

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA
ESCUELA DE QUÍMICA



TRABAJO DE GRADUACIÓN

**“AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPONENTES ACTIVOS DEL
LÍQUIDO DE LA CÁSCARA DE LA NUEZ DE MARAÑÓN (LCNM) *Anacardium
occidentale*”**

PRESENTADO POR:

JOSUÉ ALEXANDER MURILLO VELÁSQUEZ

PARA OPTAR AL GRADO DE:

LICENCIADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

CIUDAD UNIVERSITARIA, SAN SALVADOR, JUNIO 2011

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA
ESCUELA DE QUÍMICA



TRABAJO DE GRADUACIÓN

**“AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPONENTES ACTIVOS DEL
LÍQUIDO DE LA CÁSCARA DE LA NUEZ DE MARAÑÓN (LCNM) *Anacardium
occidentale*”**

PRESENTADO POR:

JOSUÉ ALEXANDER MURILLO VELÁSQUEZ

ASESOR:

Dr. NÉSTOR GUILLERMO ORELLANA VELADO

CIUDAD UNIVERSITARIA, SAN SALVADOR, JUNIO 2011

AUTORIDADES UNIVERSITARIAS

MSc. RUFINO ANTONIO QUEZADA SÁNCHEZ

RECTOR

Lic. DOUGLAS VLADIMIR ALFARO CHÁVEZ

SECRETARIO GENERAL

Dr. RENÉ MADECADEL PERLA JIMÉNEZ

FISCAL GENERAL

Dr. RAFAEL ANTONIO GÓMEZ ESCOTO

DECANO

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

Lic. MARÍA TRINIDAD DE CASTRO

SECRETARIA

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

Lic. JOSÉ ALFREDO DÍAZ

DIRECTOR ESCUELA DE QUÍMICA

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

AGRADECIMIENTOS ESPECIALES

A la RED ALFA-LAGROTECH. Red tecnológica y química de productos industriales latinoamericanos.



A la oficina de Cooperación Europea.



A Technische Universität Carolo-Wilhelmina Zu Braunschweig. Institut Für Lebensmittelchemie. Alemania



Al Prof. Dr. Peter Winterhalter, Dr. Gerold Jerz, MSc. Ingeniera Marcela Castro y Dra. Elyana Cuevas Montilla.

A la Ingeniera Leyla Jiménez y al Ingeniero Agustín Barrera de la Escuela de Ingeniería Mecánica de la Universidad de El Salvador.



Al Licenciado Alexander Flores, Gerente de la Cooperativa APRAINORES (Asociación de Productores Agroindustriales Orgánicos de El Salvador), por permitirnos la recolección del material vegetal.



AGRADECIMIENTOS

A Dios por guiar mi camino.

A mis padres y hermanos por su apoyo y consejos durante mis estudios y por estar siempre presentes en todo momento. Un Abrazo grande a Mathew, André y Marie, Cinthya, Nacira y a la Chavelita.

Al Dr. Néstor Orellana, por su valioso apoyo en el asesoramiento de mi trabajo de tesis.

A mi amigo “El Coronel” alias el Doc. por su amistad, apoyo y sobre todo por la paciencia que ha tenido a lo largo de todo este tiempo, por todos sus consejos y por su ayuda en cada momento. Gracias por ser quien es.

A la Lic. Rosario Amanda de Zepeda, por todos sus consejos a inicios de mis estudios, donde pasábamos largas horas conversando, por su paciencia y por sus conocimientos brindados, y sobre todo por confiar siempre en mí.

A la Lic. Paquita, siempre aconsejándome, dándome su apoyo y amistad, gracias por su confianza, y por ser quien es.

A los que fueron una parte fundamental a finales de mis estudios, al par de locos inseparables, Harold gracias por el apoyo brindado, por aconsejarme siempre y Núñez por sus consejos y ayuda previa a las defensas y por aguantar los desvelos, a los dos les agradezco por estar ahí en ciertos momentos clave y sobre todo por su amistad y paciencia, por cierto nunca se olviden de las locuras mientras estábamos en física III y no podía faltar la pelu, por el apoyo, amistad y consejos.

A la Mitch, te estoy muy agradecido, tu sabes bien porque....., gracias por toda tu ayuda, por aconsejarme y apoyarme siempre, y por creer en mi... gracias por tu amistad. Xoch, igual con tigo, agradezco toda tu ayuda brindada, tu amistad y consejos.

Pantro, gracias por toda tu ayuda, amistad y consejos, y por confiar y creer en mí, Eduardo, Deme, Douglas, Dolo, gracias por permitirme se parte de su grupo de trabajo, por la confianza brindada, aprendí mucho de ustedes.

Al trio, la wikileaks, la cum honodifico y la tita, por su paciencia, a toda la mara de la escuela, la colocha, Katia, Tania, Eva, Sami, Chepe, Chente, Gaby, Maura, Loida, el colochito, Chicas, William y familia, Rulo, Cárdenas, Chele, Omar, Jorge y a todo el resto q falta de la escuela, por el apoyo y por sus locuras de siempre y hacer reír un poco, a los que ya terminaron a todos ustedes gracias.

Marcelita, gracias por todo tu cariño, por haber estado a mi lado. A la Wendy, la Michelle, Ana María, a los dos caras de panda.

A mis amigos Karla Pacheco y Ángel Leonidas, Cesar Batres, Ruth Peña, Valentín Cornejo y familia, Carlos Flores y familia, Familia Gonzales.

A Steffi Dräger, Anne, Bettina Klose, Jana Paulsen, Andrea Wilkens, Paula Carmona, Jephtha, July Wedler, Olli, Alex Schwiegel, Stephanie Gröll, Michael, Silke Hillebrand, Herr Meier, a la Mabe Condori, Ana, Arturo, Adriana y Daniela, Ana María y familia, Eduardo Jiménez, por hacer de mi estancia en Braunschweig, Alemania más agradable, por su amistad, ayuda, consejos, por abrirme la puerta de sus casas, por hacerme parte de su familia, por hacerme recodar lo buena que es la comida latina, jiji ☺,

Memeyo, Alex y Alejandro, muchas gracias por su consejos, por toda su ayuda y paciencia, por sus conocimientos.

Lic. Carmen Elena, gracias por su apoyo, confianza y consejos brindados durante la realización de mi perfil del proyecto de tesis.

A mis amigos, Gama, Aarón y Ruth, la gran familia Pérez, sangre ganadora y un verdadero ejemplo de humildad, gracias por su apoyo, por enseñarme que solo luchando por lo que se quiere se puede seguir adelante y lograr alcanzar las metas. Gama gracias por toda tu ayuda, y consejos.

A mis compañeros de trabajo.

Y a todos aquellos que de una u otro forma, han colaborado para que todo esto sea una realidad.



Anacardium occidentale L.

ÍNDICE

Resumen	í
I. Introducción	ii
II. Objetivos	
2.1 Objetivo General	7
2.2 Objetivos Específicos	7
III. Fundamento Teórico	
3.1 El Marañón (<i>Anacardium occidentale</i>)	8
3.2 Biosíntesis de los Ácidos Anacárdicos	18
3.3 Cromatografía en Contra Corriente de Alta Velocidad	19
3.4 Técnicas de elucidación estructural	23
3.5 Espectrometría de Masas con Ionización por Electrospray (ESI-MS)	26
IV. Metodología Experimental	
4.1 Recolección del material vegetal	28
4.2 Obtención del extracto de la cáscara de la nuez de marañón	28
4.3 Selección del sistema de disolventes	30
4.4 Preparación de la muestra para HSCCC	30
4.5 Obtención de las fracciones por HSCCC	31
4.6 Preparación de muestras para RMN	32
4.7 Análisis en resonancia magnética nuclear (RMN)	33
4.8 Preparación de muestras y análisis en ESI-MS	34

4.9	Esquema general de separación e identificación del LCNM	36
V.	Discusión y Análisis de Resultados	
5.1	Análisis de la fracción 2 del LCNM	41
5.2	Análisis de la fracción 3 del LCNM	49
5.3	Análisis de la fracción 5 del LCNM	53
VI.	Conclusiones	61
VII.	Recomendaciones	62
VIII.	Referencias	63
IX.	Anexos	69

ÍNDICE DE FIGURAS

I - Introducción

Figura 1.	Árbol del anacardo de follaje denso y ramificado, utilizado también para reforestar.	íí
Figura 2.	Etapas del proceso de fructificación.	ííí
Figura 3.	Metabolitos secundarios presentes en el líquido de la cáscara de la nuez de marañón.	ííí
Figura 4.	Estructura de los diferentes tipos de ácidos anacárdicos.	ív
Figura 5.	Mapa de ubicación de iniciativas innovadoras.	v

III – Marco Teórico

Figura 6.	Primer registro conocido del género <i>Anacardium</i> , representa la cosecha de fruta de un árbol de marañón.	8
Figura 7.	Clasificación Botánica.	9
Figura 8.	Fruto verdadero y fruto falso.	9
Figura 9.	Estructura de los ácidos anacárdicos.	12
Figura 10.	Estructura de los cardanoles.	13
Figura 11.	Estructura de los cardoles.	14
Figura 12.	Estructura de los 2-metilcardoles.	15
Figura 13.	Análogos de sildenafil preparados a partir de los ácidos anacárdicos.	16

Figura 14.	Derivados de cardanol con actividad antitumoral.	16
Figura 15.	Rivastigmina y análogos derivados del cardanol.	17
Figura 16.	Origen Biosintético de los Ácidos Anacárdicos vía ácidos grasos.	18
Figura 17.	Vista superior de HSCCC.	19
Figura 18.	Esquema de un equipo de HSCCC.	20
Figura 19.	Mecanismo de trabajo de HSCCC.	21
Figura 20	Esquema del movimiento y distribución de las dos fases en la columna de espiral de movimiento planetario tipo-J.	21
Figura 21.	Esquema del movimiento y distribución de las dos fases en la columna de espiral.	22
Figura 22.	Esquema de equipo de Resonancia Magnética Nuclear [RMN]	23
Figura 23.	Esquema de una fuente de ESI	26
Figura 24.	Esquema del mecanismo de formación de iones en ESI	27

IV – Metodología Experimental

Figura 25.	Ubicación geográfica del Cantón San Marcos Lempa.	28
Figura 26.	Obtención del líquido de la cáscara de la nuez de marañón.	29
Figura 27.	Mezcla a filtrar para su posterior inyección en el HSCCC.	31
Figura 28.	Inyección de la muestra en el HSCCC.	31
Figura 29.	Fracciones recolectadas en los diferentes rack.	31

Figura 30.	Sistema de elución en placas de TLC.	32
Figura 31.	Espectrómetro Bruker-Spectrospin 300 UltraShield™	34
Figura 32.	Espectrómetro LC-ESI-MS.	35
Figura 33.	Esquema de separación e identificación del LCNM.	36

V – Discusión y análisis de resultados

Figura 34.	Cromatograma HSCCC del LCNM de la semilla frita (Hex/ACN)	38
Figura 35.	Placas de TLC CH ₃ OH/H ₂ O (8:2 v/v) correspondientes a las fracciones 2, 3 y 5 del LCNM.	40
Figura 36.	Espectro de RMN- ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) correspondiente a la fracción 2 del LCNM.	41
Figura 37.	Espectro de RMN- ¹³ C (300 MHz, CDCl ₃) correspondiente a la fracción 2 del LCNM.	43
Figura 38.	Espectro de RMN DEPT-135 (300 MHz, CDCl ₃) correspondiente a la fracción 2 del LCNM.	45
Figura 39.	Espectro de COSY (¹ H – ¹ H) correspondiente a la fracción 2 del LCNM.	46
Figura 40.	Espectro de RMN-COLOC en CDCl ₃ correspondiente a la fracción 2 del LCNM.	47
Figura 41.	Espectro de masas del compuesto ácido anacárdico (An 15:3).	48
Figura 42.	Espectro de RMN- ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) correspondiente a la fracción 3 del LCNM.	49

Figura 43.	Espectro de RMN- ¹³ C (300 MHz, CDCl ₃) correspondiente a la fracción 3 del LCNM.	50
Figura 44.	Espectro de RMN COSY (¹ H- ¹ H) correspondiente a la fracción 3 del LCNM.	51
Figura 45.	Espectro de RMN-COLOC en CDCl ₃ correspondiente a la fracción 3 del LCNM.	52
Figura 46.	Espectro de RMN- ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) correspondiente a la fracción 5 del LCNM.	53
Figura 47.	Espectro de RMN- ¹³ C (300 MHz, CDCl ₃) correspondiente a la fracción 5 del LCNM.	55
Figura 48.	Espectro de RMN DEPT-135 (300 MHz, CDCl ₃) correspondiente a la fracción 5 del LCNM.	57
Figura 49.	Espectro de COSY (¹ H – ¹ H) correspondiente a la fracción 5 del LCNM.	58
Figura 50.	Espectro de RMN-COLOC en CDCl ₃ correspondiente a la fracción 5 del LCNM.	59
Figura 51.	Espectro de masas del Cardanol.	60

Anexos

- Figura 52.** Espectro de RMN- ^1H (300 MHz, CDCl_3) correspondiente a la fracción 1 del LCNM. 69
- Figura 53.** Espectro de RMN- ^{13}C (300 MHz, CDCl_3) correspondiente a la fracción 1 del LCNM. 70
- Figura 54.** Espectro de RMN DEPT-135 (300 MHz, CDCl_3) correspondiente a la fracción 1 del LCNM. 71
- Figura 55.** Espectro de COSY ($^1\text{H} - ^1\text{H}$) correspondiente a la fracción 1 del LCNM. 72
- Figura 56.** Espectro de RMN-COLOC en CDCl_3 correspondiente a la fracción 1 del LCNM. 73
- Figura 57.** Espectro de RMN- ^1H (300 MHz, CDCl_3) correspondiente a la fracción 6 del LCNM frito. 74
- Figura 58.** Espectro de RMN- ^{13}C (300 MHz, CDCl_3) correspondiente a la fracción 6 del LCNM frito. 75
- Figura 59.** Espectro de RMN DEPT-135 (300 MHz, CDCl_3) correspondiente a la fracción 6 del LCNM frito. 76
- Figura 60.** Espectro de COSY ($^1\text{H} - ^1\text{H}$) correspondiente a la fracción 6 del LCNM. 77
-

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Características del cromatograma HSCCC de la semilla frita (Hex/ACN).	39
Tabla 2.	Datos de RMN ^1H , del ácido anacárdico (CDCl_3 , 300 MHz)	42
Tabla 3.	Datos de RMN ^{13}C , del Ácido Anacárdico (CDCl_3 , 300 MHz).	44
Tabla 4.	Datos de RMN ^1H , del Cardanol (CDCl_3 , 300 MHz).	54
Tabla 5.	Datos de RMN ^{13}C , del Cardanol (CDCl_3 , 300 MHz).	56



Resumen

El *Anacardium occidentale* L. (Anacardiaceae) llamado marañón en nuestro país, es una planta nativa de Brasil y en gran medida utilizada en medicina popular para el tratamiento de úlceras, hipertensión y diarrea. [Nzi André Konan, 2007]. El líquido de la cáscara de la nuez de marañón (LCNM) es un aceite oscuro, rico en fenoles como el cardol, el cardanol y los ácidos anacárdicos; por ello ha sido estudiado como derivado fenólico alternativo de la industria petroquímica para su aplicación en la síntesis de polímeros en la producción de adhesivos, laminados, pinturas y plásticos [Vit, 2003].

Los principales componentes del líquido de la cáscara de la nuez de marañón, son los ácidos anacárdicos. Su estructura posee en la posición 6 de un anillo aromático una larga cadena, en el que se encuentra un doble enlace en el carbono 8. Está documentado que presenta actividades biológicas variadas, lo que ha estimulado su aplicación en varios campos de la medicina [Lúcio P. et al. 2005].

En este estudio, se comprobó la presencia de algunos componentes en el líquido de la cáscara de la nuez de marañón utilizando técnicas de cromatografía en contra corriente de alta velocidad (Ing. HSCCC) y Cromatografía Líquida-Espectrometría de Masas con ionización electrospray (HPLC-ESI-MS).

La identificación de los ácidos anacárdicos llamados “**ácido 6-[8(Z)11(Z)14-pentadecatrienil]salicílico**”, “**ácido 6-[8(Z)-pentadecenil]salicílico**” y del cardanol llamado “**3-[8(Z)-pentadecenil]fenol**” se llevaron a cabo utilizando distintas técnicas de Resonancia Magnética Nuclear (RMN): 1D - RMN (^1H , ^{13}C , DEPT-135), 2D- (COLOC, COSY).

I. Introducción



Anacardium occidentale L.

El anacardo es un árbol originario del Brasil, el cual fue descubierto por los Portugueses en el siglo XVI, que lo introdujeron en África y Asia, siendo la India su mayor productor. Además, se le conoce como Cajuil denominación proveniente de una tribu indígena los Tupis de Brasil. También se le conoce como "cajú" en portugués, Cajuil en español y Acajou o Cajou en francés [Teco, 2001], a la vez recibe distintos nombres según la región, como: anacardo (en España), castaña de cajú (en Uruguay, Argentina y Chile), cajuil (en República Dominicana), marañón (en Perú, sureste de México, Colombia, Ecuador, Panamá, Cuba y Centroamérica), merey en Venezuela, nuez de la India (específicamente su semilla, en el norte y centro de México) y pajuil (en Puerto Rico). [Teco, 2001]

El anacardo es un árbol que no demanda muchos esfuerzos de mantenimiento si se utiliza para reforestar. Sin embargo, cuando quieren aprovecharse sus frutos, puede hacerse necesario un aporte de agua y abono. [Teco, 2001]

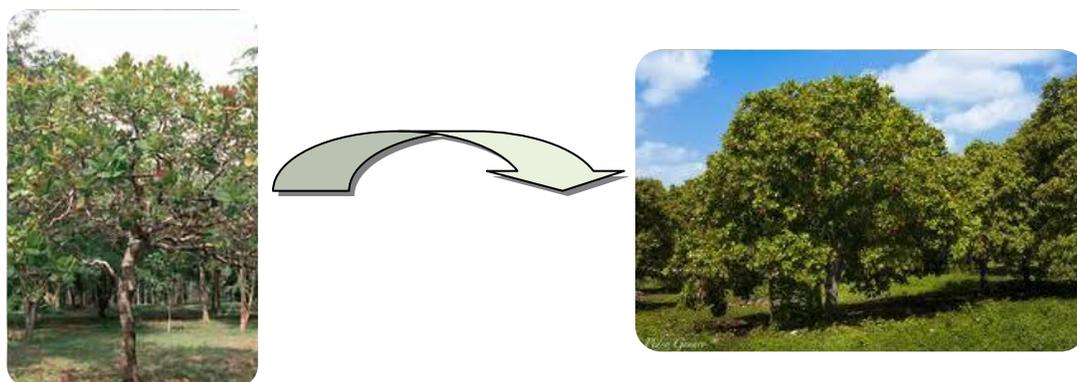


Figura 1. Árbol del anacardo de follaje denso y ramificado, utilizado también para reforestar.

Ya que su follaje es muy denso y ramificado, el árbol se utiliza muchas veces para la reforestación. La vida de un anacardo es de más o menos 30 años y produce frutos desde el tercer año de vida. Su madera puede también utilizarse para cajas y sus cenizas como abono. Su fruto por otra parte se utiliza para la alimentación. [Teco, 2001]

Existen dos etapas en el proceso de fructificación: La nuez se desarrolla primero (consigue su mayor tamaño en 30 días) y el pedúnculo se va desarrollando mientras que la nuez pierde humedad, se encoge y endurece.

La nuez tiene entonces una longitud aproximadamente de 5cm y una anchura de 3cm, lo que le da forma de apéndice. El pedúnculo presenta una gran diversidad de color ya que puede pasar del amarillo al rojo según la variedad que se cultive. [Teco, 2001]

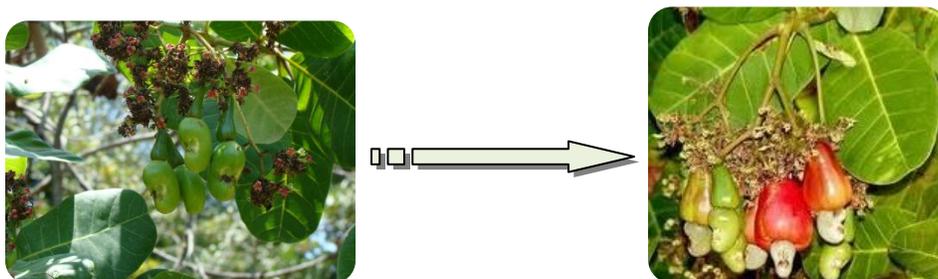


Figura 2. Etapas del proceso de fructificación.

El *Anacardium occidentale*, es utilizado en medicina popular para el tratamiento de úlceras, hipertensión y diarrea. [Nzi Andr´e Konan, 2007]. El líquido de la cáscara de la nuez de marañón (LCNM) es un aceite oscuro, rico en fenoles como el cardol, el cardanol y los ácidos anacárdicos; por ello ha sido estudiado como derivado fenólico alternativo de la industria petroquímica para su aplicación en la síntesis de polímeros para producir adhesivos, laminados, pinturas y plásticos [Vit, 2003].

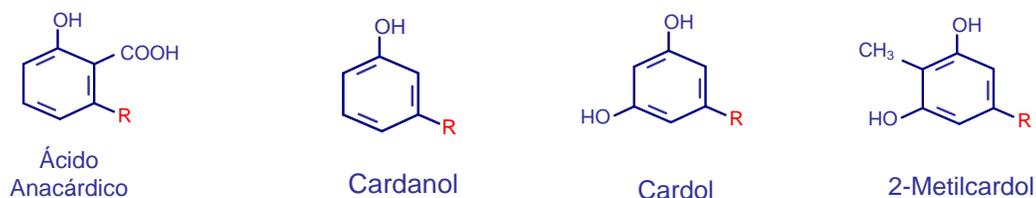


Figura 3. Metabolitos secundarios presentes en el líquido de la cáscara de la nuez de marañón.

Los ácidos anacárdicos aislados del *Anacardium occidentale* demuestran actividad antibacterial [Laurensw, 1997] y actividad antimicrobial [de Brito, 2007], y además, como agentes antitumorales [Kubo, 1993].

La actividad biológica de algunos de los componentes del líquido de la cáscara de la nuez del marañón atrae un gran interés en áreas relacionadas con la medicina, debido a sus propiedades antitumorales, antimicrobianas, antioxidantes y antimutagénicas [M.T.S. Trevisan, 2006].

Los fenoles o polifenoles constituyen un grupo considerable de compuestos, que pueden definirse, como, compuestos orgánicos presentes en la naturaleza que poseen al menos, un anillo aromático, con uno o más grupos hidroxilo unidos a él. [Piñeiro, 2005]

Los compuestos polifenólicos están ampliamente distribuidos en el reino vegetal, principalmente en forma de subproductos generados por el metabolismo, apareciendo como metabolitos secundarios en todas las plantas. Existe un alto interés en los compuestos fenólicos en relación a su potencial actividad fisiológica que depende de su actividad antioxidante. [Piñeiro, 2005]

Tanto los frutos como otras partes de las plantas son una importante fuente de sustancias fenólicas, tanto para la dieta, como para considerarlas a nivel comercial. [Piñeiro, 2005]

Los principales componentes fenólicos del líquido de la cáscara de la nuez de marañón, son los ácidos anacárdicos. Su estructura posee en la posición 6 de un anillo aromático una larga cadena, en el que se puede encontrar un doble enlace en el carbono 8, como se muestra en la *figura 4*. Está documentado que presenta actividades biológicas variadas, lo que ha estimulado su aplicación en varios campos de la medicina [Lúcio P. et al. 2005].

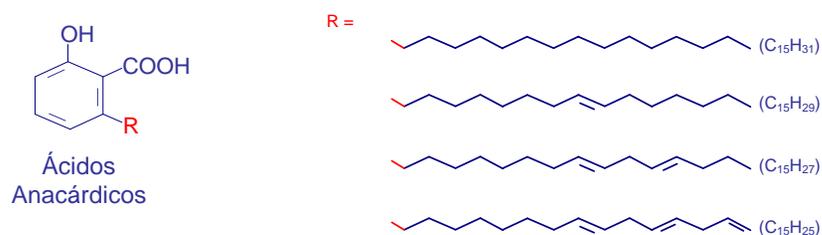


Figura 4. Estructura de los diferentes tipos de ácidos anacárdicos.

En El Salvador, se ha estudiado la producción del marañón manejado de forma orgánica, en pequeñas parcelas distribuidas en las comunidades rurales de las municipalidades de Tecoluca en el departamento de San Vicente y de Zacatecoluca en el departamento de La Paz con el procesamiento y comercialización del marañón orgánico. Esta estrategia ha proporcionado apoyo a la producción y mercados más seguros para los cultivos, a través del establecimiento de plantas agroindustriales en dos municipios del país. [Cummings, 2003]

En términos ambientales, la producción y procesamiento de los cultivos de marañón sin elementos químicos, elimina importantes fuentes de contaminación del ambiente tal como las pesticidas y los abonos químicos. También, la naturaleza permanente (el marañón) de estos cultivos proporciona servicios ambientales tales como la protección de los suelos, la filtración del agua y la captación de dióxido de carbono en el caso de los árboles del marañón. [Cummings, 2003]

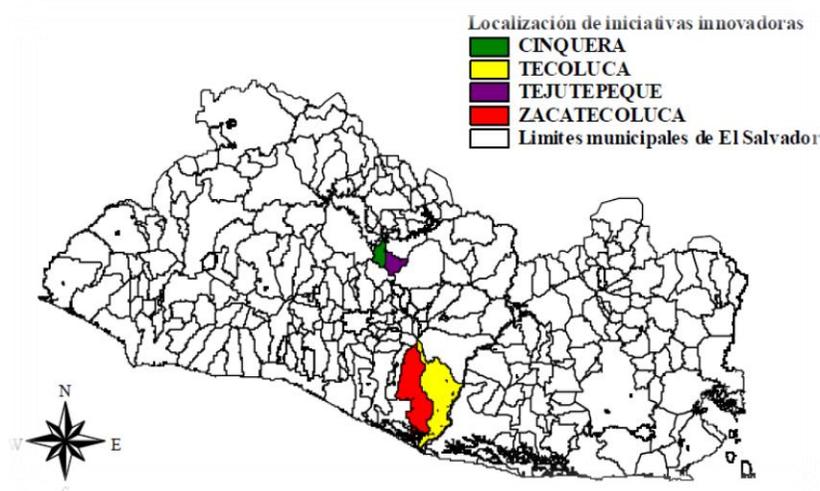


Figura 5. Mapa de ubicación de iniciativas innovadoras.

El marañón es una fruta tropical que no ha sido explotada en su totalidad en El Salvador; los desechos producidos por la obtención de la nuez ocasionan contaminación en los mantos acuíferos y en la atmósfera, ya que para deshacerse de estos subproductos, optan por depositarlos en los ríos o como último recurso quemarla, dañando el medio ambiente.

Para llevar a cabo este estudio se utilizaron los frutos para comprobar la presencia del cardanol y del ácido anacárdico (An 15:3), en el líquido de la cáscara de la nuez de marañón, utilizando como técnica de fraccionamiento la cromatografía de alta velocidad en contracorriente (*Ing.* HSCCC) y para la separación e identificación del cardanol y del ácido anacárdico la Cromatografía Líquida-Espectrometría de Masas con ionización electrospray (HPLC-ESI - MS).

Para la elucidación estructural de los compuestos separados se utilizó la técnica de Espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear 1D- RMN (^1H , ^{13}C , DEPT).

II. Objetivos



Anacardium occidentale L.

2.1 Objetivo General

- ✓ Aplicar técnicas cromatográficas y espectroscópicas, para el aislamiento y elucidación estructural de los componentes principales del líquido de la cáscara de la nuez de marañón (*Anacardium occidentale*).

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Identificar el sistema de disolventes adecuado para la separación de los compuestos presentes en la semilla frita, que serán utilizados en las técnicas de cromatografía en capa fina “Thin Layer Chromatography (TLC)” y Cromatografía en Contra Corriente de Alta Velocidad – High-Speed Counter-Current Chromatography (HSCCC).
- ✓ Fraccionar el extracto de la semilla frita del marañón mediante la técnica HSCCC.
- ✓ Aislar los metabolitos secundarios principales, presentes en el extracto de la semilla frita de marañón.
- ✓ Elucidar las estructuras químicas de los metabolitos, mediante las técnicas de Espectrometría de Masas “Electrospray Ionization Mass Spectrometry ESI-MS” y por Resonancia Magnética Nuclear “Nuclear Magnetic Resonance (NMR)” 1D-NMR y 2D-NMR.



III. Marco Teórico

v

Anacardium occidentale L.

3.1 EL MARAÑÓN (*Anacardium occidentale*)

El marañón, merey, nuez de la india, nuez o castaña de cajú, cauñil, o anacardo (*Anacardium occidentale*), es originario del noreste de Brasil, sin embargo, se ha propagado por todas las zonas tropicales del mundo. Se cultiva a gran escala en la India, Brasil y el este de África [M.T.S Trevisan, 2006].

El marañón se cultiva como árbol ornamental y frutal. Su fruto se consume tostado y el pedúnculo maduro se consume fresco. En Costa Rica también se obtiene vinagre, vino y conservas de marañón. Entre sus propiedades medicinales destaca el uso del jugo como anti diarreico, el aceite de la semilla para eliminar las verrugas, la decocción de la corteza como antidiabética, la goma exudada de la corteza para retener lectinas y los retoños de las hojas para tratar enfermedades renales. [Vit, 2003].

El *Anacardium occidentale*, pertenece a la familia de las *Anacardiaceae*, que agrupa cerca de 77 géneros y 600 especies dispersas en el mundo, principalmente en las regiones tropicales y subtropicales, con algunos representantes en las zonas templadas. [Mazza, 2010].

El género *Anacardium*, está compuesto por un número relativamente pequeño de especies, siendo el *A. occidentale* la que se cultiva y se distribuye en regiones tropicales. El origen de la orden a la cual pertenece (las Sapindales), datan desde hace aproximadamente 84 a 65 millones de años. [Franco, 2009]

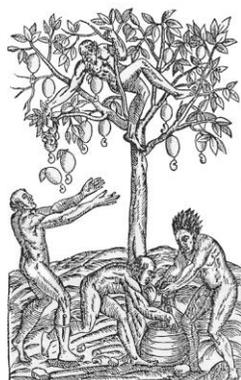


Figura 6. Primer registro conocido del género *Anacardium*, representa la cosecha de fruta de un árbol de marañón.



Figura 7. Clasificación Botánica (Publicado en: *Species Plantarum* 1: 383. 1753.)

El árbol posee un follaje perenne que desarrolla una copa densa y simétrica. La ramificación del tronco comienza muy cerca del suelo y las ramas que se ponen en contacto con el mismo pueden enraizarse. El fruto del marañón posee dos partes conocidas como fruto verdadero y fruto falso o pseudofruto. El fruto verdadero (la nuez) está constituido por una corteza gruesa que rodea al embrión. [*Species Plantarum*, 1753].



Figura 8. Fruto verdadero y fruto falso.

Las hojas, brillantes, son oblongas y redondeadas en el ápice, a menudo el color de las hojas jóvenes pueden ser desde un rojo oscuro a un amarillo verdoso, que cambian posteriormente a verde oscuro brillante. [Mazza, 2010].

El aceite que se colecta del proceso de rostizar la semilla es útil en la elaboración de resinas sintéticas, plásticos, productos farmacéuticos, producción de etanol y otros. [M.T.S. Trevisan, 2006].

Uno de los componentes activos del LCNM es el cardol, un resorcinol sustituido en la posición 5 del anillo aromático con una cadena lateral alifática y se emplea para producir pesticidas. Además encontramos al ácido anacárdico, un derivado del ácido salicílico con una cadena lateral de C₁₅ en la posición 6. [Vogl, 1996]

El aceite de color café oscuro que mana de la corteza es muy apreciado para elaborar repelentes contra insectos. Al LCNM se le atribuyen las siguientes propiedades o acciones: anti disentérica, anti-inflamatoria, antitusiva, material de fricción para elementos mecánicos rotatorios, aditivo de pinturas, cementos, capas especiales, para procesos químicos y para la transformación del cardanol como estabilizador para gasolinas. [M.T.S. Trevisan, 2006].

El marañón es utilizado como un remedio medicinal para el tratamiento de úlceras y diarreas. Además, es una fruta comestible la cual la hace muy popular para consumirse en forma de mermeladas y jugos, La nuez de marañón es un producto con un alto valor económico y nutritivo en América Latina [M. Himejima, 1991].

En los últimos años, el anacardo ha aumentado en valor, especialmente en los países donde se cultiva. [Kubo, 1993]. Hoy en día es un producto comestible que representa una agroindustria muy importante en el comercio de los EE.UU. con una producción anual de \$ 150-170 millones. [Bicalho, 2000].

Se debe tener mucho cuidado cuando se manipulan las nueces, ya que la corteza contiene un aceite fenólico cáustico y venenoso que puede causar dermatitis severa en individuos susceptibles. [*Species Plantarum*, 1753].

El LCNM se obtiene de forma mecánica a partir de la nuez de marañón tostado y es esencialmente una mezcla de 4 compuestos fenólicos: ácido Anacárdico (*figura 9*), cardanol, cardol y 2-metilcardol [*Oghome, P. 2004*] cuyas estructuras se pueden observar en la *figura 10, 11 y 12* respectivamente.

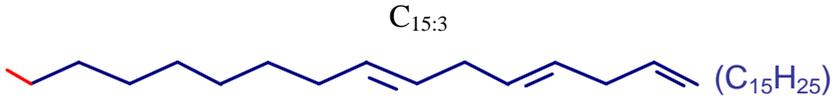
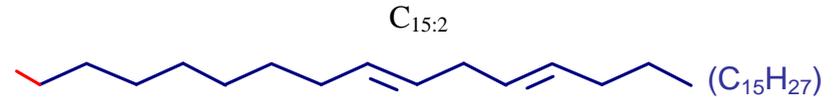
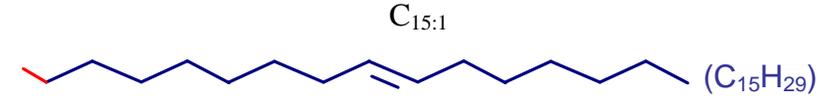
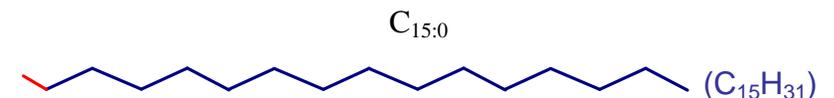
Ácido Anacárdico		
Estructura	R	Compuesto
	$C_{15:3}$ 	Ácido 6-[8(Z), 11 (Z), 14-pentadecatrienil] salicílico.
	$C_{15:2}$ 	Ácido 6-[8 (Z), 11(Z) -pentadecadienil] salicílico.
	$C_{15:1}$ 	Ácido 6-[8(Z)-pentadecenil] salicílico.
	$C_{15:0}$ 	Ácido 6-pentadecil salicílico.

Figura 9. Estructura de los ácidos anacárdicos.

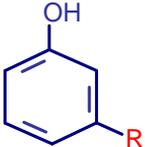
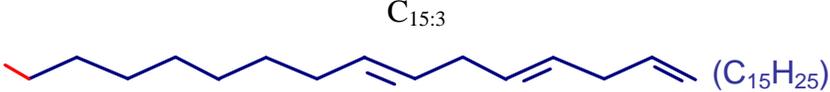
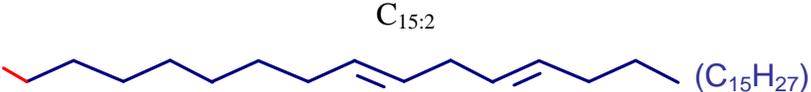
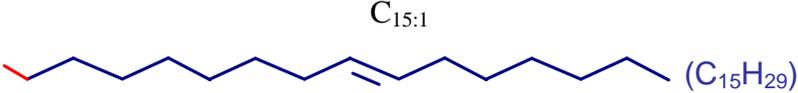
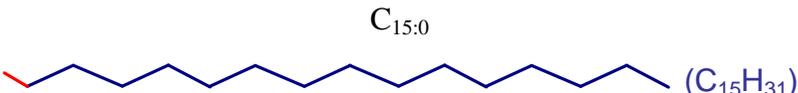
Cardanol		
Estructura	R	Compuesto
	$C_{15:3}$  ($C_{15}H_{25}$)	3-[8(Z), 11(Z), 14-pentadecatrienil] fenol.
	$C_{15:2}$  ($C_{15}H_{27}$)	3-[8(Z), 11(Z)-pentadecadienil] fenol.
	$C_{15:1}$  ($C_{15}H_{29}$)	3-[8(Z)-pentadecenil] fenol.
	$C_{15:0}$  ($C_{15}H_{31}$)	3-pentadecil fenol.

Figura 10. Estructura de los cardanoles.

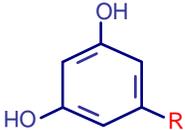
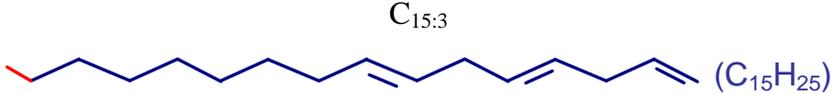
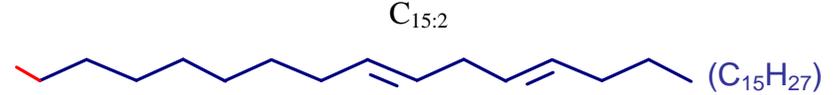
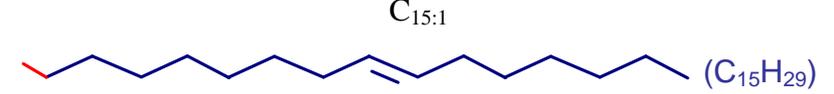
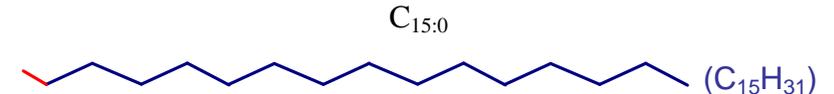
Cardol		
Estructura	R	Compuesto
	$C_{15:3}$  $(C_{15}H_{25})$	5-[8(Z), 11(Z), 14-pentadecatrienil] resorcinol.
	$C_{15:2}$  $(C_{15}H_{27})$	5-[8(Z), 11(Z)-pentadecadienil] resorcinol.
	$C_{15:1}$  $(C_{15}H_{29})$	5-[8(Z)-pentadecenil] resorcinol.
	$C_{15:0}$  $(C_{15}H_{31})$	5-pentadecil resorcinol.

Figura 11. Estructura de los cardoles.

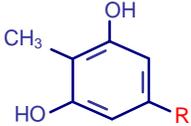
2-Metilcardol		
Estructura	R	Compuesto
	 C _{15:0} (C ₁₅ H ₃₁)	2-metil-5-pentadecil resorcinol.
	 C _{15:1} (C ₁₅ H ₂₉)	2-metil-5-[8(Z)-pentadecenil] resorcinol.
	 C _{15:2} (C ₁₅ H ₂₇)	2-metil-5-[8 (Z), 11(Z) -pentadecadienil] resorcinol.
	 C _{15:3} (C ₁₅ H ₂₅)	2-metil-5-[8(Z), 11 (Z), 14-pentadecatrienil] resorcinol.

Figura 12. Estructura de los 2-metilcardoles.

El grupo “R” que aparece como una cadena lateral alquímica puede ser saturada, de tipo mono olefínica (8), diolefínica (8, 11) y triolefínica (8, 11, 14). La descarboxilación del ácido anacárdico durante el proceso de destilación, produce principalmente cardanol. [Orazio, 2009].

El cardanol de grado industrial, es un aceite de color amarillo, obtenido por destilación al vacío del LCNM y es un compuesto fenólico con una cadena alifática de 15 carbonos ubicados en la posición meta, el cual presenta muchas aplicaciones entre las que se pueden mencionar como resinas fenólicas, para la síntesis de formaldehído, para la producción de pinturas, y forros de frenos. [Carioca, 2005].

Recientemente, el ácido anacárdico saturado (ver Figura 9) ha sido utilizado como materia prima en la preparación de análogos de sildenafil, un importante fármaco utilizado como tratamiento en disfunciones eréctil, conocido comercialmente como Viagra®. [Wellington, 2008].

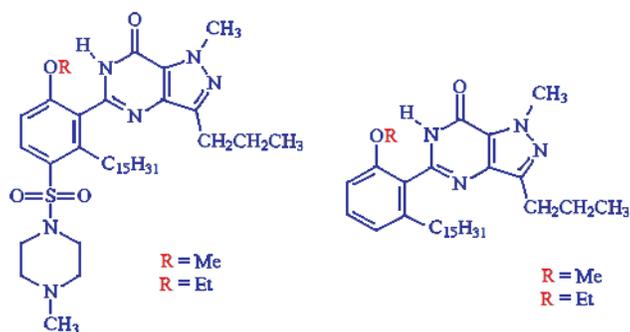


Figura 13. Análogos de sildenafil preparados a partir de los ácidos anacárdicos.

Derivados sintéticos del cardanol fueron estudiados por su potencial antitumoral, en líneas celulares de fibroblastos de ratón y se ha demostrado que poseen mayor actividad: el cardanol metilado, cardanol acetilado y 2-tert-butilcardanol. [Wellington, 2008].

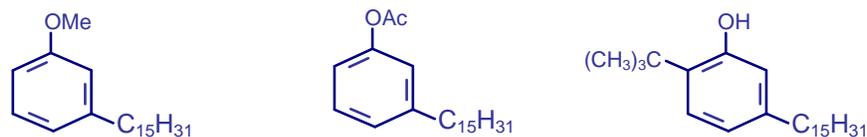


Figura 14. Derivados de cardanol con actividad antitumoral.

También a partir del cardanol, recientemente, fueron preparados análogos de rivastigmina, un importante fármaco utilizado como tratamiento contra el Alzheimer. [Wellington, 2008].

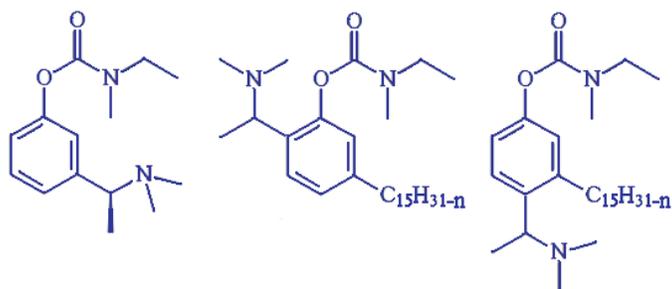


Figura 15. Rivastigmina y análogos derivados del cardanol.

3.2 BIOSINTESIS DE LOS ÁCIDOS ANACÁRDICOS

El origen biosintético de los ácidos anacárdicos se muestra en la *figura 16*, en donde se observa la reacción del Palmitoleoil-Coenzima A con tres moléculas de Malonil-Coenzima A. En las primeras dos etapas se puede observar la adición de una molécula de Malonil-CoA, con una posterior reducción en el carbonilo del carbono 3 seguida de una deshidratación, para luego sufrir una adición de otra molécula de Malonil-CoA, con lo cual se obtiene un compuesto con un número de átomos de carbono equivalente a la molécula de interés.

Como siguiente paso se produce una condensación aldólica intramolecular. En las etapas posteriores se observa la deshidratación y reducción del grupo carbonilo, lo cual lleva a la formación del anillo aromático, para que finalmente y después de una hidrólisis, se obtiene el ácido anacárdico. [Vieira, 2007].

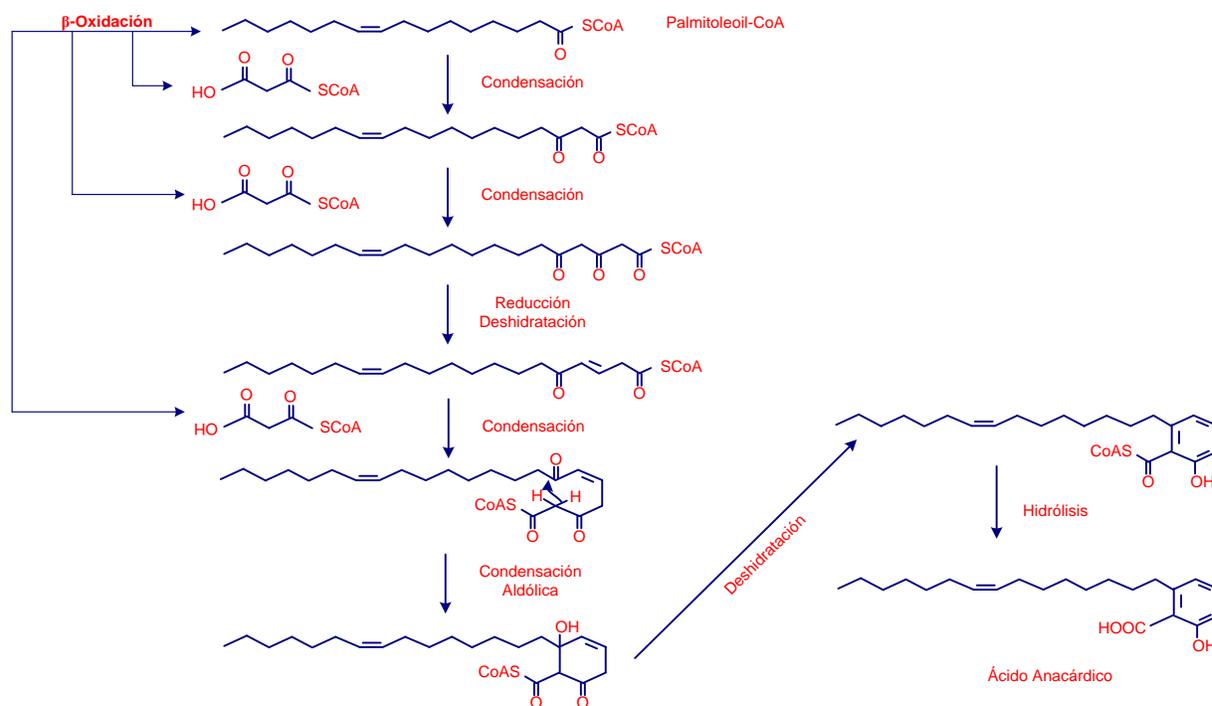


Figura 16. Origen Biosintético de los Ácidos Anacárdicos vía ácidos grasos.

3.3 CROMATOGRAFÍA EN CONTRA CORRIENTE DE ALTA VELOCIDAD

Para la separación de los compuestos fenólicos y los derivados del ácido salicílico presentes en la semilla y en la fruta, en los laboratorios de análisis se hace uso de la técnica de Cromatografía en Contra Corriente de Alta Velocidad “High-Speed Counter-Current Chromatography (HSCCC)”, que es libre de adsorción irreversible y a la vez ofrece una alta resolución. [Yoichiro, 2005].

La HSCCC fue desarrollada como una técnica de separación y en comparación con la cromatografía en columna se elimina el uso de un soporte sólido como fase estacionaria. Provee una separación eficiente en pocas horas para grandes cantidades de muestras (1 g) debido a la mejora de la resolución y el tiempo de separación, ya que se desarrolla a una mayor velocidad comparada con la Cromatografía en Contra Corriente convencional CCC (*Counter-Current Chromatography*). La HSCCC es reconocida como una técnica muy eficaz y ampliamente utilizada para la separación y purificación de diversos productos naturales. [Yoichiro, 2005]



Figura 17. Vista superior de HSCCC

A diferencia de la Cromatografía Líquida que utiliza un soporte sólido, la HSCCC utiliza un sistema de disolventes no miscibles entre sí, uno utilizado como fase estacionaria y el otro como la fase móvil del sistema. [Yoichiro, 2005]. La selección del sistema de disolventes implica elegir la fase estacionaria y la fase móvil, simultáneamente, a fin de lograr la resolución de los compuestos de interés, ya que un adecuado sistema de

disolventes y la optimización de las condiciones de trabajo desempeñan un papel muy importante en la separación en HSCCC. [Liu, 2004].

Para obtener un buen sistema de disolventes se deberán tener las siguientes consideraciones: a) el tiempo de separación entre las mezclas debe ser corto (es decir < 30 s). [Yan, 2004], b) un adecuado coeficiente de reparto (K) que se encuentre en un rango estimado entre $0.5 \leq K \leq 1.0$, ya que un valor de K muy pequeño, hace que los compuestos eluyan muy cerca del frente del disolvente, produciendo una pobre resolución y un valor de K mayor, tiende a dar una mejor resolución, pero con bandas muy anchas y una mayor dilución debido a mayores tiempos de elución. [Yoichiro, 2005].

La HSCCC se puede concebir como un proceso en tres etapas: la mezcla, la estabilización, y la separación (aunque a menudo se produce de forma continua). La mezcla es necesaria para que el analito se pueda distribuir entre las fases de acuerdo a su coeficiente de partición, el cual se puede definir como la relación de la cantidad de analito encontrada en cada uno de los disolventes en equilibrio, y está relacionado con la afinidad del analito por uno de los disolventes. [Cuevas, 2008]

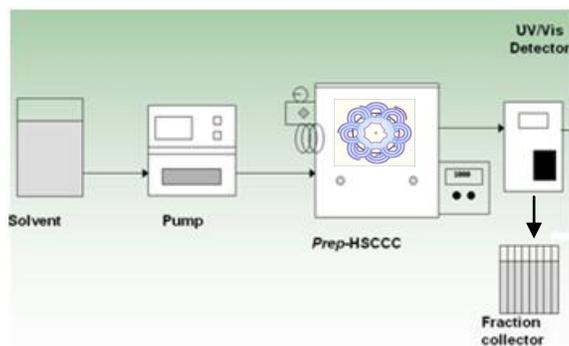


Figura 18. Esquema de un equipo de HSCCC.

Para la elección de la fase móvil, hay que tomar en cuenta que la interacción con la fase estacionaria debe ser óptima. Además, la muestra no debe contener sólidos para que no se dañe la columna, si es necesario deberá filtrarse. [Yoichiro, 2005] La HSCCC es una especie de cromatografía de partición líquido-líquido sin una matriz sólida, lo que elimina la adsorción irreversible de los analitos presentes en la muestra de interés. Esta técnica ha

sido aplicada con éxito para la separación y análisis de productos naturales; en varios países de Europa y en Brasil. [Gu, 2004]

El mecanismo de distribución de los solutos en HSCCC involucra dos fenómenos: a) Distribución hidrodinámica bilateral entre dos fases en la columna en espiral. b) La elución de las dos fases (ligera y pesada) a través de la rotación de la columna en espiral. [Yoichiro, 2005].

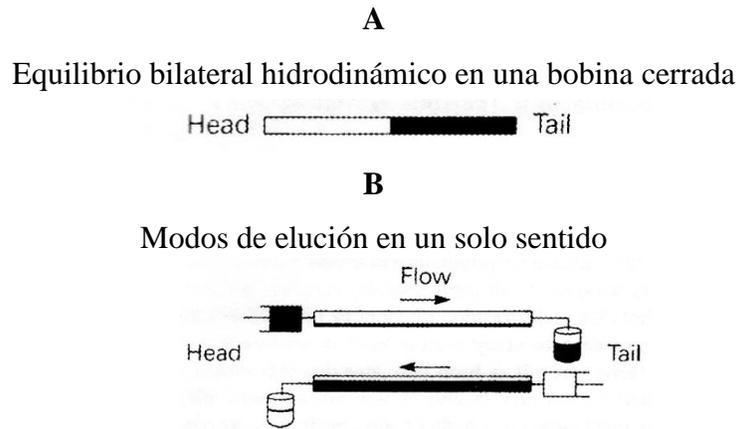


Figura 19. Mecanismo de trabajo de HSCCC

En la *figura 19* se presenta un esquema de movimiento y la distribución de dos fases en la columna de espiral y en la *figura 20* se puede observar las diversas posiciones de la columna. [Yoichiro, 2005].

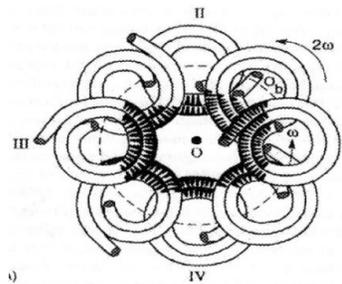


Figura 20. Esquema del movimiento y distribución de las dos fases en la columna de espiral de movimiento planetario tipo-J

La HSCCC incluye una columna en espiral (de plástico inerte) envuelto alrededor de un soporte en forma de vara, gira sobre su eje central (paralela a la dirección del flujo de disolvente) y gira en torno a un eje fijo fuera de su circunferencia. Los dos ejes son paralelos unos a otros en este tipo de movimiento. La designación "J" indica la forma en que los tubos de flujo (extensiones de la columna de entrada y salida) se colocan con el fin de evitar que se gire el tubo.

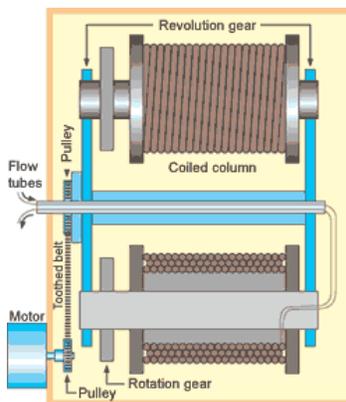


Figura 21. Esquema del movimiento y distribución de las dos fases en la columna de espiral

Este equipo utiliza sólo un eje de rotación, en los que un tambor en forma de rotor, gira. Cuando el rotor se pone en marcha, se crea un campo de fuerza constante (hidrostática), que se utiliza para mantener la fase estacionaria en su lugar.

3.4 TÉCNICAS DE ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) se ha convertido en la técnica por excelencia para la determinación de la estructura de los compuestos orgánicos. Al igual que en las técnicas basadas en la absorción de radiación IR, las basadas en RMN poseen como ventajas adicionales la de utilizar una pequeña cantidad de muestra y ser no destructiva. El espectro de RMN proporciona una gran cantidad de información sobre la estructura del compuesto. [Wade, 2004]

El espectrómetro de RMN consta de 4 partes, un imán fijo, con un controlador de campo muy sensible que produzca un campo magnético preciso, un transmisor de radiofrecuencia, capaz de emitir a una frecuencia precisa, un detector para medir la absorción de la energía de radiofrecuencia por parte de la muestra y un registrador para representar la señal de salida del detector frente al campo magnético aplicado. [Wade, 2004]

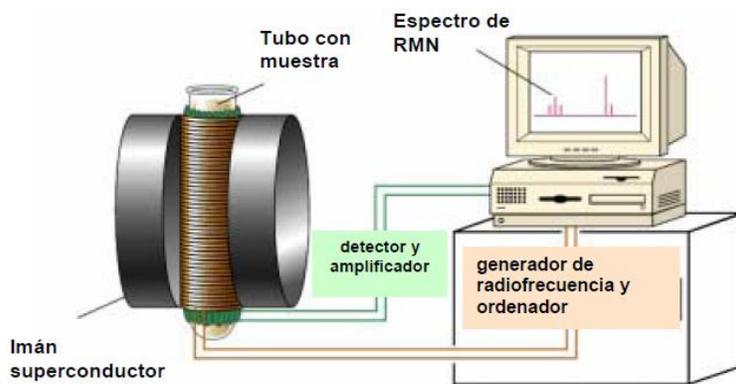


Figura 22. Esquema de equipo de Resonancia Magnética Nuclear [RMN]

La RMN de ^1H da información del número y tipo de hidrógenos diferentes que hay en la molécula. La posición en el espectro (desplazamiento químico) determina el entorno químico del núcleo, y por tanto da información de grupos funcionales a los que pertenecen o que están cerca. La forma de la señal da información de los protones cercanos acoplados escalaramente.

La RMN de ^{13}C al igual que en ^1H , proporciona la información de los grupos funcionales. Dependiendo del tipo de experimento realizado se puede obtener información del número de hidrógenos unidos a cada carbono.

Con la información producida por un equipo RMN se pueden realizar varios tipos de experimentos, como Distortionless Enhancement by Polarization Transfer (DEPT), el cual muestra señales positivas para todos los átomos de carbono de los grupos CH y CH_3 en una molécula. Por el contrario, los átomos de carbono de los grupos CH_2 se muestran como señales negativas. Esta es una información muy útil que ayuda en la determinación estructural.

COSY (Correlated Spectroscopy), RMN de dos dimensiones proporciona un medio de identificación de protones entre si y a la vez muy eficaz en establecer conectividades cuando un gran número de redes de acoplamiento deben ser identificados. El primer experimento COSY, fue propuesto por Jean Jeener, profesor de la Universidad Libre de Bruselas, en 1971. Este experimento se llevó a cabo posteriormente por Walter P Aue, Bartholdi Enrico y Richard R. Ernst, quienes publicaron su trabajo en 1976. [*Bravo, 2001*]

Los químicos orgánicos suelen utilizar COSY para aclarar los datos estructurales en las moléculas que no están representados de manera satisfactoria en un espectro de RMN de una sola dimensión. [*Portilla, 2003*]

El experimento COSY determina las correlaciones escalares a dos y a tres enlaces de distancia entre los núcleos que se acoplan escalarmente. Los experimentos homonucleares, como el COSY, muestran una serie de señales con las coordenadas iguales, a estas se le llama señales en la diagonal, las cuales corresponden a las señales del espectro monodimensional. Las señales que se localizan fuera de la diagonal son las importantes. [*Portilla, 2003*]

Las coordenadas de ellas son los desplazamientos químicos de los protones que se encuentran acoplados escalarmente a dos y tres enlaces de distancia. Con esta información

es posible asignar cada una de las señales de los protones en la molécula. Para ello, es necesario utilizar el desplazamiento químico de las señales que están correlacionando. [Portilla, 2003]

Con estos experimentos es posible determinar qué núcleos dentro de una molécula se encuentran acoplados entre sí. Este conocimiento nos permite determinar el número y tipo de protones que se encuentran a dos o a tres enlaces de distancia.

3.5 ESPECTROMETRÍA DE MASAS CON IONIZACIÓN POR ELECTROSPRAY (ESI-MS)

Una de las formas de introducción de muestras en un espectrómetro de masas es la Ionización por Electro spray (ESI), en donde el analito se disuelve en un disolvente volátil de carácter polar; esta mezcla que contiene al analito se hace pasar a través de una aguja que se encuentra colocada dentro de una boquilla, entre las cuales existe una diferencia de potencial, que normalmente es de 1 a 4 kV, lo que provoca que el líquido forme un cono conocido como *cono de Taylor*. [Wiley, 2009]

Luego que las gotas de la mezcla sean pulverizadas y cargadas con la misma polaridad que la carga de la aguja, son reducidas por evaporación, asistida por un flujo de nitrógeno caliente que pasa por la fuente de ionización hacia la fuente de muestreo. Los iones formados a presión atmosférica, pasan a través de un orificio, a una región de presión intermedia, para luego atravesar una pequeña apertura y ser trasladados al analizador de masas. En la *figura 23* y *figura 24*, se presenta el proceso comentado anteriormente [Wiley, 2009]

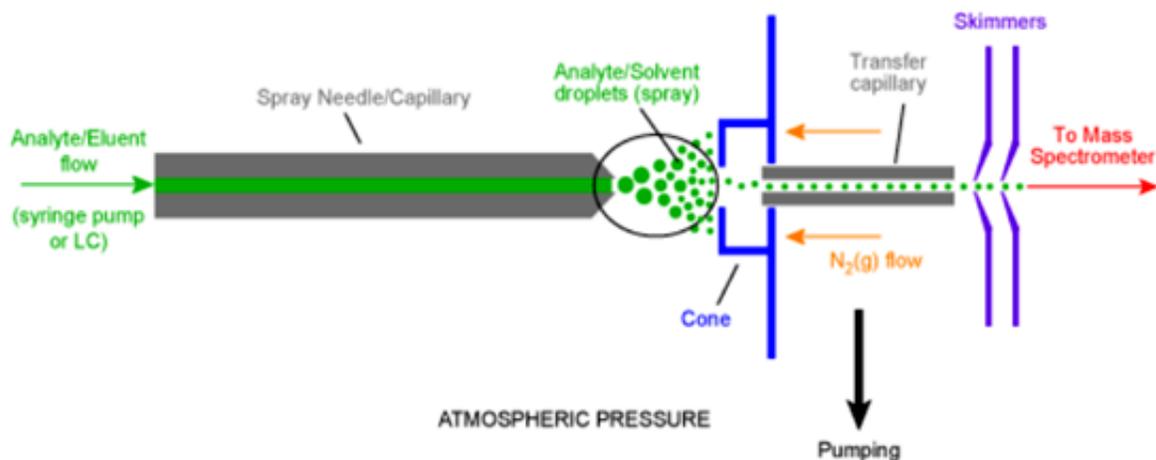


Figura 23. Esquema de una fuente ESI

En la Espectrometría de Masas, se bombardean moléculas con electrones y otras partículas, provocando su fraccionamiento. El análisis de los fragmentos de las masas de los iones formados proporciona información sobre la masa molecular, y da pautas sobre la estructura y los grupos funcionales presentes en la molécula. En este análisis se consume o destruye menos de un miligramo de muestra. [Wade, 2004]

Un espectrómetro de masas separa los iones de acuerdo con relación masa/carga y mide la abundancia de los diferentes iones generados. El espectro es el gráfico que se obtiene representando la relación masa/carga en el eje x ya la proporción relativa de cada tipo de ión en el eje y . [Wade, 2004]

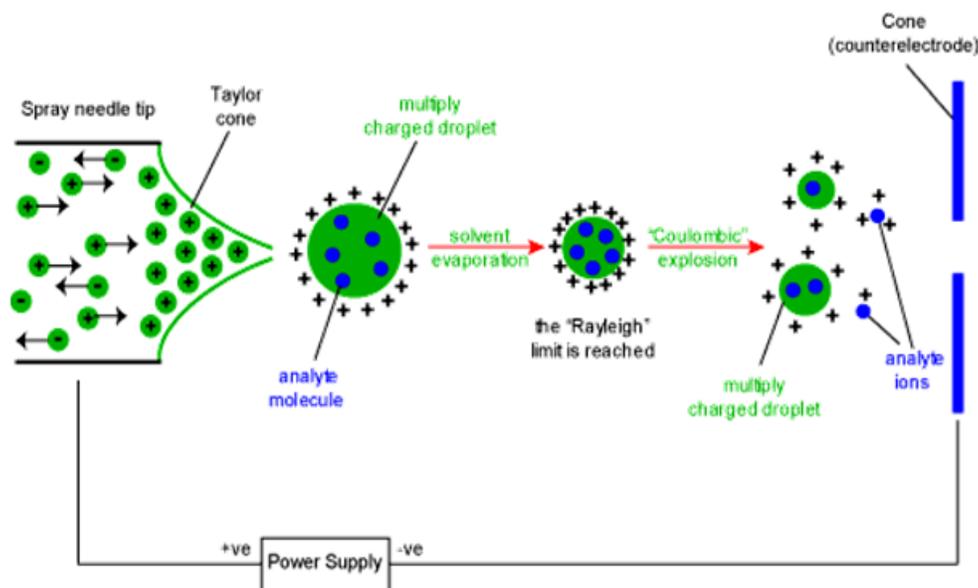


Figura 24. Esquema del mecanismo de formación de iones en ESI.

IV. Metodología Experimental





Figura 26. Obtención del líquido de la cáscara de la nuez de marañón.

4.3 Selección del sistema de disolventes

Para el líquido de la cáscara de la nuez de marañón frita, se realizaron ensayos para seleccionar el sistema de disolventes adecuado para llevar a cabo la Cromatografía de Contra Corriente de Alta Velocidad [High-Speed Counter-Current Chromatography (HSCCC)].

Estas pruebas fueron realizadas en viales. El objetivo de esta prueba se basa en medir el tiempo de separación de ambas fases, para lo cual se colocaron en un matraz de decantación 1,700 mL de uno de los disolventes (calidad HPLC) y 1,700 mL del otro (calidad HPLC) (1:1, v/v).

La fase superior (ligera) fue tomada como fase estacionaria, mientras que la fase inferior (pesada) fue tomada como fase móvil. Cada fase fue sometida a ultrasonido en un tiempo menor de 1 minuto para su desgasificación.

El primer sistema de disolventes analizado fue una mezcla de Hexano/Metanol (4:2 v/v) observándose un tiempo de separación de 7 segundos. El segundo sistema analizado fue una mezcla de Hexano/Acetonitrilo (4:2, v/v) observándose un tiempo de separación de 4 segundos. Si la separación observada es mayor de 30 segundos, significa que el sistema de disolventes no es muy adecuado para ser utilizada en HSCCC.

4.4 Preparación de la muestra para HSCCC

En 20 mL de la mezcla de disolventes (10 mL de fase estacionaria y 10 mL de fase móvil) se disolvieron 800 mg del líquido de la cáscara de la nuez de marañón. La mezcla se filtró y posteriormente se inyectaron en el HSCCC, cuyas condiciones de operación fueron a una longitud de onda $\lambda = 210$ nm, velocidad de 850 rpm y un flujo de 3.0 mL/min.



Figura 27. Mezcla a filtrar para su posterior inyección en el HSCCC.



Figura 28. Inyección de la muestra en el HSCCC.

4.5 Obtención de las fracciones por HSCCC

Una vez seleccionada la mezcla de disolventes y realizado el proceso de preparación de muestra para la cromatografía en contra corriente de alta velocidad (como se indica en 4.3 y 4.4) se procedió al fraccionamiento del aceite; las fracciones fueron recolectadas por una serie de tubos apilados en filas conocidos como rack.



Figura 29. Fracciones recolectadas en los diferentes rack.

El equipo utilizado fue:

Equipo:	High Speed modelo CCC-1000 Pharma-Tech Research Corporation, Triplecoil;
Volumen total Triplecoil:	850 mL
Bomba:	Jasco, Biotronik HPLC-Pump BT 3020
Detector:	Knauer K-2501
Inyector:	20 mL
Fraccionador:	Pharmacia LKB Super Fraction Collector

4.6 Preparación de muestras para RMN

Una vez obtenidas las fracciones, se desarrollaron placas de TLC (C_{18}) con el objetivo de comprobar su pureza, para luego someterlas a análisis por medio de Resonancia Magnética Nuclear (*Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* NMR). Las fracciones puras reconocidas, fueron concentradas en un rotavapor y luego se colocaron en un vial previamente pesado. Se elaboraron nuevamente placas de TLC y así se logró asegurar su pureza. Luego, el solvente fue evaporado por medio de una corriente de $N_{2(g)}$.

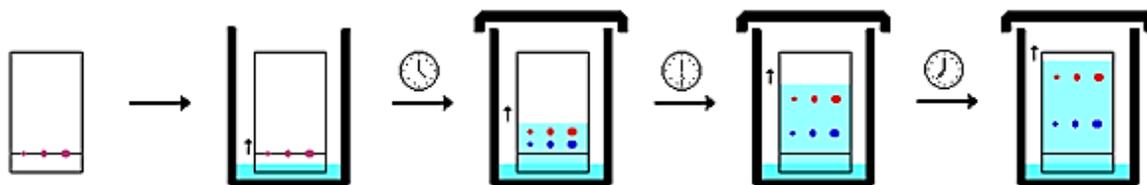


Figura 30. Sistema de elución en placas de TLC.

Las cromatografías en capa fina fueron realizadas sobre folios (20 x 20 cm) de gel de sílice tipo 60 F 254 con un espesor de 0.2 mm, marca Aldrich-Chemie D-7924 Steinheim y placas de TLC- C_{18} .

El sistema de elución utilizado en las placas de TLC fue una mezcla de disolventes, entre ellos: metanol y agua. (8:2, v/v)

4.7 Análisis en resonancia magnética nuclear (RMN)

Las técnicas de identificación utilizadas permitieron caracterizar y determinar algunas de las estructuras de las moléculas orgánicas presentes en el extracto estudiado. La técnica de resonancia magnética nuclear es la herramienta más poderosa que se dispone para la determinación de una estructura química.

Una vez comprobada la pureza de los compuestos, del fraccionamiento realizado en el HSCCC (4.5), a través de placas cromatográficas y concentradas en el rotavapor, se procedió a tomar 10 mg de las fracciones puras y se disuelven en cloroformo deuterado (CDCl_3) a las cuales se les realizaron experimentos de RMN ^1H , RMN ^{13}C , DEPT135, y experimentos bidimensionales como el COSY y COLOC.

Los espectros de RMN- ^1H y ^{13}C se realizaron en un espectrómetro Bruker-Spectrospin 300 UltraShieldTM (frecuencia de resonancia ^1H y ^{13}C = 300 MHz). Los desplazamientos químicos (δ) para los núcleos de ^1H y ^{13}C se reportan en ppm relativo a un estándar interno de tetrametilsilano (TMS).

Además de los RMN de ^1H y ^{13}C , se realizó el DEPT135 el cual proporcionó información de la cantidad y el tipo de carbonos presente en la estructura.

Los espectros bidimensionales se realizaron en el mismo equipo, utilizando los siguientes experimentos:

COSY $^1\text{H} - ^1\text{H}$ (Correlated Spectroscopy): Correlaciona todos los desplazamientos químicos de protones sobre carbonos contiguos, con lo cual es posible ubicar los protones vecinos que están acoplados.

COLOC: Espectroscopía de correlación a través de acoplamiento a larga distancia, es una técnica que se utiliza para determinar que protón de una molécula se une a un átomo de carbono.



Figura 31. Espectrómetro Bruker-Spectrospin 300 UltraShield™

4.8 Preparación de muestras y análisis en ESI-MS

La espectrometría de masas es el método más simple para determinar la masa molecular de un compuesto e incluso, la fórmula molecular correspondiente. Con esta técnica se pretende comprobar la presencia de los ácidos anacárdicos y cardanoles presentes en la muestra, por medio de sus pesos moleculares.

Las fracciones puras, encontradas para llevar a cabo los experimentos en resonancia magnética nuclear, también fueron utilizadas para su análisis en ESI-MS, utilizando metanol calidad HPLC como medio disolvente.



Figura 32. Espectrómetro LC-ESI-MS

Equipo: Esquire-LC, Bruker Daltonics (Bremen); LC-ESI-MS/MS con Ion Trap Mass Spectrometry

Software: HP ChemStation con EsquireControl, Análisis

Bomba: HP Series 1100 HPLC Pump G1312A BinPump

Detector: Merck Hitachi L-4000 UV Detector

Registrador: Shimadzu C-R6A Chromatopac

Inyector: Rheodyne 7725, inyector de muestra de 20 μ L

4.9 Esquema general de separación e identificación del LCNM

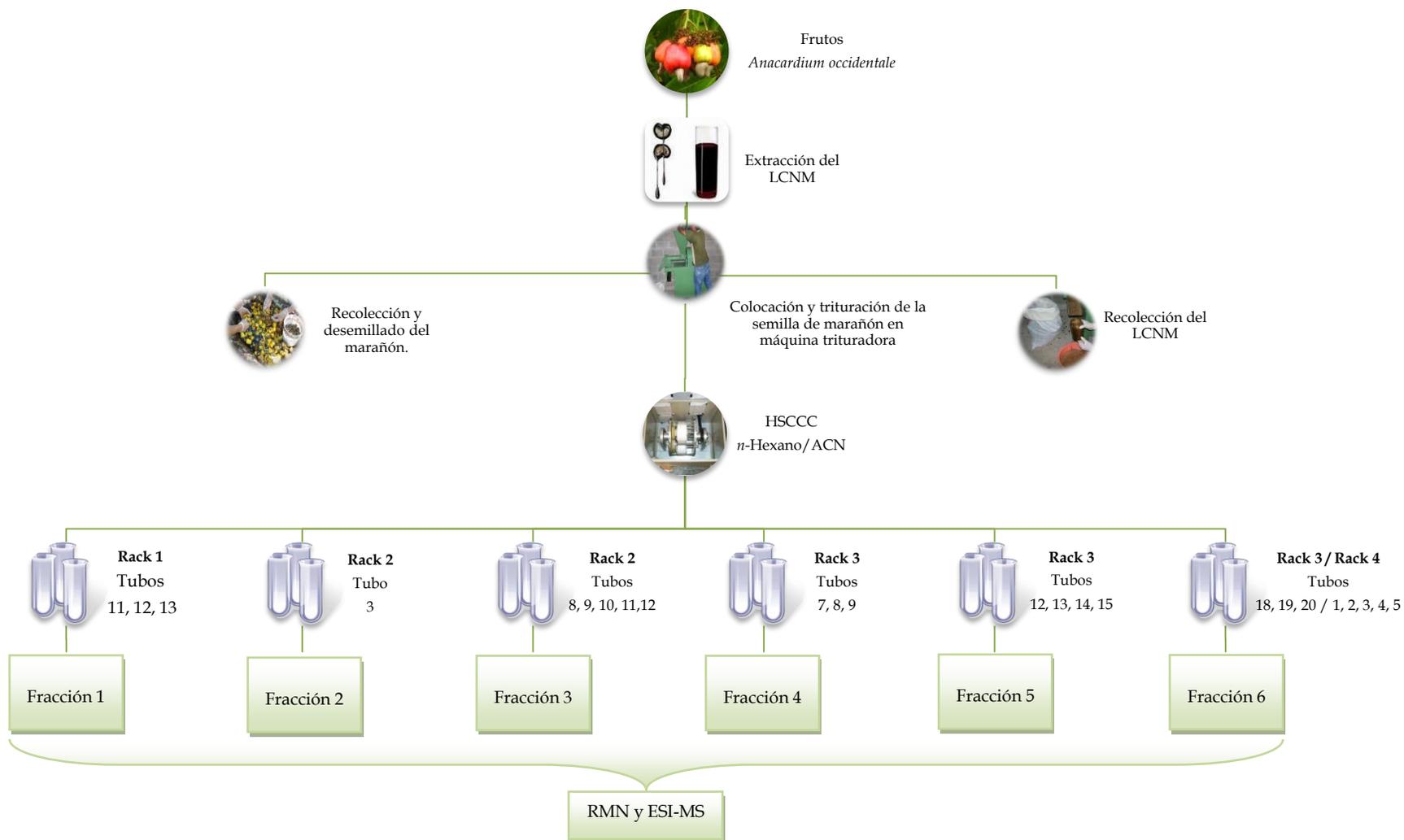
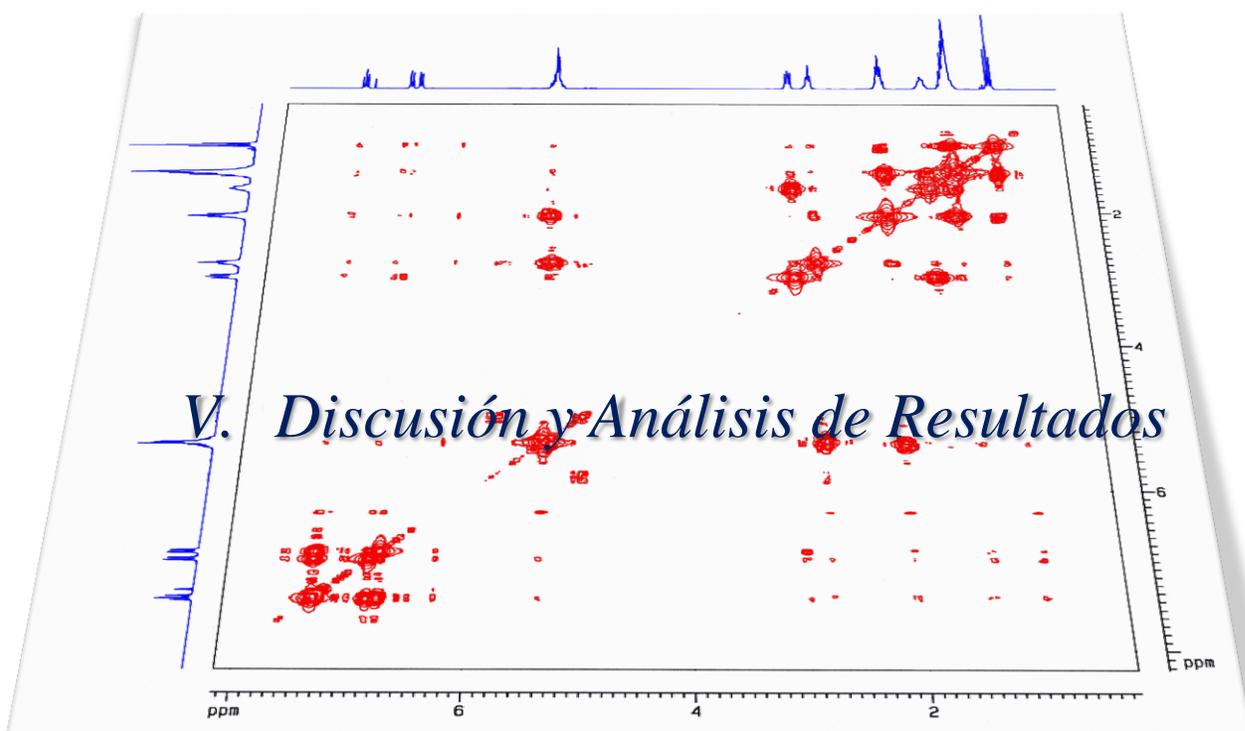


Figura 33. Esquema de separación e identificación del LCNM

En el esquema de separación e identificación de los componentes del líquido de la cáscara de la nuez de marañón se describe un resumen de todo el proceso que se llevaron a cabo para el análisis de nuestros compuestos presentes en el Líquido de la Cáscara de la Nuez de Marañón.

Una vez recolectado el marañón, se lleva a cabo el proceso de desmolido de forma manual, posterior a ello se procede con la extracción del Líquido de la Cáscara de la Nuez de Marañón (*frito o no frito*) de manera artesanal, a través de una máquina expelidora.

El proceso de separación del Líquido de la Cáscara de la Nuez de Marañón en el HSCCC, se hace con una mezcla de *n*-Hexano/ACN (4:2 v/v) donde la fase estacionaria es el *n*-Hexano y la fase móvil el Acetonitrilo, del cual se obtienen 6 fracciones puras que son llevadas posteriormente a análisis de RMN y ESI-MS.



En seguida describiremos los compuestos aislados presentes en el líquido de la cáscara de la nuez de marañón posterior a su separación cromatográfica con el HSCCC; aunque se obtuvieron seis fracciones puras, únicamente se presentan los resultados para las fracciones 2, 3 y 5. Las estructuras de los metabolitos encontrados, fueron comparadas con datos reportados en la bibliografía.

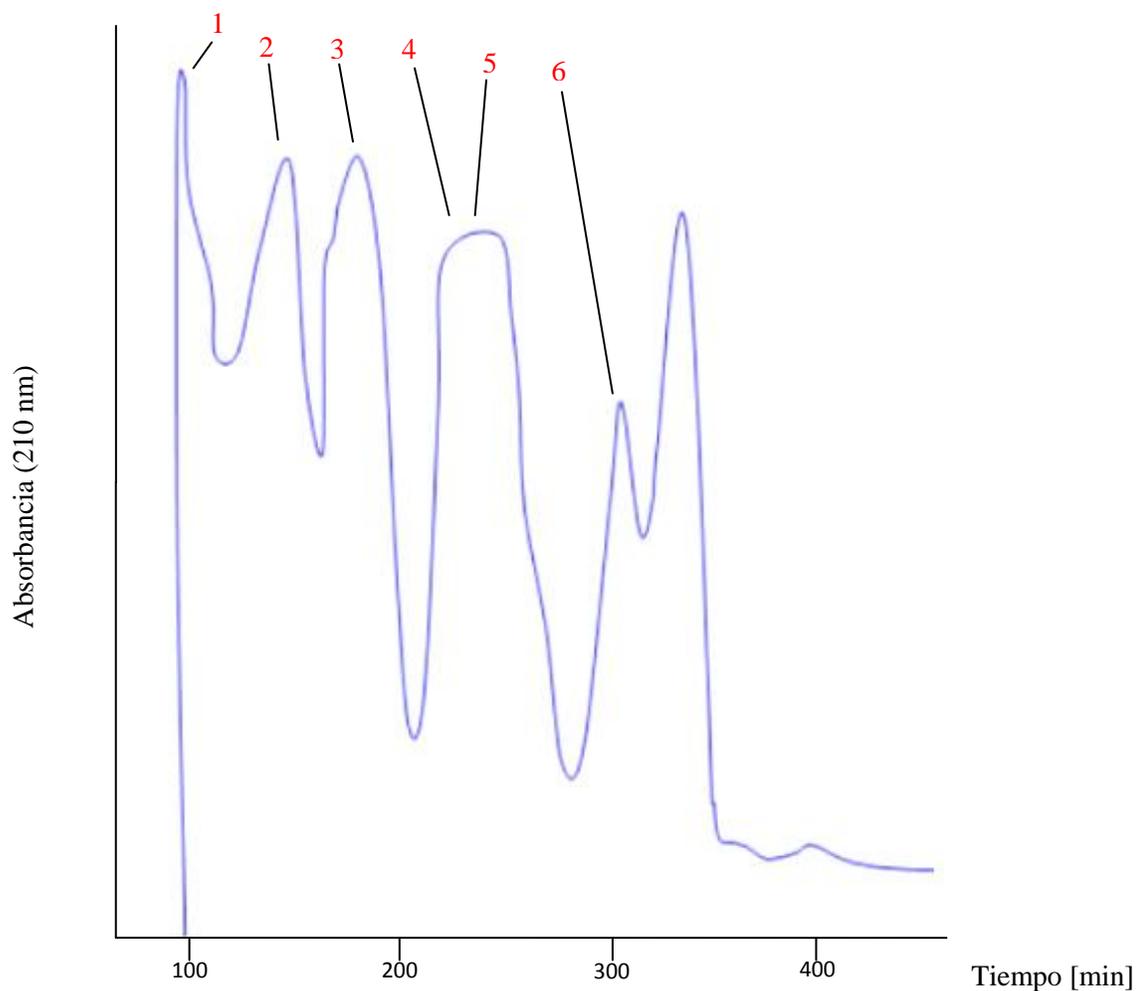


Figura 34. Cromatograma HSCCC del LCNM de la semilla frita (Hex/ACN).

En la *figura 34* se muestra el cromatograma donde se pueden observar los picos correspondientes a las fracciones obtenidas de la separación utilizando HSCCC, con detección a una longitud de onda de 210 nm.

Tabla 1. Características del cromatograma HSCCC de la semilla frita (Hex/ACN)

Pico ^a	Fracción	Rack	Tubo
1	1	1	10-13
2	2	2	3
3	3	2	8-12
4	4, 5	3	7-9, 12-15
5	6	3, 4	18-5

^a enumerado de acuerdo a figura 34.

En la tabla 1 se puede observar que el primer pico del cromatograma presentado en la *figura 34* corresponde a la fracción 1, la cual estaba contenida entre los tubos 10 y 13 del rack 1, que corresponde a una fracción pura. La pureza de ésta y todas las fracciones separadas, se comprobaron, como ya se mencionó, utilizando cromatografía de capa fina.

El segundo pico corresponde a la fracción 2, el cual mostró la pureza necesaria para ser sometida al análisis de RMN, y como se discutirá más adelante, se logró la identificación del ácido *6-[8(Z)11(Z)14-pentadecatrienil]salicílico* (ácido anacárdico).

El tercer pico corresponde a la fracción 3, el cual mostró la pureza necesaria para ser sometida al análisis de RMN, y como se discutirá más adelante, se logró la identificación del ácido *6-[8(Z)-pentadecenil]salicílico* (ácido anacárdico).

Las fracciones 4 y 5 provenientes del pico 4, estuvieron contenidas entre los tubos del 7 al 9 y del 12 al 15 del rack 3. Como se discutirá más adelante, la fracción 5 se sometió a análisis por RMN y se pudo identificar la presencia del *3-[8(Z)pentadecenil]fenol* (cardanol).

En las placas de TLC (*ver figura 35*), utilizando como agente revelador anisaldehído, se obtuvieron las manchas correspondientes a las fracciones puras obtenidas de la separación del líquido de la cáscara de la nuez de marañón a través de la cromatografía en

contracorriente de alta velocidad, utilizando como sistema disolvente $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (8:2, v/v).



Figura 35. Placas de TLC $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (8:2 v/v) correspondientes a las fracciones 2, 3 y 5 del LCNM.

5.1 ANÁLISIS DE LA FRACCIÓN 2 DEL LCNM.

Una vez obtenidas las fracciones y comprobada su pureza, se realizó una purificación posterior y análisis con espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN). En la figura 36 se puede observar el espectro de RMN-¹H de la fracción 2 del LCNM.

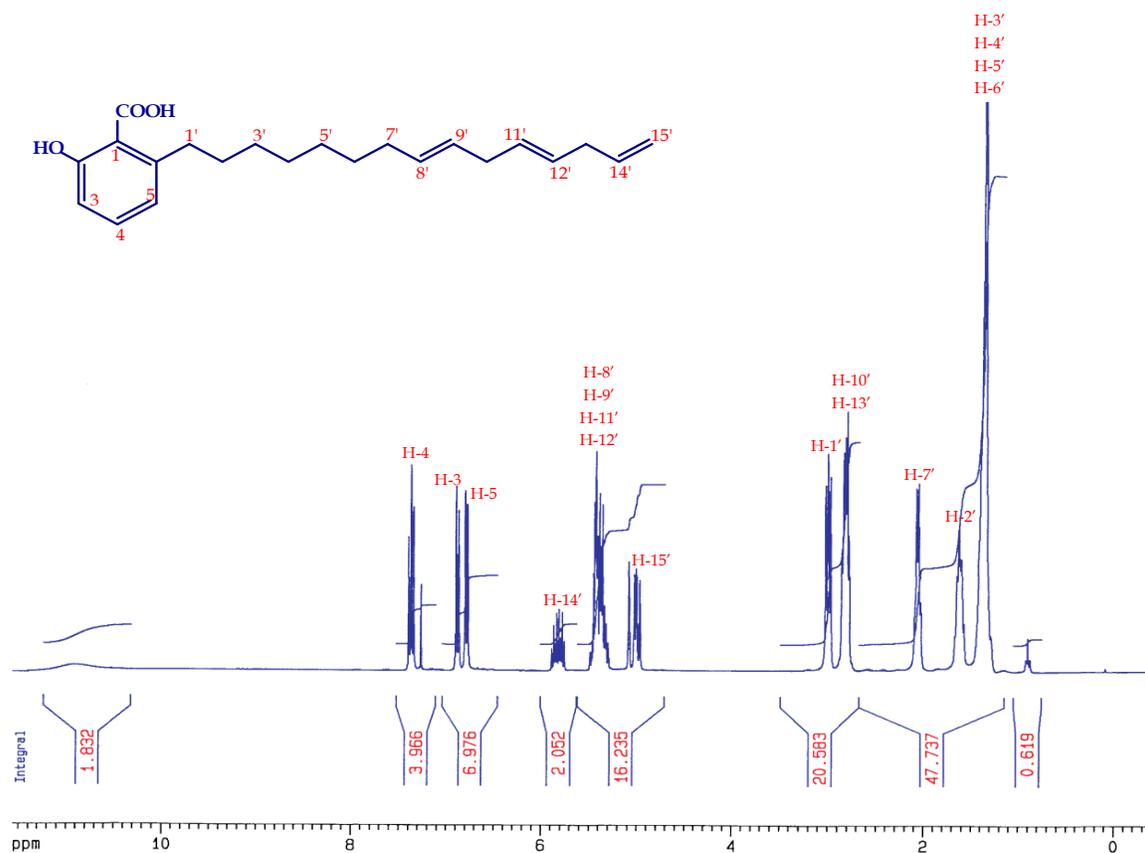


Figura 36. Espectro de RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃) correspondiente a la fracción 2 del LCNM

El espectro de RMN de ¹H (tabla 2) mostró una señal en el rango de δ_H 1.20-1.80, como multiplete de señales solapadas para metilenos alifáticos; un multiplete asignable a un metileno en posición alílica a un protón de doble enlace, δ_H 2.04 (m, H-7'), otro multiplete que integra para dos protones y que es asignable a dos metilenos en posición alílica a protones de doble enlace, δ_H 2.80 (m, H-10',H-13'), un triplete correspondiente a un metileno alifático unido a carbono sp² aromático a δ_H 3.0 (2H, d, $J= 8.0$ Hz, H-1').

Una señal de metileno de doble enlace terminal a δ_H 5.05 (2H, m, H-15'), un multiplete que integra para cuatro protones aromáticos a δ_H 5.40 (4H, m, H-8', H-9', H-11', H-12'), un protón vinílico vecinal a un metileno de doble enlace terminal, δ_H 5.85 (1H, m, H-14'), y señales correspondientes a tres protones aromáticos, dos como dobletes a δ_H 6.76 (1H, d, $J= 7.6$, H-5) y δ_H 6.86 (1H, d, $J= 8.4$ Hz, H-3), y uno como doblete a δ_H 7.35 (1H, dd, $J= 7.6, 8.4$ Hz, H-4).

Tabla 2. Datos de RMN 1H , del ácido anacárdico (CDCl₃, 300 MHz)

H	RMN 1H ($\delta =$ ppm)
1	-
2	-
3	6.86 d ($J = 8.4$ Hz),
4	7.35 dd ($J = 7.6, 8.4$)
5	6.76 d ($J = 7.6$)
6	-
1'	3.0 d ($J = 8.0$)
2',3',4',5',6'	1.20-1.80* m
H-8',H-9',H-11', H-12'	5.40* m
7'	2.04 m
10',13'	2.80 m
14'	5.85 m
15'	5.05 m

*Señales solapadas

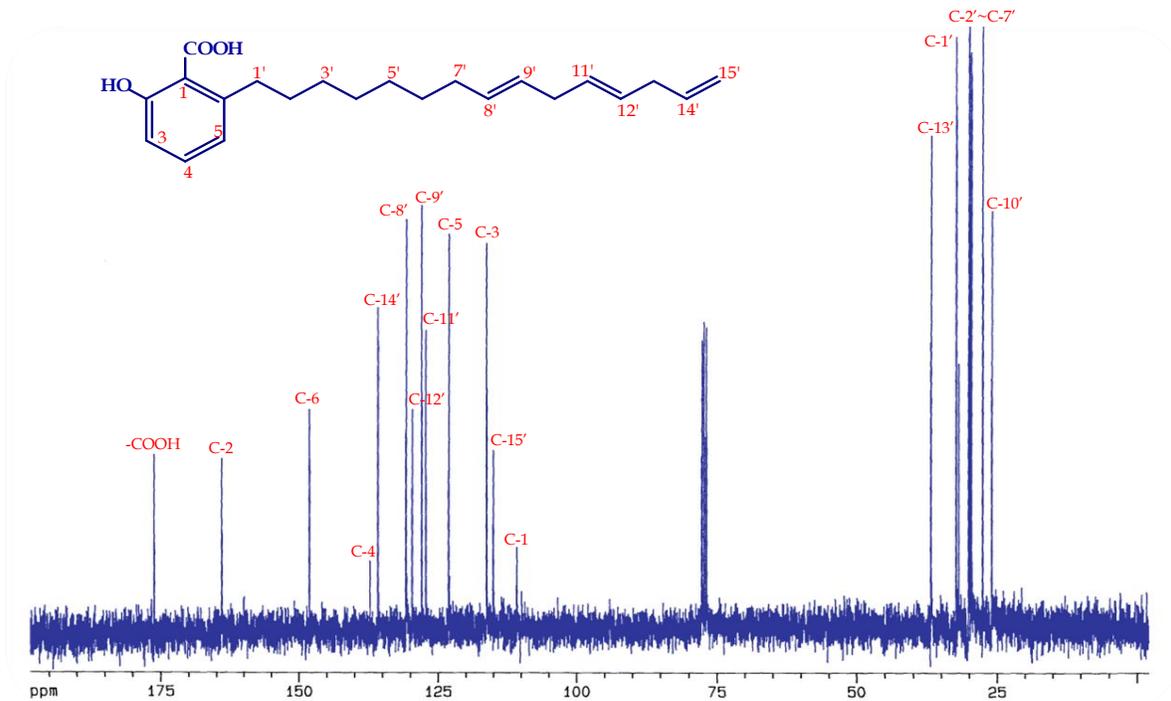


Figura 37. Espectro de RMN- ^{13}C (300 MHz, CDCl_3) correspondiente a la fracción 2 del LCNM

En el espectro de RMN de ^{13}C (tabla 3) mostró señales para 22 carbonos, de los cuales, nueve carbonos metilénicos alifáticos con hibridación sp^3 en la región δ_{C} 25.0-37.0, de los que se observan las señales a δ_{C} 25.9 (C-10'), δ_{C} 32.3 (C-1'), δ_{C} 36.8 (C-13') y en el rango de δ_{C} 25.0-32.1 ppm, el resto de carbonos de la cadena alifática. A un desplazamiento de δ_{C} 110.8, 164.0, 148.0 aparecen las señales que se corresponden con tres carbonos cuaternarios del anillo aromático, asignables a C-1, C-2 y C-6 respectivamente. Así también se observan señales para los tres metinos del anillo aromático a δ_{C} 116.3 (d, C-3), 123.1 (d, C-5) y 137.2 (d, C-4). También se observan señales para seis metinos como carbonos sp^2 de doble enlace a δ_{C} 115.0, 127.2, 128.0, 129.7, 130.8 y 135.8 asignados a los carbonos C-15', C-11', C-9', C-12', C-8' y C-14' respectivamente. Finalmente, una señal a δ_{C} 76.1, asignada al carbono carboxílico de la molécula.

Tabla 3. Datos de RMN ^{13}C , del ácido anacárdico (CDCl_3 , 300 MHz)

C	RMN ^{13}C ($\delta = \text{ppm}$)
1	110.8 s
2	164.0 s
3	116.3 d
4	137.2 d
5	123.1 d
6	148.0 s
1'	32.3 t
2'-7'	25.0-32.1*
8'	130.8 d
9'	128.0 d
10'	25.9 t
11'	127.2 d
12'	129.7 d
13'	36.8 t
14'	135.8 d
15'	115.0 t
-COOH	176.1s

* Señales solapadas

El espectro DEPT 135 (figura 38), proporcionó información con respecto a los carbonos CH₃, CH₂ y CH presentes en la estructura, permitiendo confirmar algunas de las asignaciones realizadas.

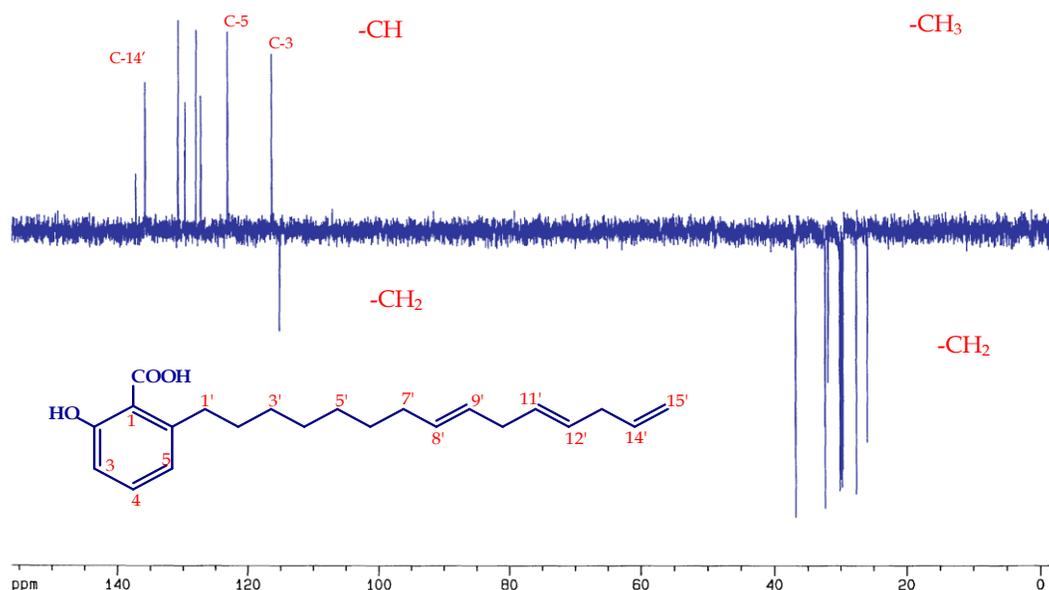


Figura 38. Espectro de RMN DEPT-135 (300 MHz, CDCl₃) correspondiente a la fracción 2 del LCNM.

El estudio de los experimentos bidimensionales homo y heteronucleares COSY COLOC respectivamente, nos permitió establecer la posición de los diferentes grupos funcionales sobre la molécula. Así, en el experimento COSY se observó correlación entre los protones metilénicos H-1' con H-2', y H-6' con H-7'. De H-7' con el protón vinílico H-8', los protones del doble enlace terminal H-14' y H-15', y el vinílico H-9' con el metileno H-10'.

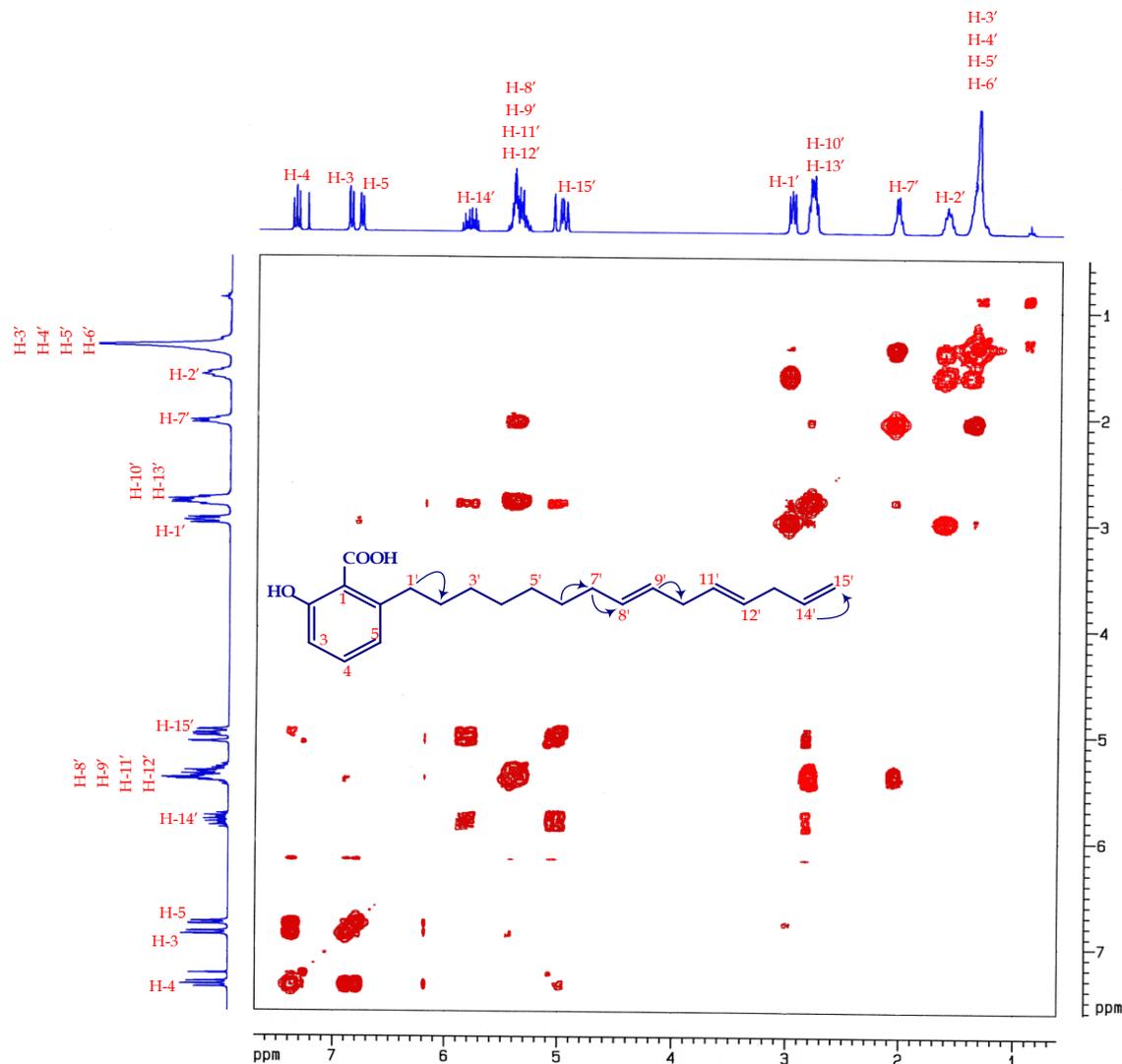


Figura 39. Espectro de COSY ($^1\text{H} - ^1\text{H}$) correspondiente a la fracción 2 del LCNM

La localización de los distintos grupos funcionales en la molécula se determinó a partir de las correlaciones a larga distancia observadas en un experimento COLOC. Así, como correlaciones más relevantes destacamos la del protón aromático H-4 (δ_{H} 7.35) con los carbonos cuaternarios C-2 (δ_{C} 164.0) y C-6 (δ_{C} 148.0), la correlación de H-5 (δ_{H} 6.76) con los carbonos C-3 (δ_{C} 116.3) y C-1 (δ_{C} 110.8), H-1' (δ_{H} 3.0) y los carbonos cuaternarios C-1 (δ_{C} 110.8) y C-6 (δ_{C} 148.0). Lo cual, nos permitió establecer tanto la posición de la cadena alifática, como la posición de los otros grupos funcionales sobre el anillo aromático.

Por otro lado, las correlaciones del protón vinílico H-13' (δ_H 2.80) con los carbonos C-15' (δ_C 115.0), C-11' (δ_C 127.2) así como H-12' (δ_H 5.40) con C-11' (δ_C 127.2) confirmó la presencia de un sistema insaturado 1-4 terminal en la cadena alifática. El otro doble enlace en la cadena fue establecido en base a las correlaciones observadas entre H-10' (δ_H 2.80), con los carbonos de doble enlace C-8' (δ_C 130.8), C-9' (δ_C 128.0) y C-12' (δ_C 128.0); así como las correlaciones del metileno H-7' con los metinos de doble enlace C-8' (δ_C 130.8) y C-9' (δ_C 128.0). Todos estos datos nos permitieron fijar las posiciones de los dobles en la cadena, situados entre C-8' y C-9', C-11' y C-12, C-14' y C-15' del ácido anacárdico.

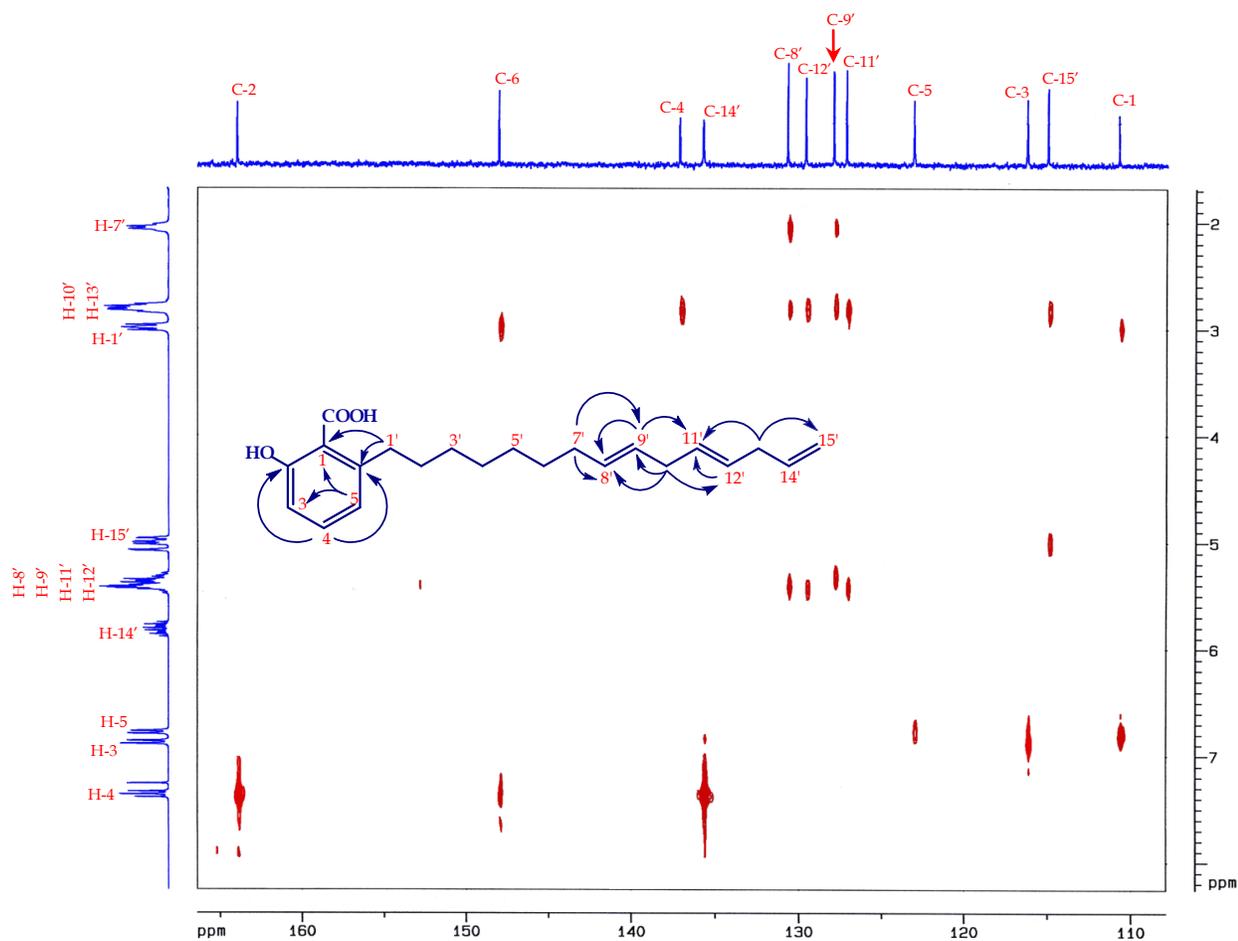


Figura 40. Espectro de RMN-COLOC en CDCl_3 correspondiente a la fracción 2 del LCNM.

El análisis de las muestras por medio de ESI-MS se llevó a cabo en un Esquire-LC, Bruker Daltonics (Bremen); LC-ESI-MS con Ion Trap Mass Spectrometry en el modo de ionización negativa [MH]⁻.

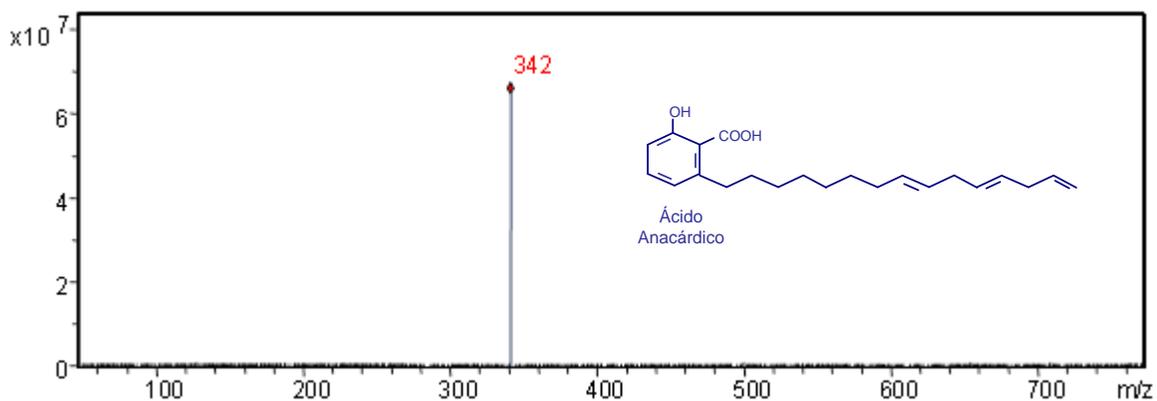


Figura 41. Espectro de masas del compuesto ácido anacárdico (An 15:3)

En la *figura 41* se muestra el espectro de masas del producto que hemos denominado An 15:3 el cual presentó una fórmula molecular C₂₂H₃₀O₃, correspondiente a la fracción 2 con un pico de ión molecular a 342.0 m/z, debido a esto se puede concluir que la estructura a este compuesto corresponde al ácido anacárdico con 3 insaturaciones en su cadena R en las posiciones C8, C11 y C14.

5.2 ANÁLISIS DE LA FRACCIÓN 3 DEL LCNM.

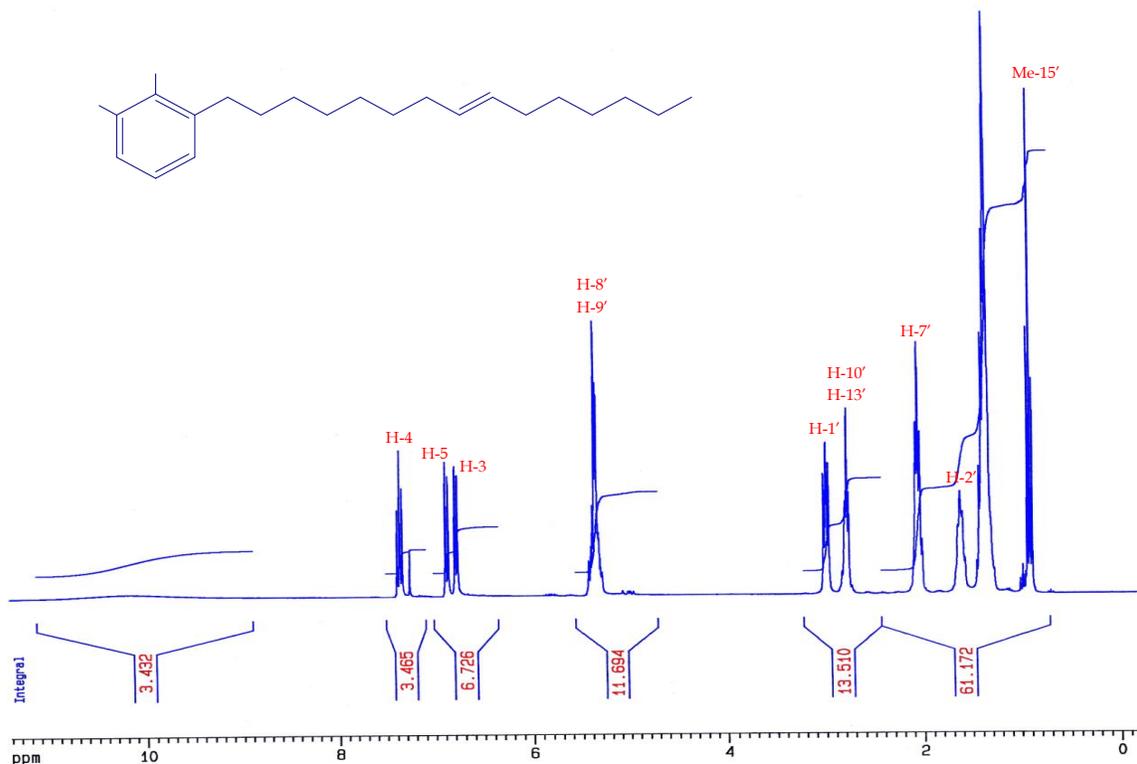


Figura 42. Espectro de RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃) correspondiente a la fracción 3 del LCNM

El espectro de RMN ¹H de la fracción 3 (figura 42) reveló la presencia de diferentes tipos de señales que muestran protones aromáticos donde H-4, H-5 y H-3 corresponden a los (-CH=) del anillo aromático. Las señales H-8' y H-9' corresponden a la insaturación de la cadena alifática, y entre los valores δ 3.0 y 0.8 ppm sugieren la presencia del resto de protones correspondientes a la cadena alifática, H-1', H-2', H-7', H-10' y H-13' como el Me-15'

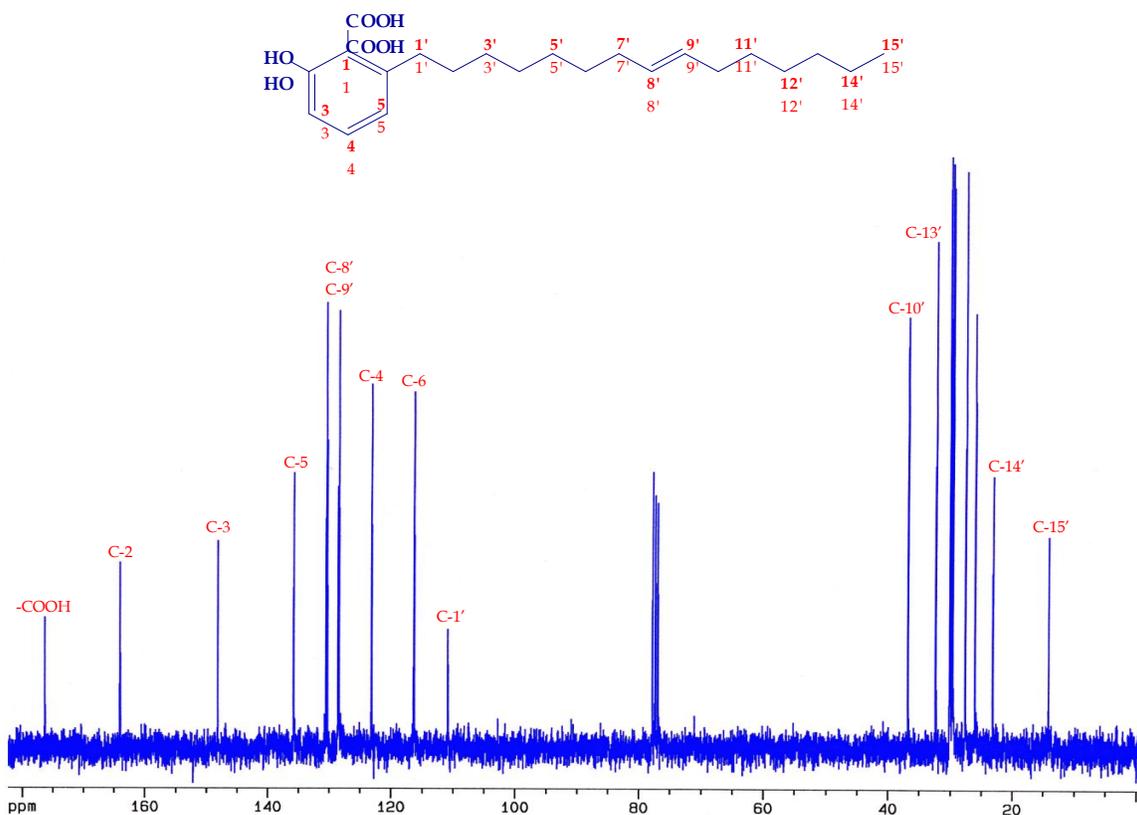


Figura 43. Espectro de RMN- ^{13}C (300 MHz, CDCl_3) correspondiente a la fracción 3 del LCNM

El espectro de RMN ^{13}C de la fracción 3 (figura 43) reveló la presencia de diferentes tipos de señales que muestran carbonos aromáticos donde C-3, C-4, C-5, C-6 corresponden a los (-CH=) del anillo aromático. Las señales C-8' y C-9' corresponden a la insaturación de los grupos metinos de la cadena alifática. A 164 ppm aparece una señal que corresponde al carbono aromático unido al átomo de oxígeno. A 176.3 sugiere la presencia de un grupo -COOH. La resonancia de carbonos entre los valores δ 36.7 y 14.1 ppm sugieren la presencia de carbonos saturados correspondientes a la cadena alifática.

El experimento bidimensional homonuclear ^1H - ^1H (COSY), permite asignar los sistemas de espines nucleares de protones a dos y tres enlaces.

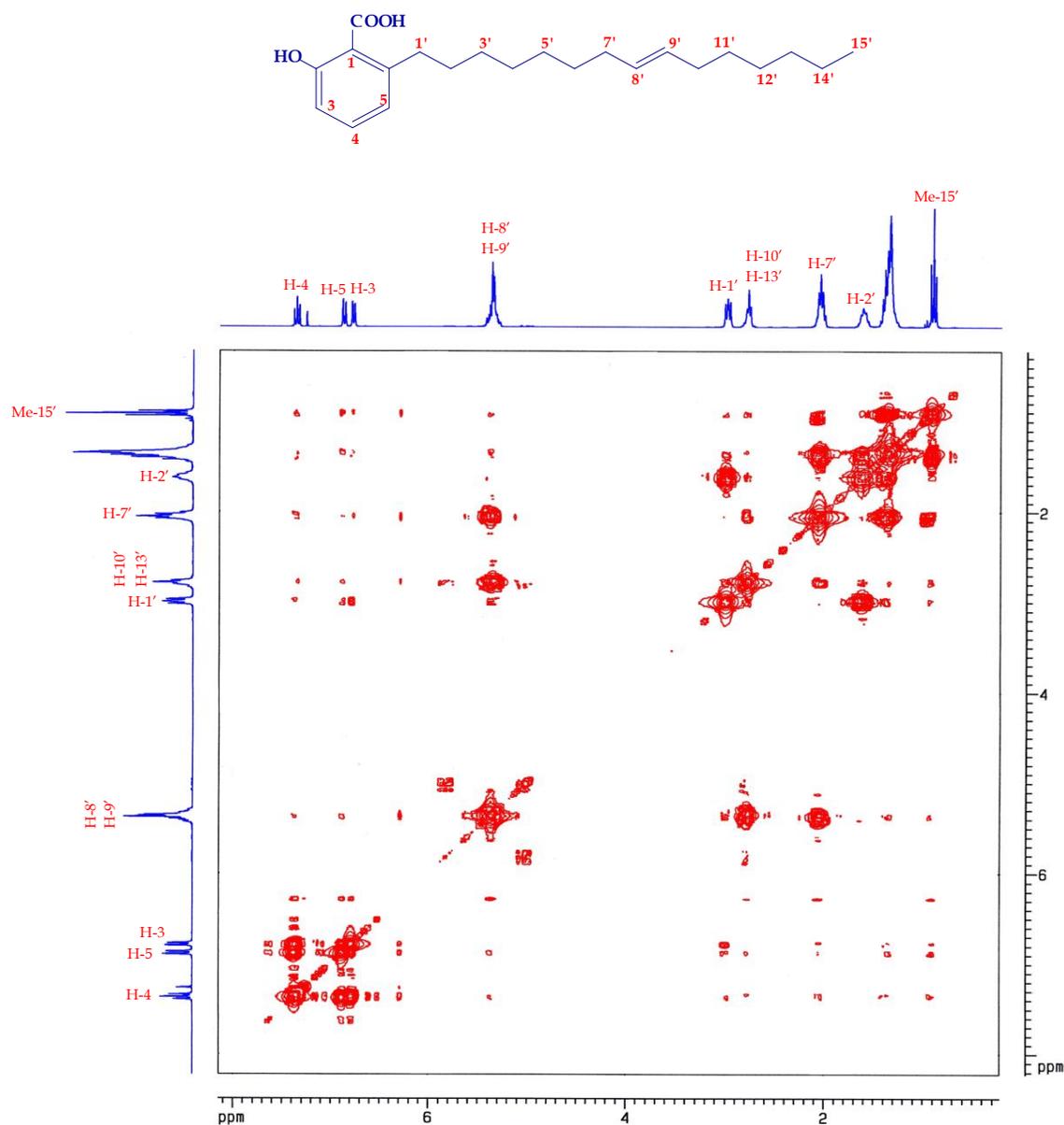


Figura 44. Espectro de RMN-COSY (^1H - ^1H) correspondiente a la fracción 3 del LCNM

La localización de los distintos grupos funcionales en la molécula se determinó a partir de las correlaciones a larga distancia observadas en un experimento bidimensional

heteronuclear COLOC; que aun siendo una técnica poco sensible, permite situar la posición de los sustituyentes en el anillo aromático y los protones vinílicos en la cadena lateral. Así, se observan algunas correlaciones como H-4 con C-2 y H-5 y C-1'

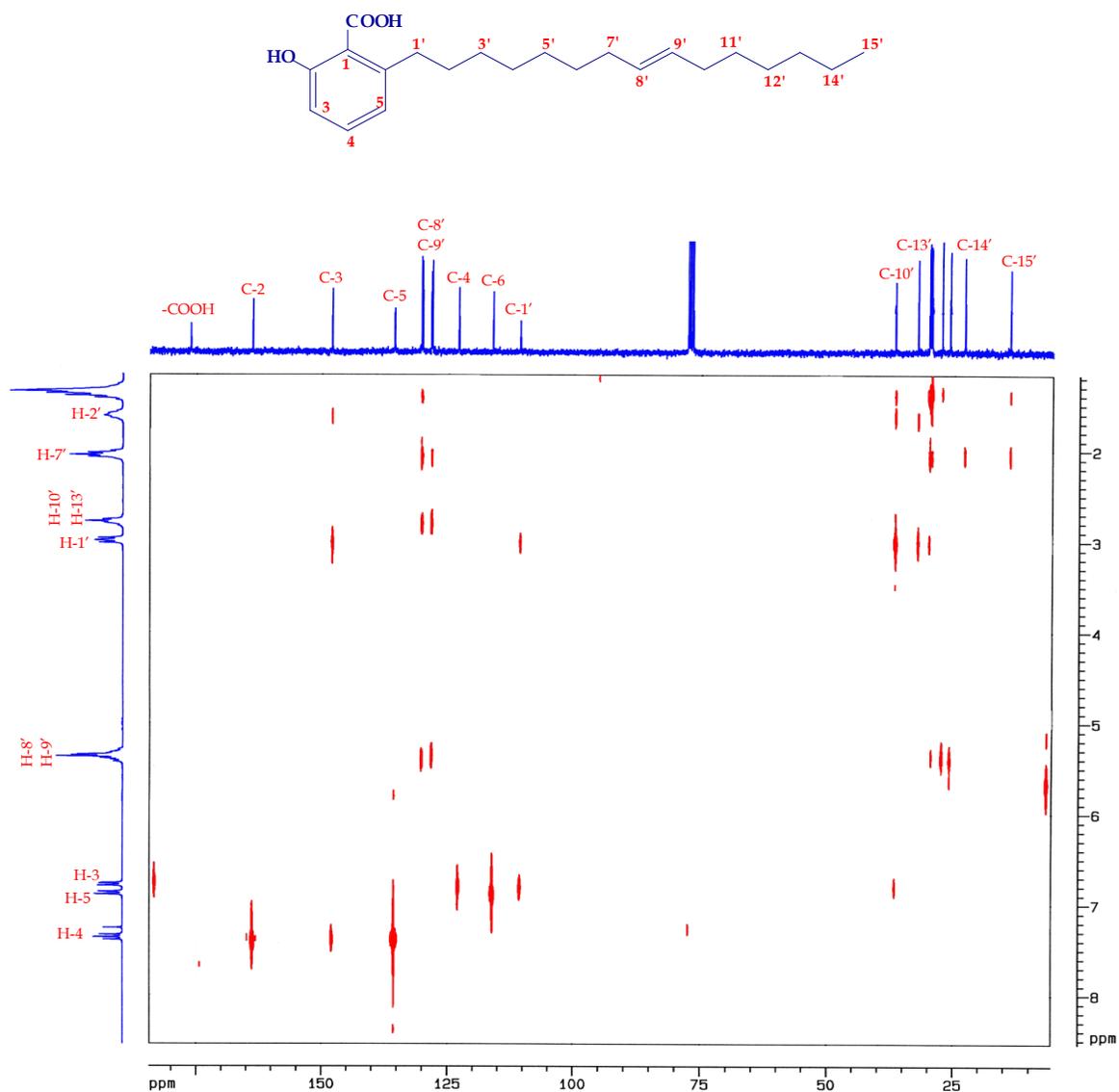


Figura 45. Espectro de RMN-COLOC en $CDCl_3$ correspondiente a la fracción 3 del LCNM

5.3 ANÁLISIS DE LA FRACCIÓN 5 DEL LCNM.

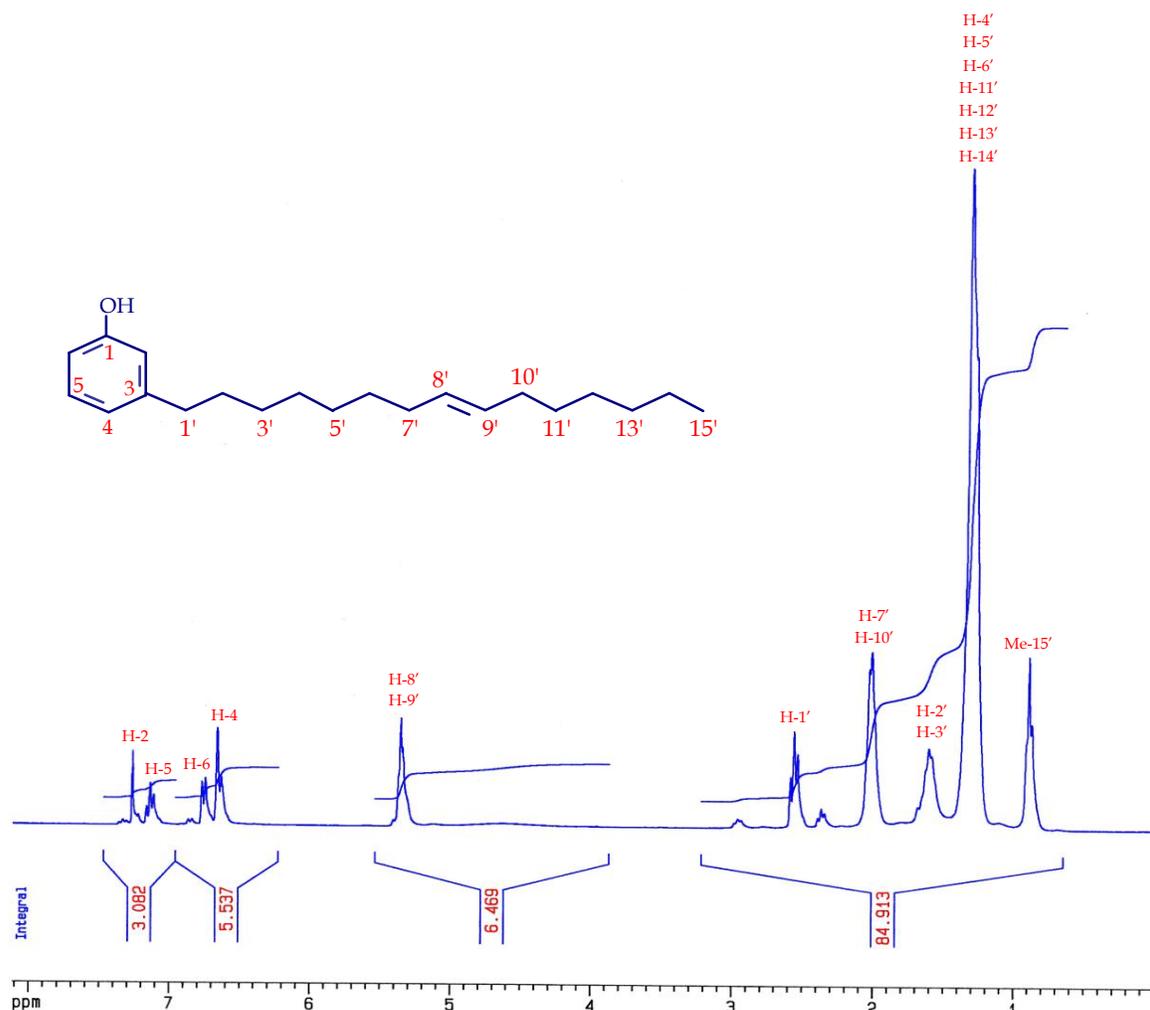


Figura 46. Espectro de RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃) correspondiente a la fracción 5 del LCNM

El espectro de RMN de ¹H (tabla 4) mostró señales correspondientes a un metilo terminal de la cadena alifática a δ_H 0.88 (3H, t, H-15'); señales asignables a nueve protones alifáticos como multiplete, siete de ellos en la región de δ_H 1.29 (H-4', H-5', H-6', H-11', H-12', H-13' y H-14') y dos como multiplete a δ_H 1.55 (H-2' y H-3'). En la misma región de los carbonos sp³ se observan señales para cuatro protones en posición α a los carbonos de doble enlace δ_H 1.99 (H-7' y H-10'); un triplete de metileno unido a carbono sp² aromático a δ_H 2.55 (H-1'). Señales correspondientes a dos protones vinílicos, solapados a δ_H 5.39 (H-8', H-9'), así como señales para cuatro protones de un sistema aromático a δ_H 6.56 (1H, d, H-4), δ_H 6.60 (1H, s, H-2), δ_H 6.75 (1H, d, H-6) y 7.05 (1H, t, H-5).

Tabla 4. Datos de RMN ^1H , del cardanol (CDCl_3 , 300 MHz)

H	RMN ^1H ($\delta = \text{ppm}$)
1	-
2	7.65 d
3	-
4	6.56 d
5	7.05 t
6	6.75 d
1'	2.55 t
2',3'	1.55* m
4', 5', 6', 11', 12', 13', 14'	1.29* m
7', 10'	1.99 m
8', 9'	5.39*
15'	0.88 t

*Señales solapadas

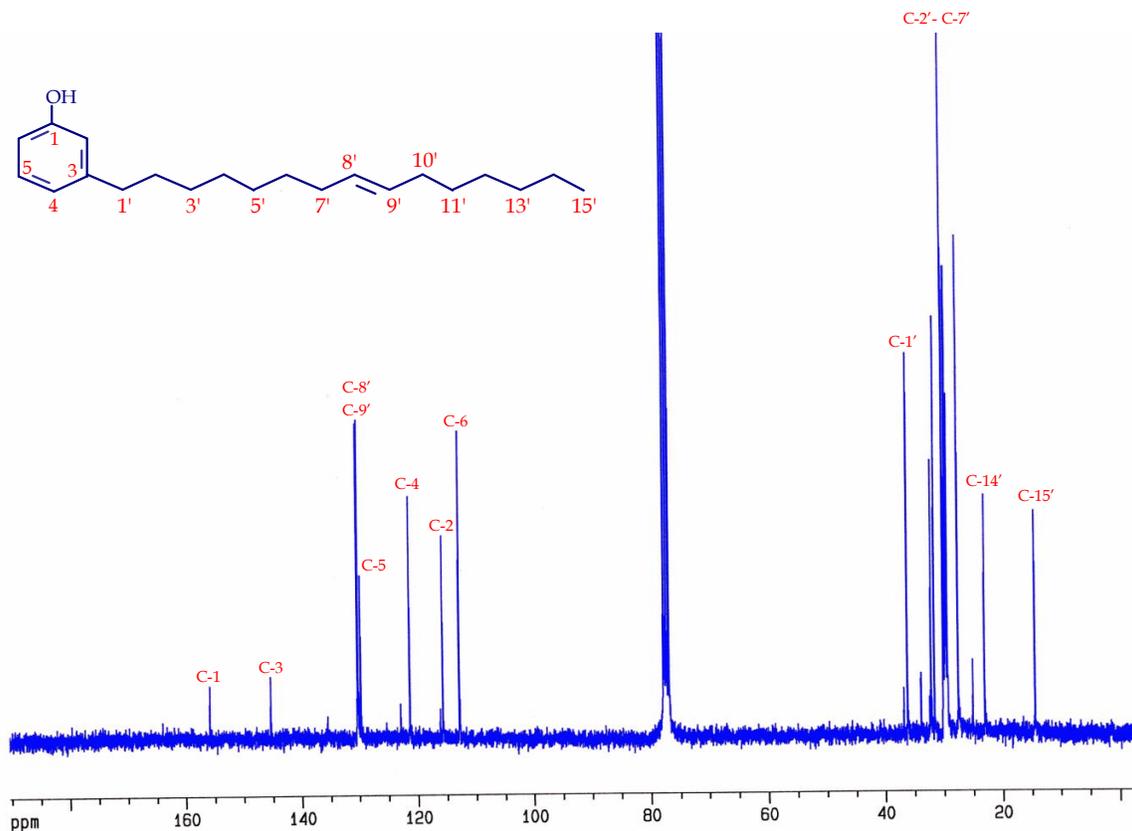


Figura 47. Espectro de RMN- ^{13}C (300 MHz, CDCl_3) correspondiente a la fracción 5 del LCNM

En el espectro de RMN de ^{13}C (tabla 5) mostró señales para 21 carbonos, lo que junto con el experimento DEPT 135, trece carbonos metilénicos alifáticos con hibridación sp^3 en la región δ_{C} 14.0-34.0, de los cuales se observa fácilmente las señales a δ_{C} 14.4 del metilo (C-15'), δ_{C} 23.0 (C-14'), δ_{C} 33.8 (C-1') y en el rango de δ_{C} 25.0-32.1 ppm, el resto de carbonos de la cadena alifática. También destacan las señales de carbonos sp^2 correspondiente a los carbonos de doble enlace a δ_{C} 30.2 y 130.3 asignados a los carbonos C-8' y C-9' respectivamente. Finalmente, señales a δ_{C} 112.8 (C-6), δ_{C} 116.1 (C-2), δ_{C} 121.3 (C-4), δ_{C} 145.3 (C-3) y δ_{C} 155.8 (C-1), característicos de carbonos de anillo aromático fenólico.

Tabla 5. Datos de RMN ^{13}C , del cardanol (CDCl_3 , 300 MHz)

C	RMN ^{13}C ($\delta = \text{ppm}$)
1	155.8 s
2	116.1 d
3	145.3 s
4	121.3 d
5	129.7 d
6	112.8 d
1'-7'	25.0-32.1*
8'	130.2 d
9'	130.3 d
10'-15'	25.0-32.1*

*Señales solapadas

El espectro DEPT 135 (figura 48), proporciona información con respecto a los carbonos CH₃, CH₂ y CH presentes en la estructura, permitiendo confirmar algunas de las asignaciones realizadas.

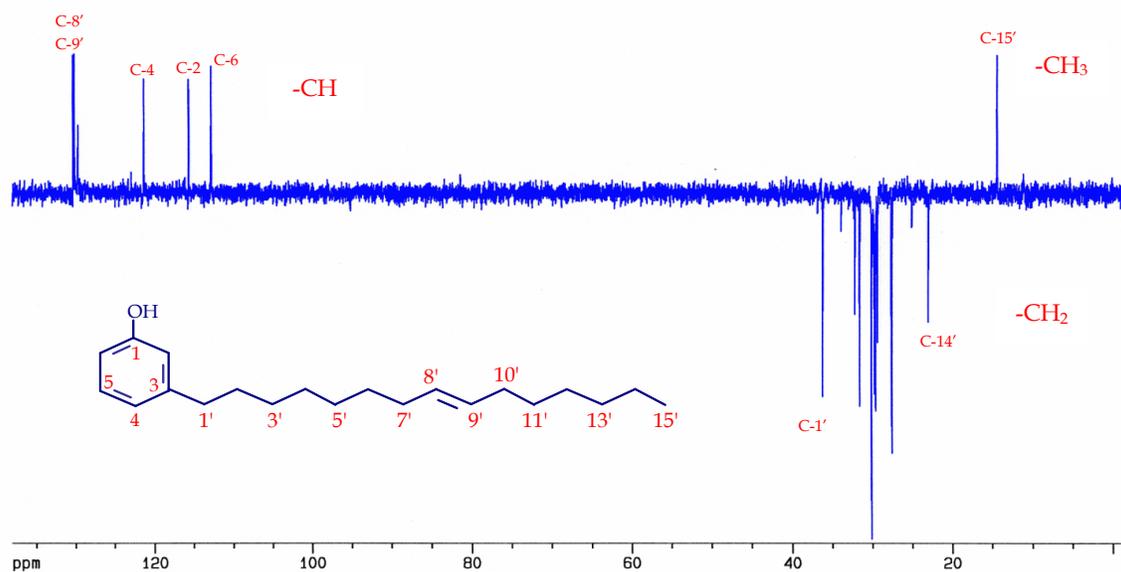


Figura 48. Espectro de RMN DEPT-135 (300 MHz, CDCl₃) correspondiente a la fracción 5 del LCNM.

El experimento bidimensional homonuclear ¹H-¹H (COSY), permite asignar los sistemas de espines nucleares de protones a dos y tres enlaces. Para el compuesto LCNM, se observa correlación entre los protones H-14' y H-15', H-2' y H-3', H-2' y H-4', H-7' y H-6', H-10' y H-11', H-1' y H-2', H-7' y H-8', H-9' y H-10'. También se observan correlaciones entre los protones del sistema spin aromático H-6 y H-4, H-5 y H-4, H-5 y H-6.

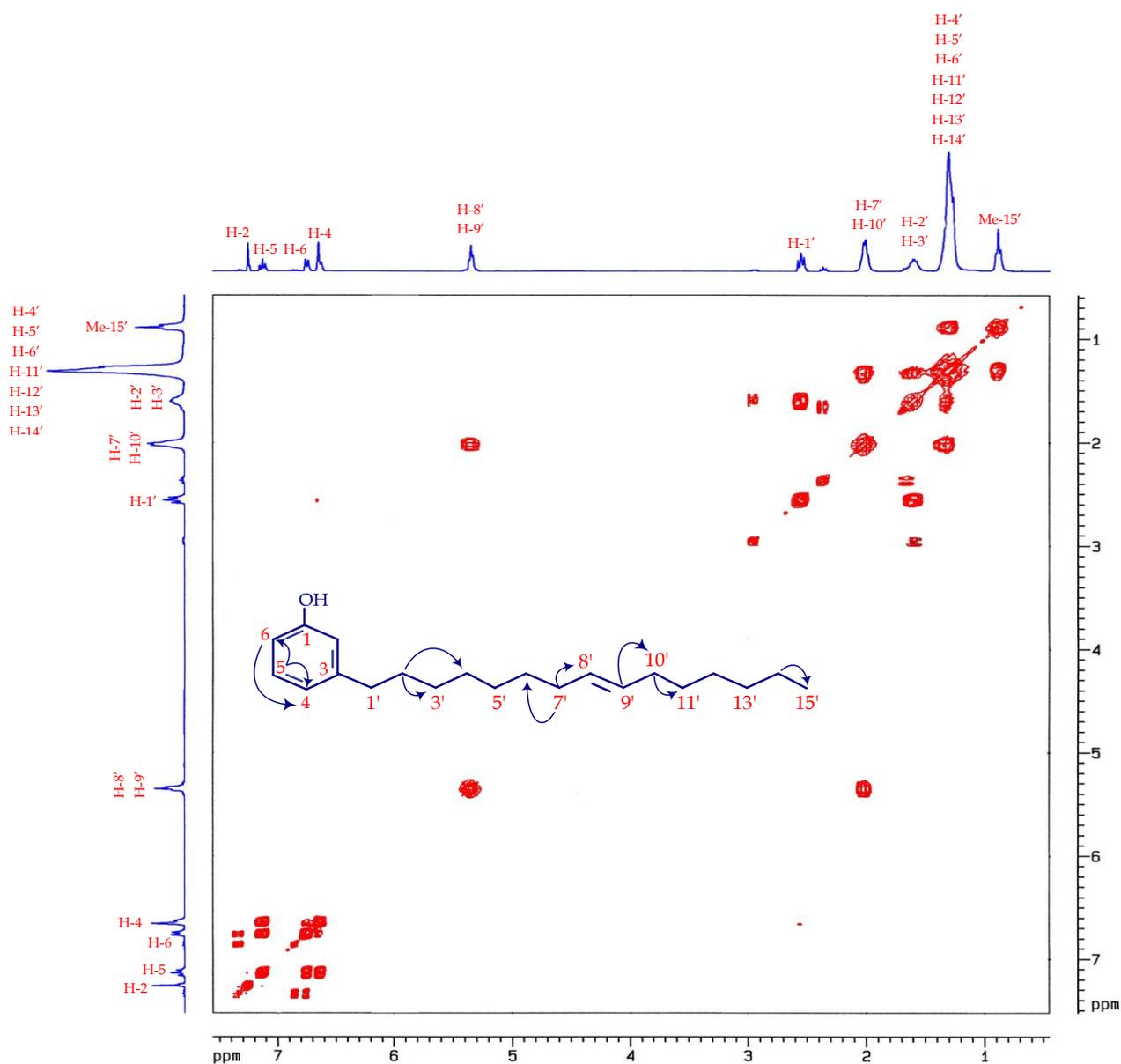


Figura 49. Espectro de COSY (¹H – ¹H) correspondiente a la fracción 5 del LCNM

La localización de los distintos grupos funcionales en la molécula se determinó a partir de las correlaciones a larga distancia observadas en un experimento bidimensional heteronuclear COLOC; que aun siendo una técnica poco sensible, permite situar la posición de los sustituyentes en el anillo aromático y los protones vinílicos en la cadena lateral. Así,

se observan como correlaciones más relevantes en el anillo aromático las de H-4 con C-6. Las otras correlaciones son H-7' y C-8', H-10' y C-9' que corresponde a la posición del doble enlace en la cadena alifática.

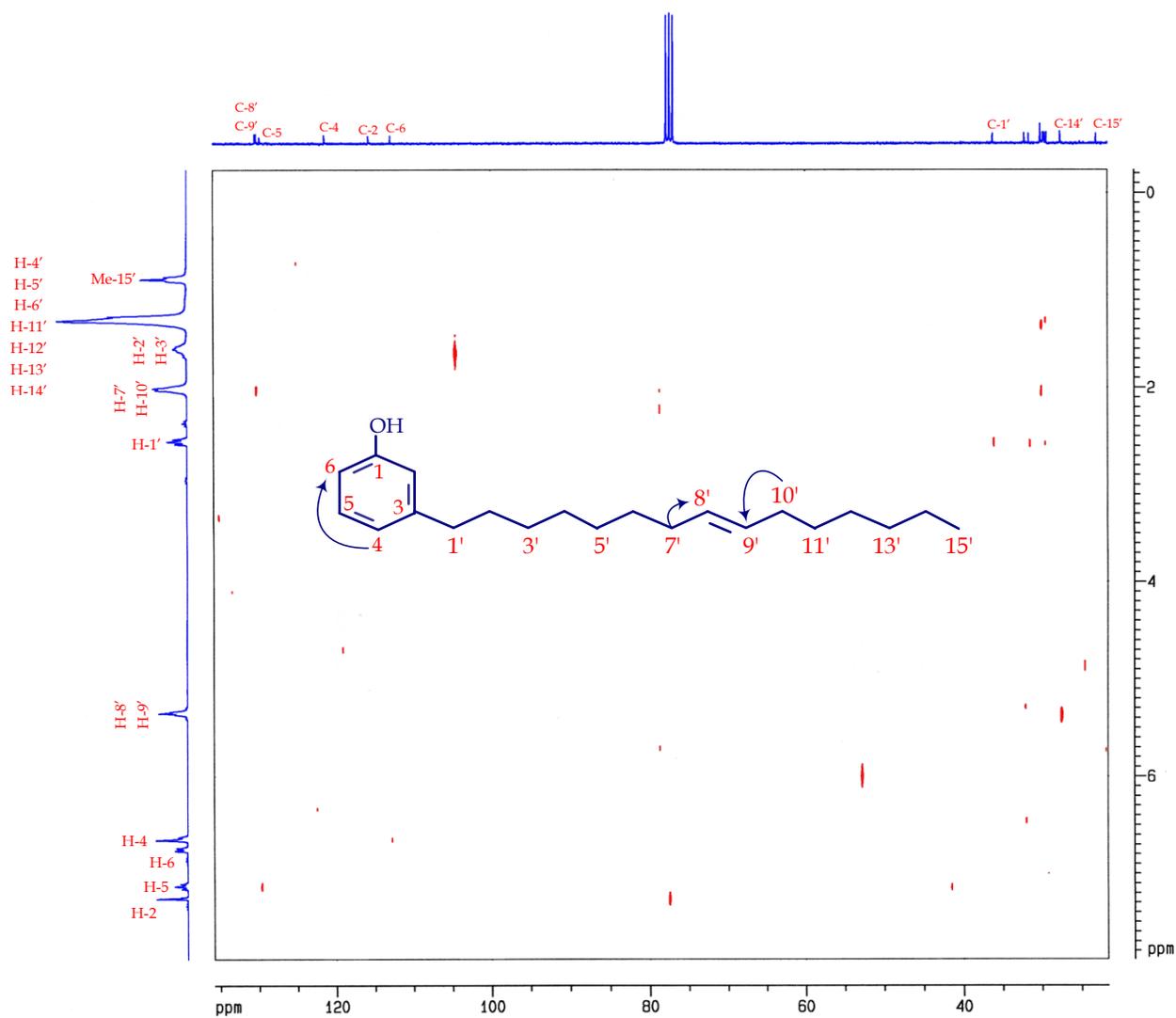


Figura 50. Espectro de RMN-COLOC en CDCl_3 correspondiente a la fracción 5 del LCNM

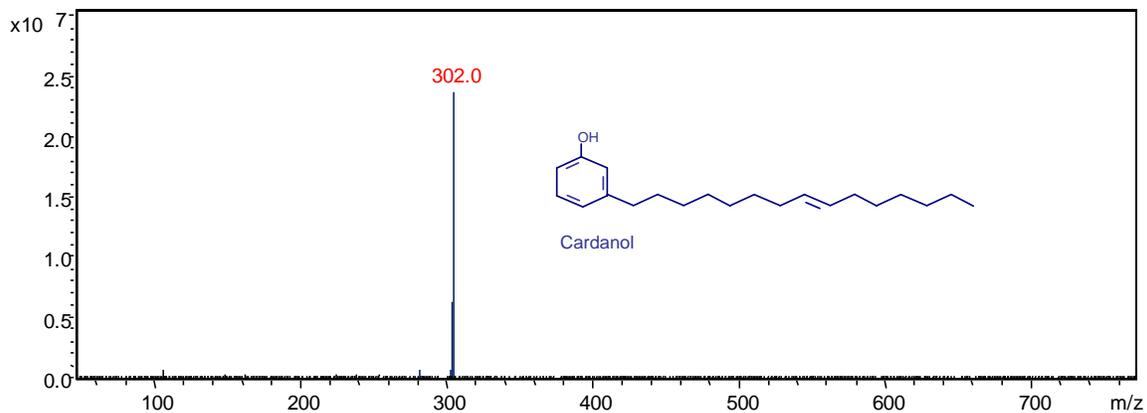


Figura 51. Espectro de masas del cardanol.

En la *figura 51* se observa el cardanol, correspondiente a la fracción 5 el cual presenta una fórmula molecular $C_{21}H_{33}OH$, con un pico de ión molecular a $302.0 m/z$, por lo tanto se puede concluir que esta señal corresponde al cardanol con una insaturación en su cadena R en la posición C₈.



VI. Conclusiones

CASHEW
NUT

Las altas temperatura en el ambiente pueden afectar el proceso de separación mediante HSCCC. En general, la HSCCC es una técnica muy eficaz en la separación cromatográfica en el área de la química de productos naturales, ya que a través de ella se pudieron obtener las fracciones correspondientes para el análisis en RMN.

La HSCCC es una técnica "líquido-líquido" lo que significa que tanto la fase estacionaria y la fase móvil son líquidos. Esto evita muchos de los problemas asociados con otras formas de separación cromatográfica.

El análisis espectroscópico de RMN ^1H , ^{13}C , DEPT 135, COSY $^1\text{H} - ^1\text{H}$ y COLOC permitió comprobar y sugerir la presencia "*ácido 6-[8(Z)11(Z)14-pentadecatrienil]salicílico*", del *ácido 6-[8(Z)-pentadecenil]salicílico* y del "*3-[8 (Z)-pentadecenil] fenol*". obtenidas del líquido de la cáscara de la nuez de marañón.

Los resultados de los análisis de las fracciones 2 y 5 del LCNM son congruentes con estudios realizados por autores citados en la bibliografía consultada, en donde se comprobó la presencia del "*ácido 6-[8(Z)11(Z)14-pentadecatrienil]salicílico*", *ácido 6-[8(Z)pentadecenil]salicílico* y del "*3-[8 (Z)-pentadecenil]fenol*".

No se descarta la posibilidad de que los extractos de la semilla no frita como el pedúnculo posean iguales propiedades y compuestos existentes de la semilla frita del marañón.



VII. Recomendaciones

Realizar estudios para poder determinar el grado de contaminación en ríos y suelos cercanos a las cooperativas que se encargan de la siembra y cultivo del marañón debido a los desechos producidos.

Se recomienda tener en cuenta al momento de realizar una separación en HSCCC, la hora y la temperatura ambiente ya que si no se toma en cuenta podríamos obtener resultados no deseados.

Sería importante continuar con el estudio del líquido de la cáscara de la nuez de marañón proveniente de la semilla no frita a fin de poder ver la factibilidad de obtener nuevos productos secundarios y realizar un estudio comparativo entre ambos extractos.

Continuar el estudio fitoquímico del *Anacardium occidentale*, estudiando la corteza, tallo, hoja, raíz, frutos verdes de la nuez como del pedúnculo o fruto falso.



VIII. Referencias

- [1]. Alain Laurensw Christophe Fourneau, Reynald Hocquemiller, André Cavé, Christian Bories., **1997. Antivectorial Activities of Cashew Nut Shell Extracts from *Anacardium occidentale* L. *Phytotherapy Research*. 11 145-146.**
- [2]. *Anacardium occidentale* L. (1753) -Anacardiácea- **Forestal Sistema Nacional de Información. *Species Plantarum* 1:383, 1753.**
- [3]. B. Bicalho, A. S. Pereira, F. R. Aquino Neto, A.C. Pinto, and C. M. Rezende. **2000. Application of High – Temperature Gas Chromatography-Mass Spectrometry to the Investigation of Glycosidically Bound Components Related to Cashew Apple (*Anacardium occidentale* L. Var. *nanum*) Volatiles. *J. Agric. Food Chem.* 48, 1167-1174.**
- [4]. Bravo José Antonio. **2001., Una revisión de métodos espectrales de resonancia magnética nuclear bidimensional (RMN 2D). *Rev. Bol. Quim.* Volumen 18, No 1.**
- [5]. Cuevas Montilla E., Antezana A., Winterhalter P. **2008. Análisis y Caracterización de Antocianinas en diferentes Variedades de Maíz (*Zea mays*) Boliviano. *Memorias Red-Alfa Lagrotech, Comunidad Europea, Cartagena.***
- [6]. Edy Sousa de Brito et al., **2007. Determination of the flavonoid components of cashew apple (*Anacardium occidentale*) by LC-DAD-ESI/MS. *Food Chemistry.* 105 1112-1118.**
- [7]. Franco Garcia Alexandre. Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Agronomía. Área de Concentração: Genética e Melhoramento de Plantas, que tiene por título “**Análises Filogenéticas no Gênero *Anacardium*”** Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Piracicaba **2009.**

- [8]. Guerra Ouorou Ganni Mariel. Trabajo Final de Entomología Forestal, que tiene por título **“Estudio de las plagas que atacan la especie *Anacardium occidentale* Linnaeus en la República de Benín”** Universidad de Pinar del Río *“Hermanos Saiz Montes de Oca”*, **2010**.
- [9]. Guo Ying-Cen, Giuseppe Mele, Francesca Martina, Eleonora Margapoti, Giuseppe Vasapoll, Wen-Jing Xiao. **2006. An efficient route to biscardanol derivatives and cardanol-based porphyrins via olefin metathesis.** *Journal of Organometallic Chemistry*.
- [10]. Isao Kubo Masamitsu Ochi, Paulo C. Vieira, and Sakae Komatsu., **1993. Antitumor Agents from the Cashew (*Anacardium occidentale*) Apple Juice.** *J. Agric. Food Chem.* 41 1012-1015.
- [11]. J. H. P. Tyman, V. Tychopoulos and P. Chan., **1984. Quantitative Analysis of Natural Cashew Nut Shell Liquid (*Anacardium occidentale*) by High-Performance Liquid Chromatography.** *Journal of Chromatography*, 303, 137-150.
- [12]. Jizhong Yan, Shengqiang Tong, Jianjun Chu, Liuqing Sheng, Gang Chen., **2004. Preparative isolation and purification of syringin and edgeworoside C from *Edgeworthia chrysantha Lindl* by high.speed counter-current chromatography.** *Journal of Chromatography A*, 1043 329-332.
- [13]. Kattimuttathu I. Suresh and Vadi S. Kishanprasad., **2005. Synthesis, Sctructure, and Properties of Novel Polyols from Cardanol and Developed Polyurethanes.** *Ind. Eng. Chem. Res.* 44, 4504-4512.
- [14]. Lúcio P. L. Logrado, Damaris Silveira, Luiz A. S. Romeiro, Manoel O. de Moraes, Bruno C. Calvalcanti, Letícia V. Costa-Lotufo, Cláudia do Ó Pessoa and María

- Lucilia dos Santos., **2005. Synthesis and Biological Evaluation of New Salicylate Macrolactones from Anacardic Acids.** *J. Braz. Chem. Soc.* 16, 1217-1225.
- [15]. L. G. Wade, Jr. **Química Orgánica.**, Quinta edición, PEARSON EDUCACIÓN, S. A., Madrid, **2004**.
- [16]. M. A. F. Rios, S. E. Mazzetto², J. O. B. Carioca, G. B. Arrais., **2005. Síntese de novos aditivos oriundos de fonte renovável para aplicação na indústria de derivados do petróleo, 3º Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás.**
- [17]. M.T.S: Trevisan, B. Pfundstein, R. Haubner, G. Würtele, B. Spiegelhalder, H. Bartsch, R.W. Owen., **2006. Characterization of alkyl phenols in cashew (Anacardium Occidentale) products and assay of their antioxidant capacity.** *Food and Chemical Toxicology*, 44, 188-197.
- [18]. Maria Lucila dos Santos, and Gouvan C. de Magalhães., **1999. Utilisation of Cashew Nut Shell Liquid from *Anacardium occidentale* as Starting Material for Organic Synthesis: A Novel Route to Lasiodiplodin from Cardols.** *J. Braz. Chem. Soc.*, Vol. 10, No. 1, 13-20.
- [19]. Masaki Himejima and Isao Kubo., **1991. Antibacterial Agents from the Cashew *Anacardium occidentale* (Anacardiaceae) Nut Shell Oil.** *J. Agric. Food Chem.* 39, 418-421.
- [20]. Marroquín Ayala Freddy Rolando, tesis de Licenciatura en Ingeniería Agronómica, que tiene por título “**Evaluación del efecto del aceite de la cáscara de la semilla de marañón *Anacardium occidentale* L, para el control de mosca blanca *Bemisia tabaco* Gennadius, en el cultivo de tomate *Lycopersicon esculentum* Mill. El Paso de los Jalapas, El Jícara, El Progreso**”. Universidad de San Carlos de Guatemala, **1996**.

- [21]. Méndez Piñeiro Zulema, memoria Doctoral, que tiene por título “**Desarrollo de nuevos métodos de extracción para el análisis de compuestos de interés enológico**”. Universidad de Cádiz, **2005**.
- [22]. Ming Gu, Fan Ouyang, Zhiguo Su., **2004**. **Comparison of high-speed counter current chromatography and high-performance liquid chromatography on fingerprinting of Chinese traditional medicine**. *Journal of Chromatography A*, 1022 139-144.
- [23]. Nzi André Konan Elfriede Marianne Bacchi, Nilton Lincopan., **2007**. **Acute, subacute toxicity and genotoxic effect of a hydroethanolic**. *ELSEVIER*, 110 30-38.
- [24]. Oghome, P., and Kehinde, A.J., **2004**. **Separation of Cashew Nut Shell Liquid by Column Chromatography**. *African Journal of Science and Technology (AJST)*., Vol. 5, Nº 2, 92-95.
- [25]. Orazio A. Attanasi, Giuseppe Mele, Paolino Filippone, Selma E. Mazzetto, and Giuseppe Vasapollob., **2009**. **Synthesis and characterization of novel cardanol based fulleropyrrolidines**. *ARKIVOC* viii 69-84
- [26]. Patricia Vit., **2003**. **Anacardium occidentale L. Ficha Botánica de interés apícola en Venezuela, Nº 6 Merey**. *Revista De La Facultad De Farmacia* 45(1) 77-79.
- [27]. Portilla del Río José Federico., **2003**. **Determinación de la estructura de proteínas por resonancia magnética nuclear**. Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. Mensaje Bioquímico, Vol. XXVII
- [28]. Renmin Liu, Aifeng Li, Ailing Sun., **2004**. **Preparative isolation and purification of coumarins from *Angelica dahurica* (Fisch. Ex Hoffm) Benth, et Hook**.

- (Chinese traditional medicinal herb) by high-speed counter-current chromatography.** *Journal of Chromatography A*, 1052 223-227.
- [29]. Risfaheri, Tun Tedja Irawady, M. Anwar Nur, and Illah Sailah., **2009. Isolation of Cardanol from Cashew Nut Shell Liquid using the Vacuum Distillation Method.** *Indonesian Journal of Agriculture* 2(1), 11-20.
- [30]. Tarcísio da Silcia Vieira., **2007.**, Tesis de Maestría en Química, que tiene por título **“Estudos visando à síntese de novos derivados do LCC com potencial atividade no tratamento da doença de Alzheimer”**
- [31]. Silva M. S. S., G. De Lima, E. H. Oliveira, J. A. D. Lopes, M. H. Chaves, F. A. M. Reis, A. M. G. L. Citó., **2008.**, **Anacardic acid derivatives from brazilian propolis and their antibacterial activity.** *Eclética Química*. Volumen 33, número 3.
- [32]. Vogl, Otto and Mitchell, John D. **1996. Oriental Lacquer, 11. Botany and Chemistry of the Active components of Poisonous Anacardiaceae.** *Journal of Macromolecular Science, Part A*, 33:10, 1581 – 1599
- [33]. Yoichiro Ito., **2005. Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography.** *Journal of Chromatography A*, 1065, 145-168.
- [34]. Wellington Alves Gonzaga., Tesis de Maestría en Ciências da Saúde na Área de Química de Productos Naturales que tiene por título **“Preparação e Avaliação Farmacológica de Derivados dos Lipídios Fenólicos do Líquido da Casca da Castanha de Caju”** Universidade de Brasília,. Faculdade de Ciências da Saúde. **2008.**

Páginas Web

- [35]. Fuente: <http://amazonas.rds.org.co/libros/44/base.htm> Año de consulta: **2010**.
- [36]. Fuente: Dr. Giuseppe Mazza. Journalist ~ Scientific photographer *Anacardium occidentale* Familia *Anacardiaceae*, <http://www.photomazza.com/?Anacardium-occidentale&lang=es>. Año de consulta: **2010**.
- [37]. TECO FINANCE EXPORT – 24 rue Violet – 75015 PARIS-FRANCE.
<http://www.sheabutter.com/SpainCashew/index.htm> Año de consulta: **2010**.



IX. Anexos

Espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) obtenidos del LCNM

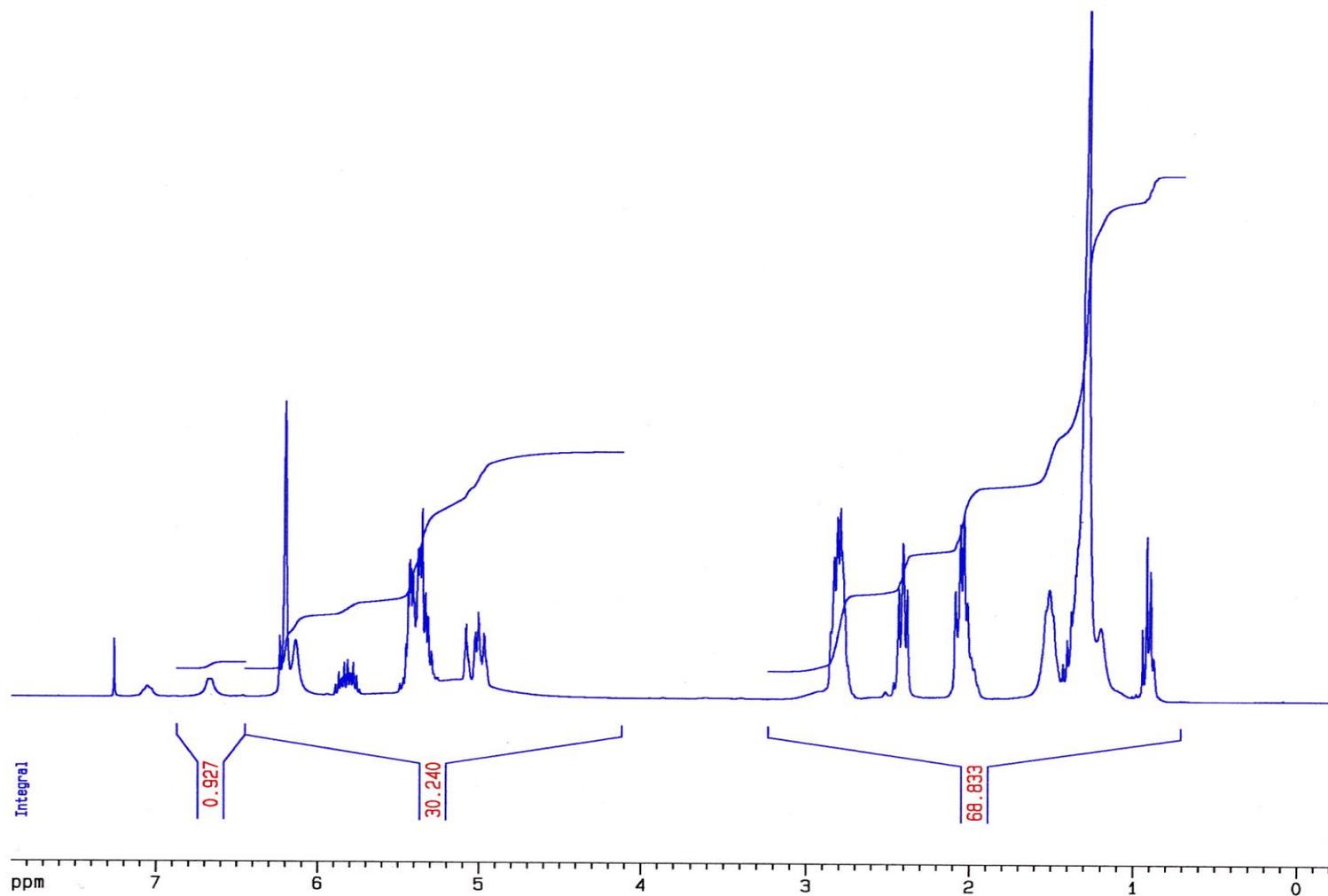


Figura 52. Espectro de RMN- ^1H (300 MHz, CDCl_3) correspondiente a la fracción 1 del LCNM frito

Espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) obtenidos del LCNM

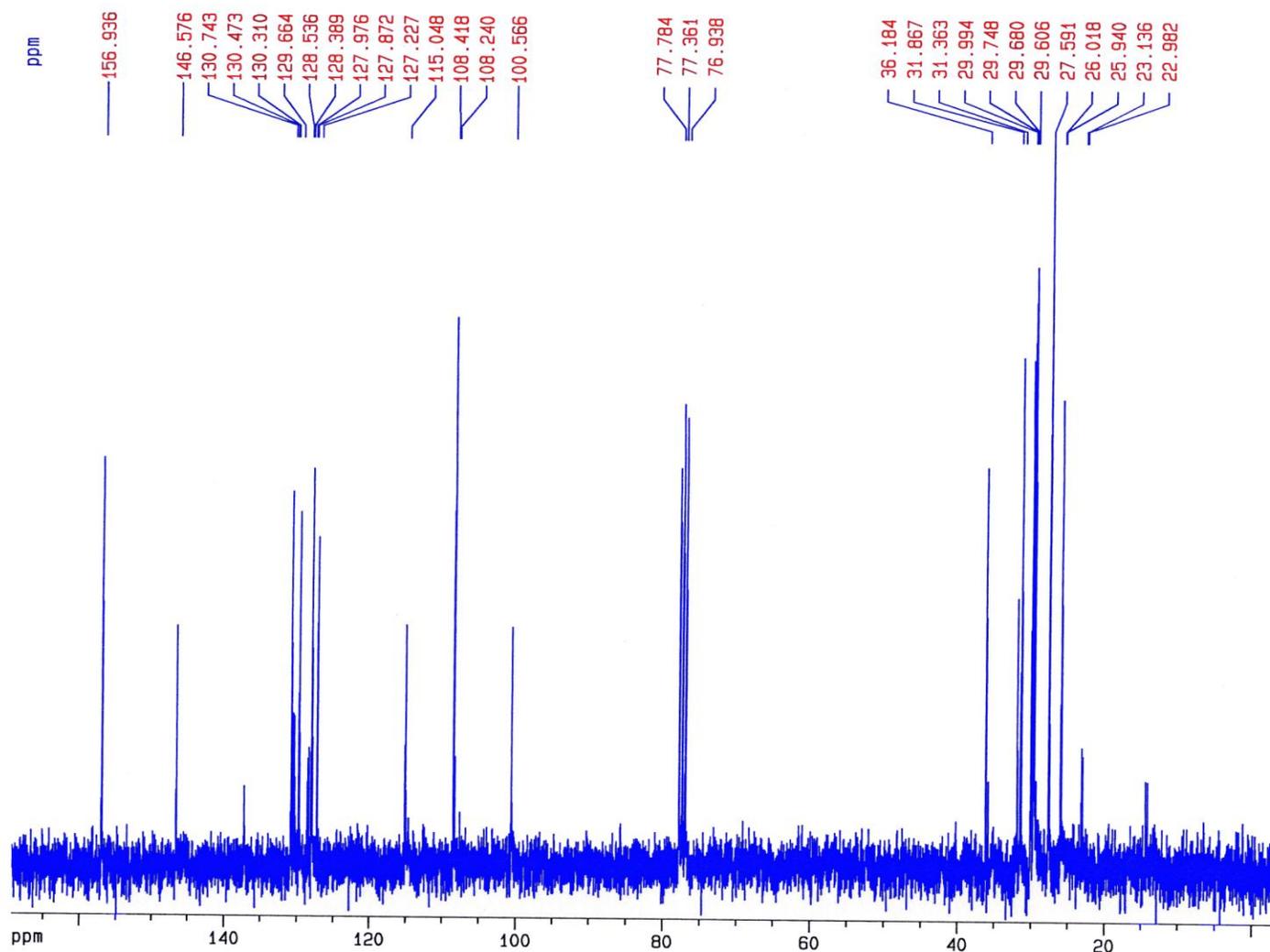


Figura 53. Espectro de RMN- ^{13}C (300 MHz, CDCl_3) correspondiente a la fracción 1 del LCNM frito.

Espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) obtenidos del LCNM

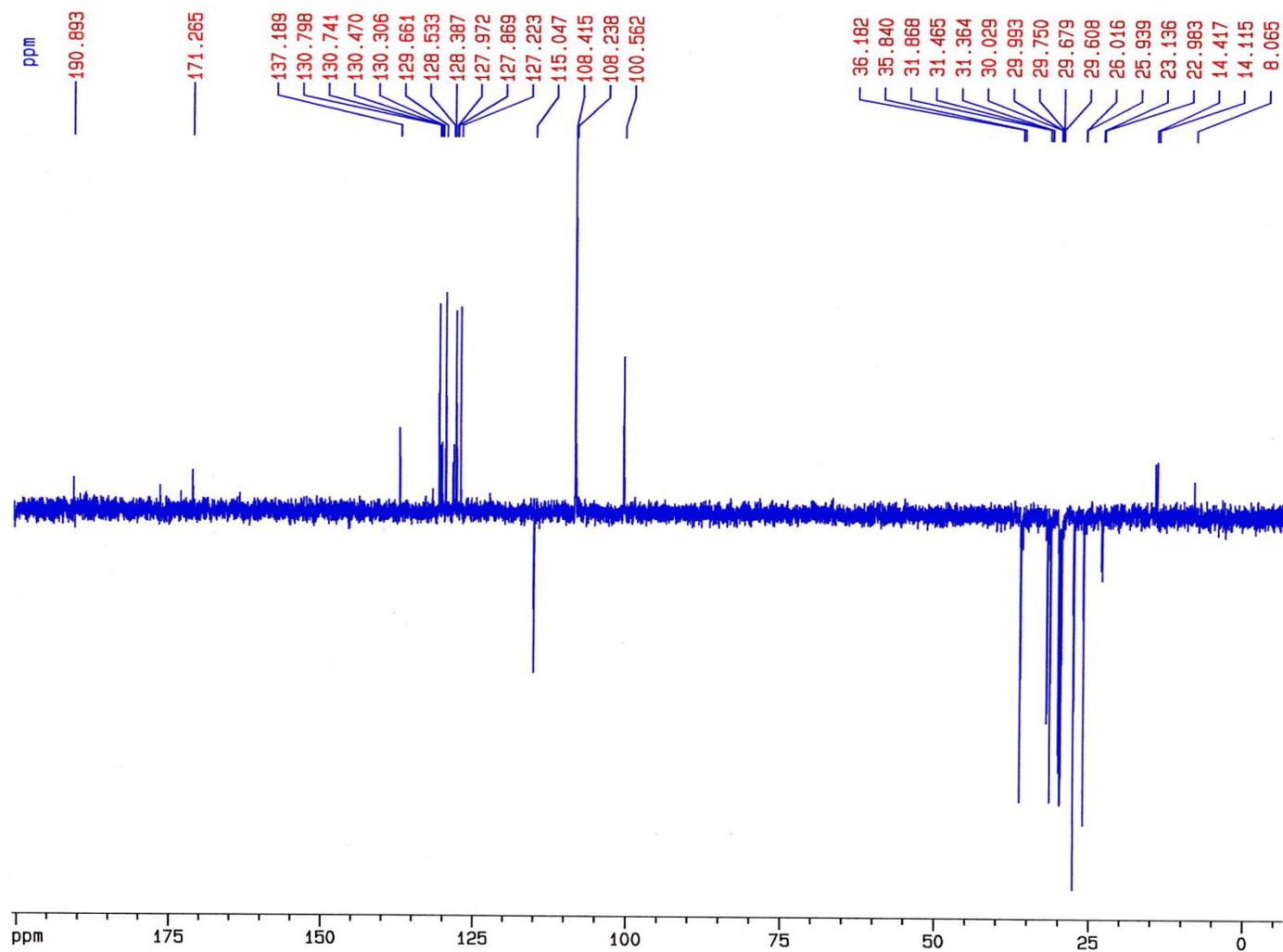


Figura 54. Espectro RMN DEPT-135 (300 MHz, CDCl_3) correspondiente a la fracción 1 del LCNM frito.

Espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) obtenidos del LCNM

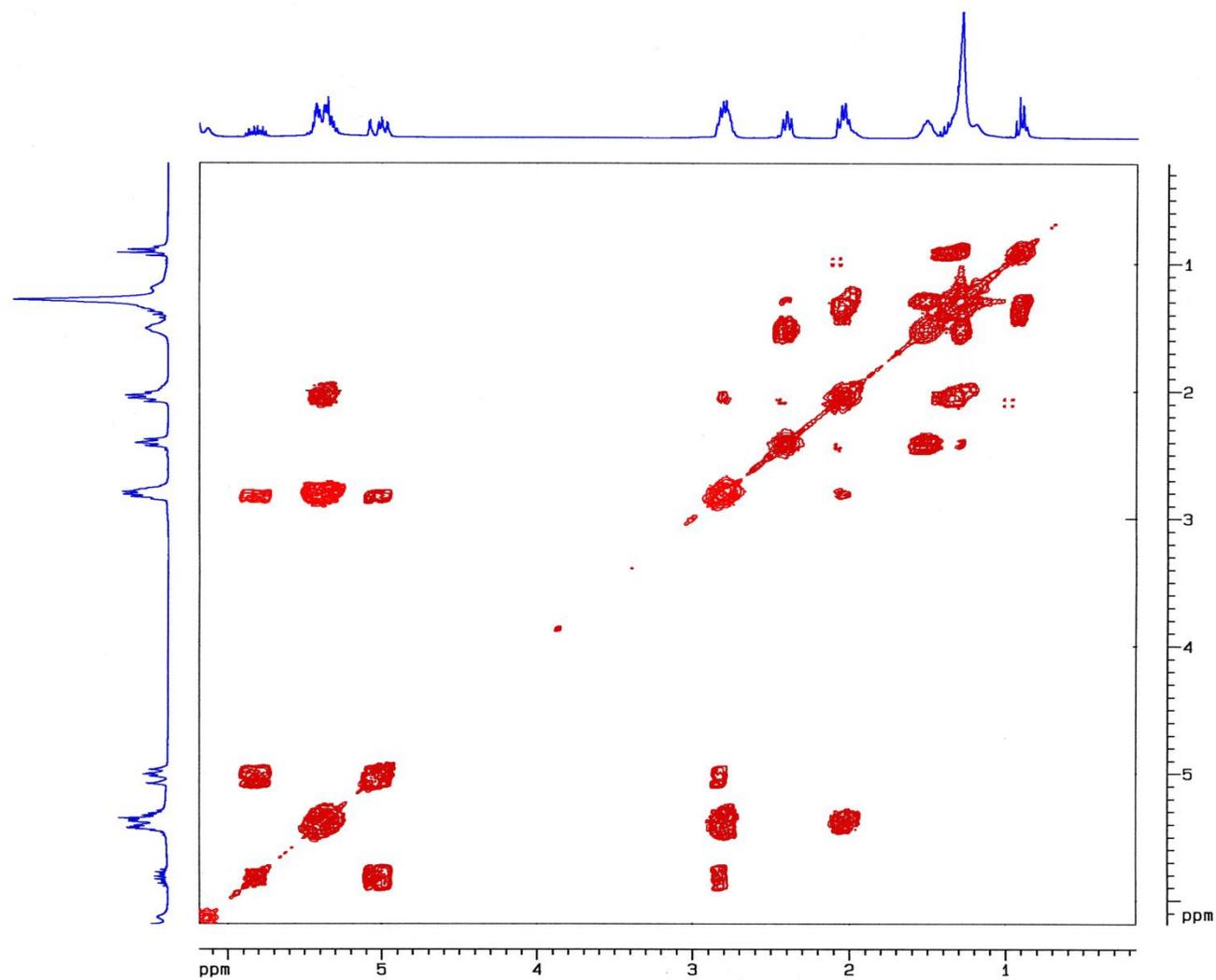
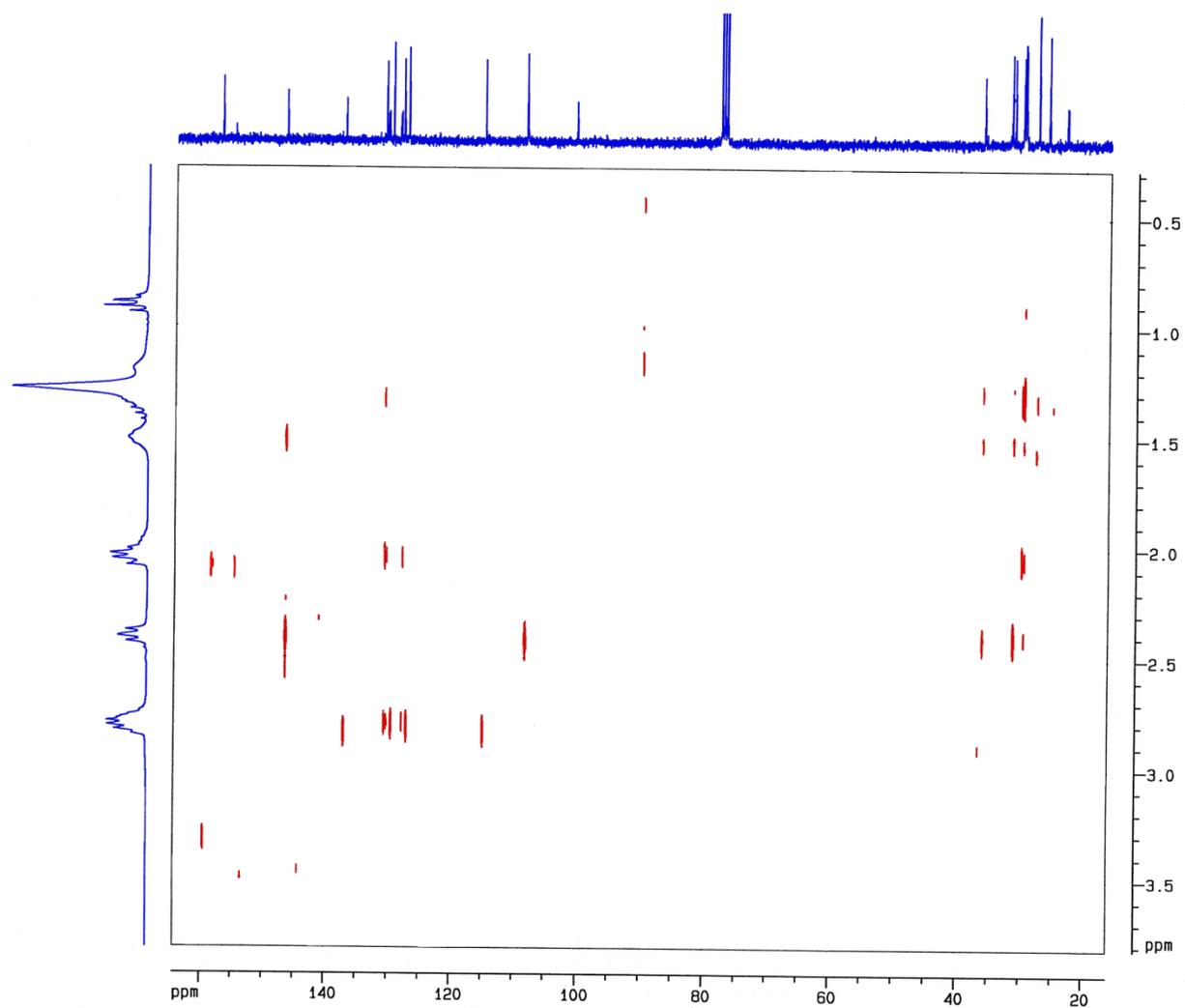


Figura 55. Espectro de COSY (¹H – ¹H) correspondiente a la fracción 1 del LCNM

Espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) obtenidos del LCNM

**Figura 56.** Espectro de RMN-COLOC en CDCl_3 correspondiente a la fracción 1 del LCNM

Espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) obtenidos del LCNM

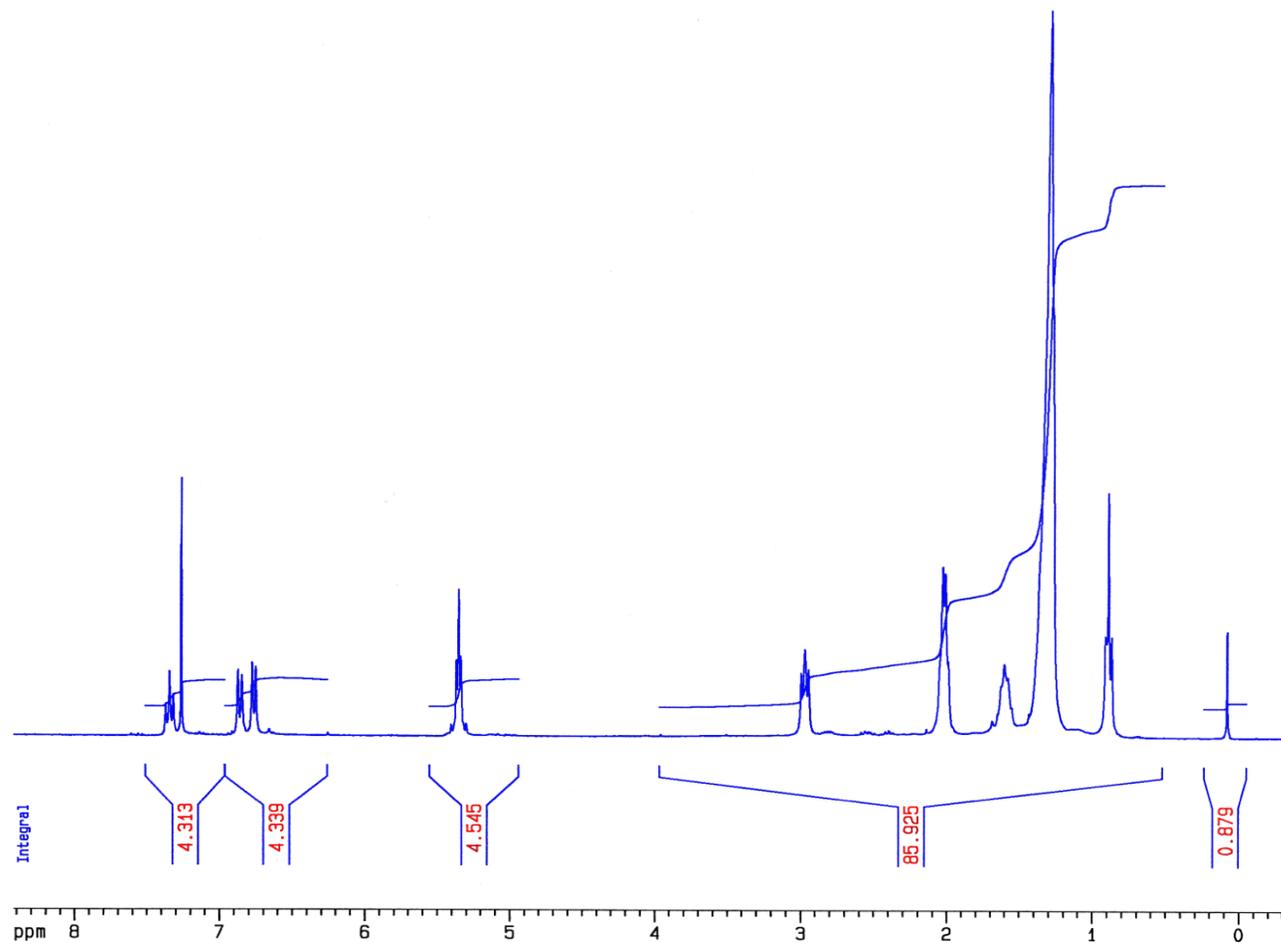


Figura 57. Espectro de RMN- ^1H (300 MHz, CDCl_3) correspondiente a la fracción 6 del LCNM frito.

Espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) obtenidos del LCNM

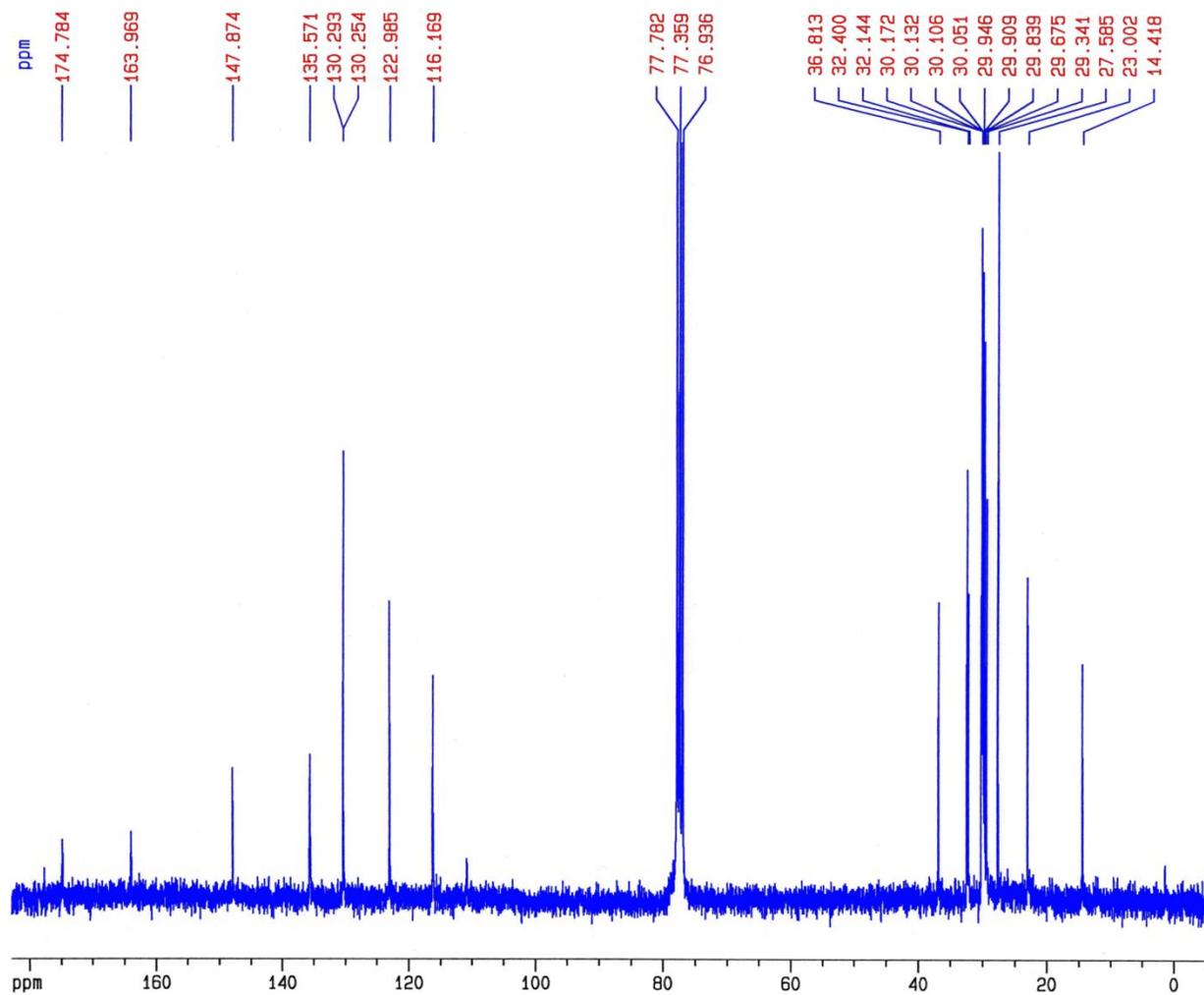


Figura 58. Espectro de RMN- ^{13}C (300 MHz, CDCl_3) correspondiente a la fracción 6 del LCNM frito.

Espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) obtenidos del LCNM

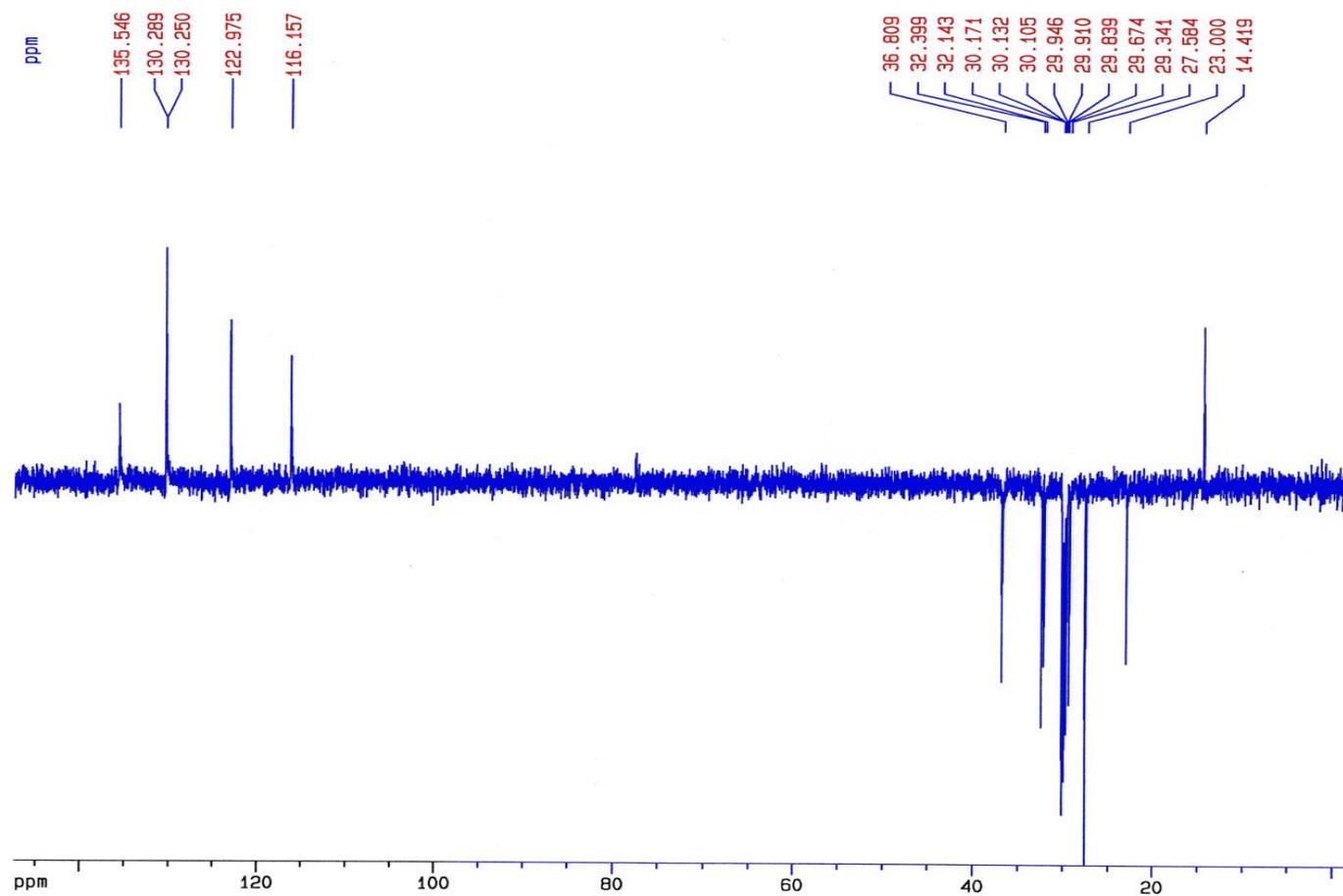


Figura 59. Espectro RMN DEPT135 (300 MHz, CDCl₃) correspondiente a la fracción 6 del LCNM frito.

Espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) obtenidos del LCNM

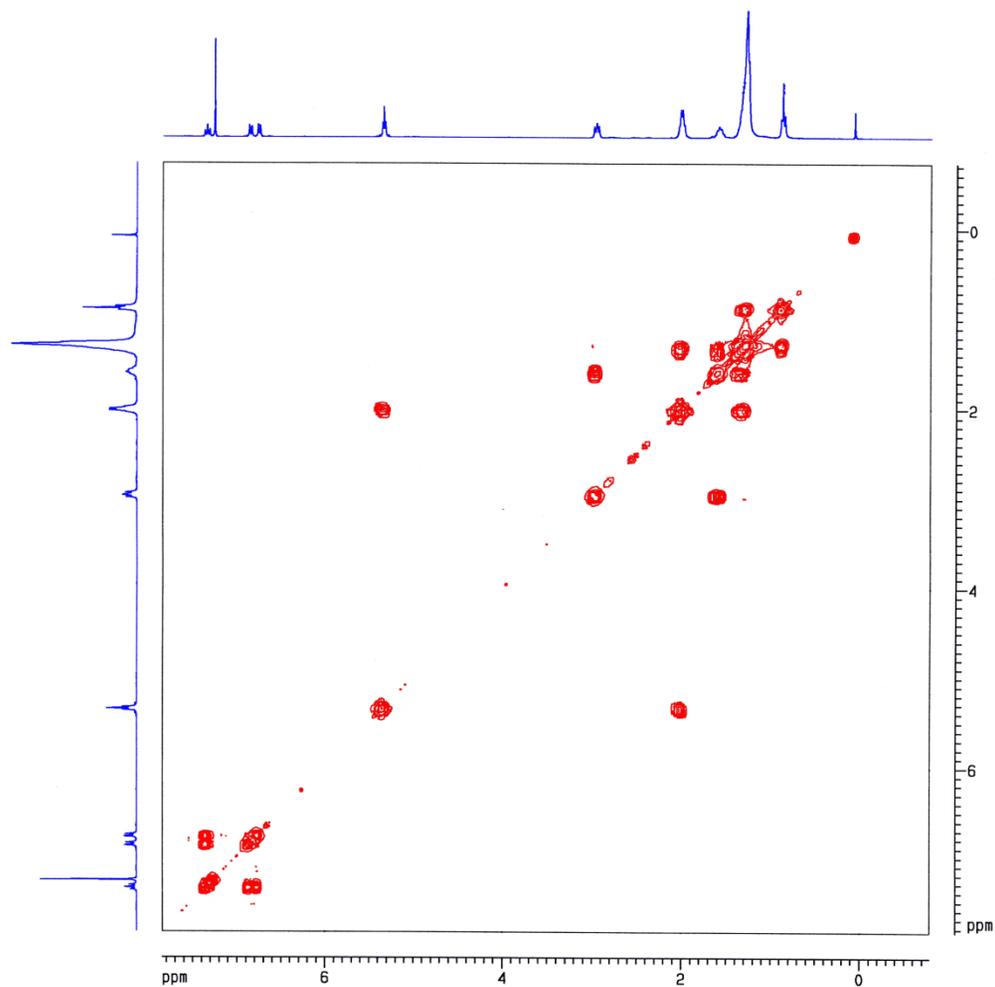


Figura 60. Espectro de COSY (¹H – ¹H) correspondiente a la fracción 6 del LCNM