vinílico H-14' ($\delta = 5,81$ ppm) se correlaciona a dos y tres enlaces con C-13' ($\delta = 37,9$ ppm) y C-12' ($\delta = 128,0$ ppm). Mientras que los otros protones olefinicos, como son H-8' y H-11' ($\delta = 5,51$ ppm), muestran una marcada correlación con C-7' ($\delta = 33,8$ ppm) y C-13' ($\delta = 37,9$ ppm), respectivamente. En tanto que H-9' ($\delta = 5,41$ ppm) muestra una débil correlación a cuatro enlaces con C-12' ($\delta = 128,0$ ppm), confirmando así la presencia mayoritaria de una cadena triinsaturada. Existen además, otras correlaciones importantes de la cadena alifática, como son el carbono olefínico C-8' ($\delta = 130,3$ ppm), con los protones metilénicos H-7' ($\delta = 2,18$ ppm) a dos enlaces; y a tres enlaces con H-6' ($\delta = 1,29$ ppm).

Es importante destacar, la presencia de un triplete en $\delta = 0,95$ ppm, que hemos denotado como H-15'', concordante con

el metilo de las otras cadenas, que en este caso parece sugerir la presencia de la cadena di-insaturada, debido a la fuerte correlación con carbonos olefinicos, como es el caso de C-13'' ($\delta = 32,8$ ppm).

Análisis espectroscópico del ácido anacárdico.

El ácido anacárdico o ácido 2-hidroxi-6-[(8²Z,11²Z)-penta-deca-8²,11²,14²-trienil]benzoico, representado estructuralmente en la figura 8, puede considerarse una estructura derivada del ácido salicílico sustituido, en posición *orto* a la función carboxílica, por una cadena lineal alquílica de quince (15) átomos de carbono, la cual aparece como una mezcla con dobles enlaces no conjugados en las posiciones 8², 11² y 14², aportando un mayor carácter lipofílico, que le conferiría interesantes propiedades al mismo.

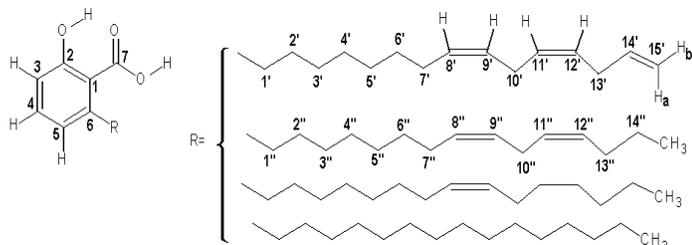


Fig. 8: Estructura del ácido 2-hidroxi-6-[(8²Z,11²Z)-penta-deca-8²,11²,14²-trienil]benzoico

La confirmación de la estructura química del ácido anacárdico, separado a partir del CNSL, se realizó empleando diferentes técnicas espectroscópicas.

En el espectro IR de la figura 9 se observa la banda característica de estiramiento de enlace O-H (3400 cm^{-1}), la cual es una señal ancha y deformada por el solapamiento con otra banda que pertenece a la vibración de tensión del O-H (3000 cm^{-1}) de un grupo ácido carboxílico, así como la señal de vibración de tensión característica de un grupo carbonilo (C=O) a 1670 cm^{-1} y las vibraciones de tensión simétrica y asimétrica para un enlace C-O (1220 cm^{-1} y 1168 cm^{-1}). A su vez, se observan bandas características de vibración de tensión =CH (3010 cm^{-1}), propias de doble enlace; así como vibraciones de deformación fuera del plano a 880 cm^{-1} . También, se encuentran vibraciones de tensión simétrica y asimétrica de enlaces -C-H, correspondiente a los grupos metilos y metilenos presentes en la cadena lipofílica del compuesto.

En el espectro de RMN-¹H de la figura 10, se observa a campo bajo dos singuletes anchos, correspondiente al hidrógeno del grupo ácido (H-7, $\delta = 11,21$ ppm) y al hidrógeno del grupo fenólico ($\delta = 8,57$ ppm). Entre $\delta = 6,50$ y $7,10$ ppm, se encuentran tres señales, que integran para un hidrógeno cada una, con desplazamientos propios de protones aromáticos.

A campo más alto dos señales dobletes apantalladas, representadas en la figura 11, H-3 ($\delta = 6,95$ ppm) y H-5, ($\delta = 6,58$ ppm), en posiciones *orto* y *para* al grupo fenólico, y

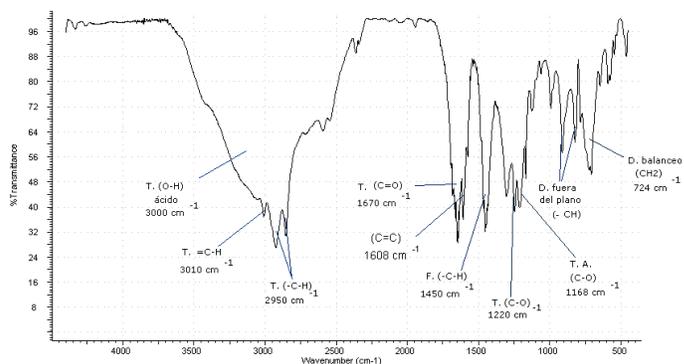


Fig. 9: Espectro IR del ácido anacárdico.

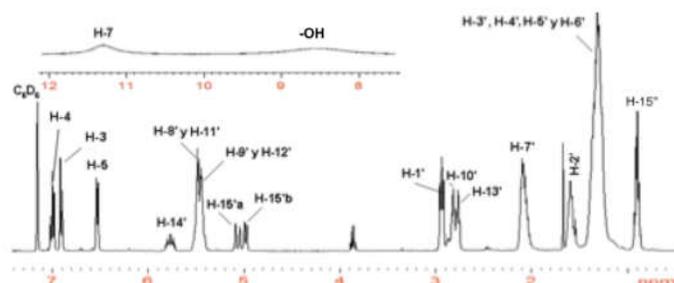


Fig. 10: Espectro RMN-¹H (C₆D₆, 400 MHz) del ácido anacárdico.

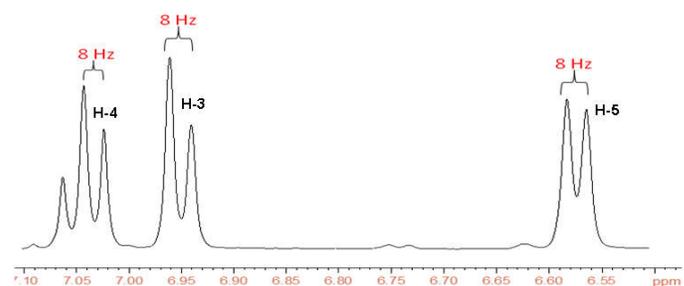


Fig. 11: Ampliación protones aromáticos del ácido anacárdico.

un triplete H-4 ($\delta = 7,05$ ppm), que acopla con los hidrógenos H-3 y H-5, con una constante de acoplamiento $J = 8$ Hz, característica de acoplamientos *orto*, e indicativo del patrón de sustitución 1,2,3.

En la zona olefínica en la figura 10, se puede resaltar la presencia de los protones doble enlace terminal H-15^a ($\delta = 5,08$ ppm) y H-15^b ($\delta = 4,98$ ppm); el protón vecinal de estos protones H-14² ($\delta = 5,81$ ppm), que se presenta como un complejo multiplete y los protones de los dobles enlaces centrales como son H-8² y H-11² en $\delta = 5,51$ ppm y los protones H-9² y H-12² en $\delta = 5,41$ ppm, todos estos propios de la cadena tri-insaturada.

Entre $\delta = 2,95$ ppm y $\delta = 1,5$ ppm, se muestran una serie de señales, que pertenecen a los hidrógenos metílicos y metilenos de la cadena lateral de la molécula, cuya integral no se obtiene con exactitud, debido a los isómeros presentes, sin embargo, podemos señalar a H-2² ($\delta = 1,59$ ppm), que se demarca del resto posiblemente por la influencia del grupo carboxilo, en tanto que H-3², H-4², H-5², y H-6² ($\delta = 1,29$ ppm)

se presenta como una señal multiplete ancha. La señal triplete en $\delta = 0,95$ ppm, corresponde a un grupo metilo concordante con las cadenas di- y mono-insaturadas, así como la cadena saturada que forman parte de esta compleja mezcla.

Es importante señalar que los picos en $\delta = 3,85$ (q) y 1,65 (s) ppm son consistentes con la presencia de acetato de etilo en la muestra.

El análisis detallado de correlaciones se especificó en el estudio del aceite de Merrey descrito anteriormente.

Análisis espectroscópico del cardanol.

En el espectro IR del cardanol, presentado en la figura 12, se observa la banda ancha característica de estiramiento de enlace O-H (3380 cm^{-1}), así como las vibraciones de tensión simétrica y asimétrica para un enlace C-O (1226 cm^{-1} y 1154 cm^{-1}). De igual manera, existen bandas características de vibración de tensión $=\text{CH}$ (3010 cm^{-1}), propias de doble enlace; así como vibraciones de deformación fuera del plano a 880 cm^{-1} . También, se encuentran vibraciones de tensión simétrica y asimétrica, de enlaces $-\text{C}-\text{H}$, correspondiente a los grupos metilos y metilenos presentes en la cadena lipofílica del compuesto. Los sobretonos en el espectro reflejan la presencia del anillo aromático sustituido en posición *meta*, al igual que la vibración de flexión fuera del plano en 650 cm^{-1} ; por su parte, la señal de tensión $\text{C}=\text{C}$ se encuentra en 1608 cm^{-1} .

El espectro RMN- ^1H y la estructura del cardanol se presentan en las figuras 13 y 14, respectivamente. El cardanol es un derivado fenólico disustituido en *meta*, con un patrón 1,2,3,5 ya que su espectro de RMN- ^1H presenta cuatro señales, que integran para un hidrógeno cada una, cuyo desplazamiento químico sugiere hidrógenos aromáticos, como es el caso de las señales dobletes H-6 ($\delta = 6,75$ ppm) y H-4 ($\delta = 6,51$ ppm), acopla dos cada uno al hidrógeno H-5 ($\delta = 7,15$ ppm) con una $J = 8$ Hz acorde a los acoplamiento orto. El cuarto protón es un singlete ancho H-2 ($\delta = 6,63$ ppm), *orto* a la cadena alquílica y al grupo hidroxilo cuyo protón H-7, aparece a campo bajo ($\delta = 8,51$ ppm), como un singlete ancho. A campo alto se

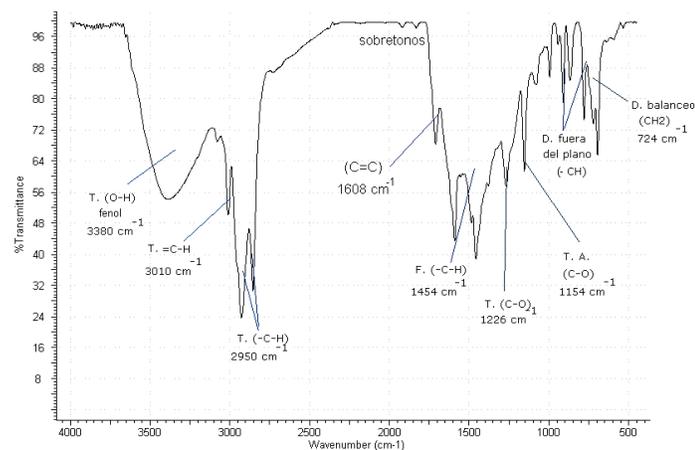


Fig. 12: Espectro infrarrojo del cardanol.

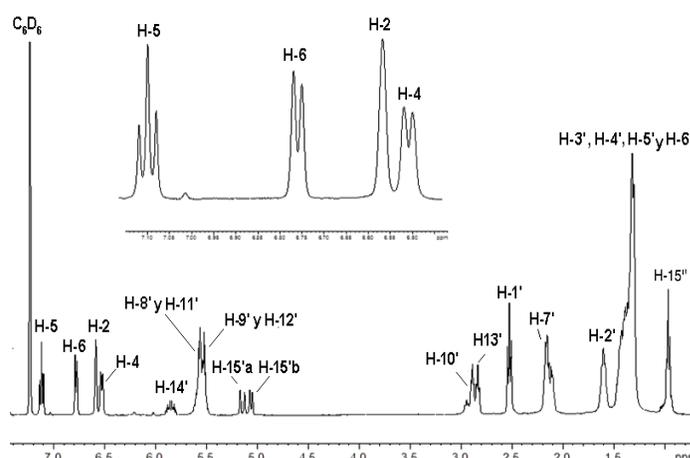


Fig. 13: Espectro RMN- ^1H (C_6D_6 , 400 MHz) del cardanol.

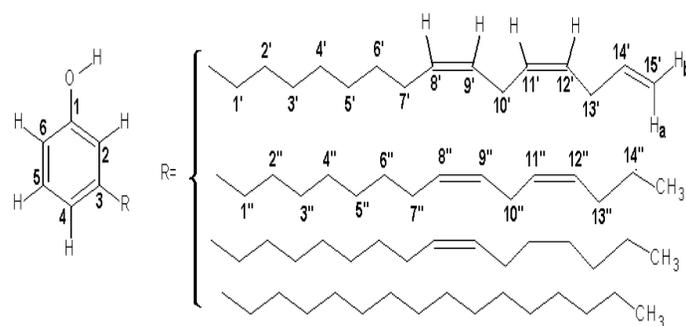


Fig. 14: Estructura del cardanol.

observan señales que corresponden a los hidrógenos sobre la cadena lipofílica, cuyos desplazamientos y multiplicidad son similares a las descritas para el ácido anacárdico, presentando igualmente una mayor proporción de cadenas di- y tri-insaturadas.

Análisis espectroscópico del cardol.

El espectro IR del cardol presentado en la figura 15, posee señales similares al espectro IR del cardanol, presentando una banda ancha característica de estiramiento de enlace O-H (3415 cm^{-1}), así como vibraciones de tensión simétrica y asimétrica para un enlace C-O (1218 cm^{-1} y 1145 cm^{-1}). De igual manera, se observan bandas características de vibración de tensión $=\text{CH}$ (3010 cm^{-1}), propias de doble enlace y vibraciones de deformación fuera del plano a 750 cm^{-1} . Además de las vibraciones de tensión simétrica y asimétrica, de enlaces $-\text{C}-\text{H}$, correspondiente a los metilos y metilenos presentes en la cadena lipofílica del compuesto.

En la figura 16 se presenta el espectro RMN- ^1H del cardol y en la figura 17 su estructura. El cardol es una molécula trisustituida 1,3,5 por lo que su espectro RMN- ^1H presenta una señal singlete en $\delta = 6,05$ ppm (H-2) de un hidrógeno *orto* a los grupos hidroxilos y una señal intensa que integra para dos hidrógenos en $\delta = 6,31$ ppm (H-4 y H-6) cada uno de los cuales esta *orto* y *para* a grupos $-\text{OH}$ libres. En tanto que el singlete ancho, en $\delta = 6,15$ ppm es propia del grupo hidroxilo. También se encuentran presente señales en la zona olefín-

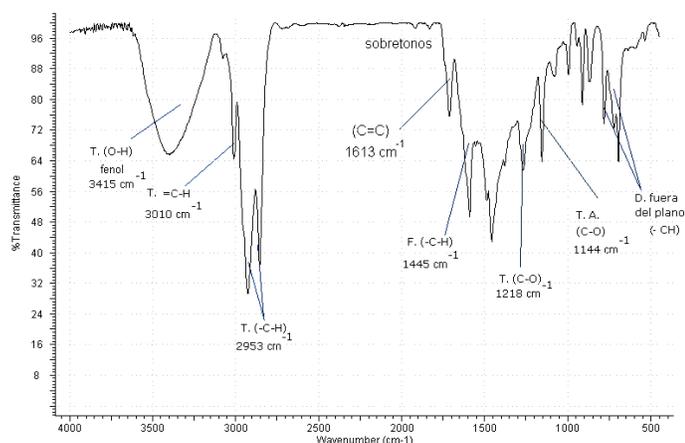


Fig. 15: Espectro infrarrojo del cardol.

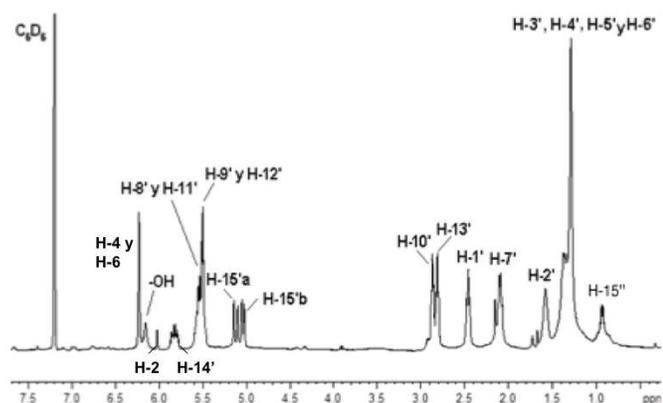


Fig. 16: Espectro RMN-¹H (C₆D₆, 400 MHz) del cardol

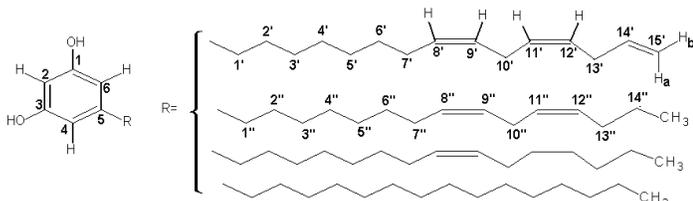


Fig. 17: Estructura del cardol.

ca como los dobles dobles de los hidrógenos 15'a y 15'b y los dobles enlaces en H-8' y H-11', permitiendo así sugerir la presencia de la cadena tri-insaturada en mayor proporción. En la zona de alto campo, se encuentran igualmente

hidrógenos de la cadena lipofílica, con desplazamientos y multiplicidades similares a las descritas anteriormente.

Actividad antimicrobiana

En la tabla 1 se muestra la actividad antibacteriana del aceite de Mery y sus principales componentes, a una concentración de 10 ppm, frente a las cepas de referencia. Se evidencia que las bacterias Gram positivas fueron más susceptibles al efecto antimicrobiano de los extractos utilizados, siendo el *Staphylococcus aureus* el microorganismo más sensible a la acción, tanto del CNSL, como de cada uno de los componentes por separado. Sin embargo, aún cuando las diferencias no son significativas, se podría sugerir que la actividad del aceite, levemente más eficiente, viene determinada por la presencia del ácido anacárdico que es el componente principal de esta mezcla. Por otro lado, también se observa una menor sensibilidad de las cepas empleadas a estos fenoles y más específicamente al cardanol, siendo este el compuesto menos hidrofílico.

Los diámetros de los halos de inhibición formados por el compuesto en estudio alrededor de las cepas bacterianas, a la concentración de 10 ppm, reflejan la actividad antimicrobiana. Mientras mayor es el diámetro, mejor será su actividad. En la tabla 1 el valor del diámetro de la zona de inhibición que se presenta, es un promedio de las tres medidas replicadas para cada cepa.

En nuestro estudio, los valores de los diámetros de la zona de inhibición están en el rango de 10 a 15 mm, lo cual se puede considerar como una acción antimicrobiana media-alta con respecto al antibiótico de referencia, considerando la concentración utilizada.

La superficie celular bacteriana usualmente está cargada negativamente. Las bacterias Gram-positivas se caracterizan por su habilidad para interactuar con las moléculas cargadas positivamente lo cual está directamente relacionado con la capa de ácido lipoteicoico. Por su lado, en las bacterias Gram negativas la capa externa está compuesta por dos proteínas que restringen la entrada de puestos anfífilicos. Esto podría explicar la resistencia natural de algunos géneros bacterianos^{12,13}.

Tabla 1. Diámetros de los halos de inhibición formados por los compuestos en estudio

Muestra	Bacterias Gram positivas		Bacterias Gram negativas		
	<i>S. aureus</i> ATCC 29923	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 23357	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
Aceite de Mery	14*	13*	12*	15*	NA
Ácido Anacárdico	14*	13*	NA	13*	11*
Cardanol	12*	NA	NA	NA	NA
Cardol	11*	NA	12*	10*	10*
(C+) Eritromicina	32*	32*	-	-	-
(C+) Amikacina	-	-	35*	31*	33*
(C-) DMSO	0	0	0	0	0

*Valor promedio

Es conocido que la actividad antibacteriana es altamente dependiente de la longitud de las cadenas alquílicas. Incrementando la longitud de la cadena hidrofóbica de las moléculas, aumenta la tendencia de absorción a través de la membrana de los microorganismos. En este caso, el ácido mayoritario en la mezcla posee cadenas de aproximadamente 15 átomos de carbono, longitud que según Kubo¹⁴ pareciera jugar un rol importante en el incremento de la actividad.

El dimetilsulfóxido (DMSO), empleado como control negativo, no inhibió el crecimiento de las cepas utilizadas, lo que demuestra que al emplearlo como solvente en la obtención de las disoluciones stock no alteró los resultados obtenidos. El comportamiento de los antibióticos comerciales empleados como control positivo frente a cada una de las cepas bacterianas evaluadas fue el esperado, pues éstas manifestaron la sensibilidad prevista, lo que indica que las condiciones en las que se desarrolló el ensayo fueron adecuadas.

Conclusiones

La cáscara de la semilla del merey contiene un aceite que es una fuente única de ácidos carboxílicos y fenoles de origen natural, de largas cadenas hidrocarbonadas. Tanto el aceite como los compuestos por separado proporcionan una materia prima interesante para el desarrollo de nuevos productos.

A través del método de extracción empleado, logramos obtener un rendimiento global de aceite del 30 % en peso, a partir de las conchas de las semillas. Además permite mantener las proporciones naturales de los componentes del aceite, ya que impide la descarboxilación del producto principal. En esta especie, recolectada en Venezuela, se obtuvo un 82,10 % de ácido anacárdico, el 12,12 % de cardanol y un 5,22 % de cardol, coincidiendo en valores porcentuales con las cantidades reportadas para otras especies de *Anacardium occidentale* L.

Se logró obtener la data completa de RMN, empleando técnicas uni- y bi-dimensionales, logrando así realizar las asignaciones inequívocas de protón y carbono, tanto de la mezcla en el aceite como de cada uno de los componentes aislados, encontrándose mayoritariamente los que poseen cadenas hidrocarbonadas di- y tri-insaturadas.

Las bacterias Gram positivas fueron más susceptibles al efecto antimicrobiano del aceite de las semillas de merey, así como a cada uno de los componentes por separado, siendo el *Staphylococcus aureus* el microorganismo más sensible a la acción.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Prof. Ronald Márquez, del Lab FIRPULA, por su apoyo en la realización de las figuras.

Referencias

1. B Narayana, G Suma, R Venkateswara, R Chandrasekara. Synthesis of isonicotinoylhydrazones from anacardic acid and their

- in vitro* activity against *Mycobacterium smegmatis*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, **42(3)**, 420-424 (2007).
2. R Paramashivappa, P Kumar, P Subba, A Srinivasa. Design, Synthesis and Biological Evaluation of Benzimidazole/ Benzothiazole and Benzoxazole Derivatives as Cyclooxygenase Inhibitors. **Bioorg. & Med. Chem. Lett.**, **13(4)**, 657-660 (2003).
3. T Dos Santos Andrade, B Araújo, A Graças, J Da Silva, J Saffi, M Richter, A De Barros. Antioxidant properties and chemical composition of technical Cashew Nut Shell Liquid (CNSL). **Food Chemistry**, **126**, 1044-1048 (2001).
4. LH Wu, L Zhang, J Chen, Z Yi, J Zhang, M Liu, X Pang. Anacardic Acid (6-pentadecylsalicylic acid) Inhibits Tumor Angiogenesis by Targeting Src/FAK/Rho GTPases Signaling Pathway. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **339**, 403-411 (2011).
5. EU Asogwa, IU Mokwunye, LE Yahayam, AA Ajao. Evaluation of Cashew Nut Shell Liquid (CNSL) as a Potential Natural Insecticide Against Termites (Soldiers and Workers Castes). **Research Journal of Applied Sciences**, **2**, 939-942 (2007).
6. C Scorzza, J Nieves, F Vejar, J Bullón. Synthesis and Physicochemical Characterization of Anionic Surfactants Derived from Cashew Nut Shell Oil. **Journal Surfact Deterg.** **13(1)**, 27-31 (2009).
7. R Paramashivappa, P Kumar, P Vithayatil, A Rao. Novel method for isolation of major phenolic constituents from cashew (*Anacardium occidentale* L.) nut shell liquid. **J. Agric. Food Chem.**, **49(5)**, 2548-2551 (2001).
8. SM Morais, KA Silva, H Araujo, IG Vieira, DR Alves, RO Fontenelle, AM Silva. Anacardic Acid Constituents from Cashew Nut Shell Liquid: NMR Characterization and the Effect of Unsaturation on Its Biological Activities. **Pharmaceuticals**, **10(31)**, 1-10 (2017).
9. MO Edoga, L Fadipe, RN Edoga. Extraction of polyphenols from cashew nut shell. **Leonardo Electronic Journal of Practices and Technologies**, **9**, 107-112 (2006).
10. AW Bauer, WM Kirby, JC Sherris, M Turck. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, **45(4)**, 493-496 (1966).
11. E Sánchez-García, SL Castillo-Hernández, P García-Palencia. Actividad antimicrobiana. En: Investigación en plantas de importancia médica. C Rivas-Morales, MA Oranday-Cardenas, MJ Verde-Star (Eds.). OmniaScience, Barcelona, España (2016).
12. I Aiad, S Tawfik, M El-Shafie, A Latif, A Rhman. 4-Aminoantipyrene derived cationic surfactants: Synthesis, characterization, surface activity and screening for potential antimicrobial activities. **Egyptian Journal of Petroleum**, **27(3)**, 327-334 (2018).
13. NA Negm, YM Elkholy, FM Ghuiba, MK Zahran, SA Mahmoud, SM Tawfik. Benzothiazol-3-ium Cationic Schiff Base Surfactants: Synthesis, Surface Activity and Antimicrobial Applications against Pathogenic and Sulfur Reducing Bacteria in Oil Fields. **Journal of Dispersion Science and Technology**, **32(4)**, 512-518 (2011).
14. I Kubo, H Muroi, M Himejima, Y Yamagiwa, H Mera, K Tokushima, Sh Ohta, T Kamikawa. Structure-antibacterial activity relationships of anacardic acids. **J. Agric. Food Chem.**, **41(6)**, 1016-1019 (1993).