

EFFECTO DE LA TEMPERATURA DE INDUSTRIALIZACIÓN DE LA NUEZ DE MARAÑÓN EN LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA EN *Streptococcus mutans* DEL LÍQUIDO DE LA CÁSCARA (LCNM)

EFFECT OF THE INDUSTRIALIZATION TEMPERATURE OF THE CASHEW NUT ON THE BACTERIAL ACTIVITY AGAINST *Streptococcus mutans* OF THE CASHEW NUT SHELL LIQUID (CNSL)

Sandra Gaitán*, Yolanda Rico*, Rosalba Medina**, Rosabel Segura*

Recibido: 7/10/03 - Aceptado: 19/12/03

RESUMEN

Se evaluó el efecto del calentamiento del líquido de la cáscara de la nuez del marañón (LCNM) sobre su composición química y actividad antibacteriana en *S. mutans*, principal microorganismo responsable de la caries dental.

Se simularon los tratamientos más comunes de industrialización de la almendra, se determinó la actividad antibacteriana de las muestras y se caracterizaron los componentes con mayor actividad.

El tratamiento a 92 °C no afecta la actividad antibacteriana, a 150 °C no afecta la actividad bacteriostática pero disminuye la bactericida, y a 200 °C disminuye ambas. Por lo anterior recomendamos que el beneficio de la almendra se realice a una temperatura que no supere la de ebullición del agua.

Se confirmó que la actividad depende de la naturaleza del núcleo aromático y del grado de insaturaciones en la cadena alifática.

Palabras clave: líquido de la cáscara de marañón, *Streptococcus mutans*, *Anacardium occidentale*, actividad antibacteriana, CLAE.

ABSTRACT

In this work we studied the effect of heating Cashew nut shell liquid (CNSL) on its chemical composition and antibacterial activity against *S. mutans*, main bacteria responsible for tooth decay.

It was simulated the most common industrial treatments for the extraction of cashew almond, the antimicrobial activity of samples was assessed and the compounds with major activity were identified.

* Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia - Sede Bogotá.

** Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Colombia - Sede Bogotá.
Correo electrónico: rsegura@unal.edu.co

The results showed that heating at 92 °C did not affect the antibacterial activity against *S. mutans*, heating at 150 °C did not affect the bacteriostatic capacity but diminished the bactericide capacity and heating at 200 °C diminished both. For these facts we recommend to extract cashew almond at temperature no higher than boiling water.

Characterization of the main-major active compounds allowed us to confirm that antibacterial activity was mainly dependent of the aromatic structure and also of unsaturation on the side chain.

Key words: Cashew nut shell liquid, *Streptococcus mutans*, *Anacardium occidentale*, antibacterial activity, HPLC.

INTRODUCCIÓN

La caries dental es una de las infecciones bacterianas más comunes en los humanos y quizás una de las más costosas que deben atenderse durante la vida (1). Existen evidencias de que el estado nutricional, el consumo de azúcar y la presencia de microflora cariogénica son algunos de los factores que contribuyen en gran medida a la aparición de esta enfermedad. Muchos estudios han concluido que el *Streptococcus mutans* es el principal microorganismo causante de la caries dental cuando coloniza las fisuras y áreas dentales profundas. Sin embargo, si esta colonización se retarda, es posible que la caries dental no aparezca, o por lo menos que su ocurrencia se reduzca sustancialmente. Este hecho sugiere que el uso de tratamientos que interfieran con la colonización del *S. mutans* pueden tener un efecto importante en la disminución de la incidencia de la caries dental en la población humana (1, 2).

Se ha reportado que el líquido de la cáscara de la nuez del marañón (LCNM), rico en compuestos fenólicos derivados del ácido salicílico y el resorcinol, denominados ácidos anacárdicos, cardoles y 2-metilcardoles (3), posee actividad antibacteriana contra *Streptococcus mutans* (4 - 8). Sin embargo, la actividad antibacteriana se ha estudiado en el LCNM natural, es decir, sin que éste haya sido expuesto a las altas temperaturas a las cuales se somete industrialmente, cuando se retira la cáscara para el beneficio de la almendra.

El objetivo de este trabajo consistió en evaluar los cambios físicos, químicos y la actividad antibacteriana en *S. mutans* del LCNM, cuando se calienta a las temperaturas de industrialización de la almendra. Los tratamientos térmicos evaluados incluyeron calentamiento a 200 °C por 2 minutos para simular el método del aceite caliente, el más común a nivel industrial (9), y a 92 °C por 10 minutos para simular un método de extracción de la almendra alternativo en el cual las nueces se sumergen en agua a ebullición (10).

Adicionalmente, con base en los resultados obtenidos en los ensayos preliminares, se evaluó el efecto del calentamiento del LCNM a 150 °C durante 5 minutos, temperatura en la cual se observó que el proceso de descarboxilación, producido por efecto del calentamiento, se termina.

Los componentes más activos del LCNM se fraccionaron y purificaron por técnicas cromatográficas y la caracterización se llevó a cabo por resonancia magnética nuclear.

PARTE EXPERIMENTAL

Extracción

La nuez de marañón, *Anacardium occidentale*, variedad criollo llanero, fue proporcionada por la Corporación Colombiana de Investigaciones Agropecuarias (Corpoica). La nuez se sometió a un proceso de congelación para facilitar la separación de la almendra por fracturación y las cáscaras se mantuvieron refrigeradas hasta el momento de la extracción (10).

El LCNM natural se obtuvo por extracción a temperatura ambiente durante 30 horas con agitación ocasional. Se partió de 100 gramos de cáscaras y se emplearon 500 mL de éter de petróleo (40-60 °C). El solvente fue eliminado usando un evaporador rotatorio a 30 °C. La muestra se conservó a 4 °C protegida de la luz (7).

Tratamientos térmicos

Los tratamientos térmicos se realizaron en balones de fondo redondo con desprendimiento lateral a los cuales se conectaron dos trampas con solución acuosa de hidróxido de bario para detectar la descarboxilación, cuando ésta ocurriera. La temperatura se controló con un reóstato y se mantuvo agitación permanente.

Los tratamientos térmicos evaluados fueron 92 °C por 10 minutos, 150 °C por 5 minutos y 200 °C por 2 minutos (9-11). Todos los tratamientos se realizaron por triplicado

Propiedades fisicoquímicas

Al LCNM natural y a las muestras tratadas térmicamente se les determinaron algunas propiedades fisicoquímicas como índice

de refracción, densidad, pH, reacción con bicarbonato de sodio, perfiles cromatográficos por cromatografía en capa delgada (CCD), variaciones cualitativas en viscosidad y aroma; espectro infrarrojo, con las muestras en forma de película sobre celdas de cloruro de sodio, en un equipo Parangón 500 serie 1000 IRTF (Perkin Elmer®); espectro ultravioleta, en soluciones diluidas en éter de petróleo, en un equipo Beckman DU 640 Spectrophotometer; y perfil por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE), con las condiciones experimentales indicadas más adelante, en un equipo Perkin Elmer® LC410-7.

Actividad antibacteriana

Para los ensayos microbiológicos se utilizó una cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175. El medio de cultivo utilizado fue caldo Infusión Cerebro Corazón, y la incubación del microorganismos se llevó a cabo en condiciones de microaerofilia a 37 °C durante 48 horas. Las muestras se disolvieron previamente en DMF y posteriormente en el medio de cultivo (5, 12).

La concentración mínima inhibitoria (CMI) se determinó por el método de diluciones seriadas (6), colocando 1,5 mL de cada dilución y 1,5 mL de inóculo (10^6 UFC/mL). La CMI fue definida como la concentración más baja a la cual no hubo crecimiento visible del microorganismo después de las 48 horas de incubación (13).

La concentración mínima bactericida (CMB), definida como la menor concentración de analito capaz de eliminar el 99,9% del inóculo inicial, se determinó inoculando en agar BHI una muestra de cada dilución que hubiese inhibido el crecimiento del microorganismo. La CMB

correspondió a la concentración más baja a la cual no hubo crecimiento del microorganismo, después de incubar a 37 °C por 48 horas (13). Todos los ensayos de CMI y CMB se realizaron por triplicado.

Bioautografías

Para verificar las fracciones o grupos de compuestos responsables de la mayor actividad antibacteriana –y que sufren alguna modificación química por efecto del tratamiento térmico– se realizó la bioautografía del LCNM natural desarrollando CCD en cromatoplasas Merck® con fase móvil éter de petróleo: acetato de etilo 8:2 con doble recorrido. Cada placa se colocó en una caja de petri estéril y sobre ella se aplicó una fina película de agar BHI previamente inoculado. Se dejó gelificar el medio y se observó el crecimiento de las bacterias después de incubar en ambiente de microaerofilia a 37 °C por 48 horas (14).

Fraccionamiento y purificación de los componentes con mayor actividad antibacteriana

Con base en los resultados obtenidos en los ensayos de CMI, CMB y las bioautografías se realizó la separación de las fracciones que registraron mayor actividad antibacteriana en *S. mutans*. Para ello se realizó CCD preparativa, usando como fase estacionaria cromatoplasas de sílica gel 60GF₂₅₄ (Merck®) y fase móvil éter de petróleo: acetato de etilo 70:30. Las dos bandas correspondientes a las fracciones con mayor actividad antibacteriana se extrajeron y se llevaron a sequedad.

La separación y purificación de los componentes en cada una de las fracciones

obtenidas se realizó en un cromatógrafo líquido de alta eficiencia (CLAE) Perkin Elmer® LC410-7, equipado con un detector UV/VIS LC295 a 280 nm (3,16). La columna empleada fue una ODS de 25 cm x 4 mm d.i. (Lichrosorb®), y la fase móvil fue metanol: ácido acético acuoso al 10% en proporción 90:10 v/v, a un flujo de 1 mL/min (16). Los solventes usados fueron calidad CLAE.

Caracterización de los componentes con mayor actividad antibacteriana

La caracterización de los componentes separados por CLAE y que presentaron la mayor actividad antibacteriana se realizó por RMN-¹H y RMN-¹³C (17) en un equipo Bruker de 500 MHz, usando como solvente cloroformo deuterado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Extracción

A partir de 100 gr de cáscaras se obtuvieron 38,2 gr de un líquido viscoso, de color oscuro y olor característico correspondiente al LCNM natural.

El LCNM extraído del *Anacardium occidentale*, variedad criollo llanero, constituye un 38,2% en peso de las cáscaras de la nuez, valor que se encuentra por encima del reportado para especies de la India y Brasil, principales productores de marañón con un 18 a 32% (9), lo que podría convertirse en una ventaja para el aprovechamiento industrial de éste producto.

Tratamientos térmicos

El LCNM no mostró cambios físicos apreciables cuando se calentó hasta 90°C;

sin embargo, por encima de esta temperatura empezó a producirse descarboxilación de los ácidos apreciable por la formación de BaCO_3 en las trampas conectadas al recipiente de calentamiento. A partir de $125\text{ }^\circ\text{C}$ y hasta los $150\text{ }^\circ\text{C}$ la descarboxilación fue rápida y al llegar a $200\text{ }^\circ\text{C}$ prácticamente ya había finalizado. Con el calentamiento del LCNM natural a temperaturas superiores a $100\text{ }^\circ\text{C}$ se produjo un oscurecimiento gradual del color, y el aroma cambió haciéndose más picante.

Propiedades fisicoquímicas

Los resultados presentados en la Tabla 1 muestran que el calentamiento del LCNM hasta $150\text{ }^\circ\text{C}$ produce un incremento en el pH, desde 3,2 hasta 5,0 que puede explicarse por descarboxilación parcial de los ácidos anacárdicos apreciable por la formación de BaCO_3 en las trampas conectadas al recipiente de calentamiento. El incremento del pH por encima de 7,0, cuando el LCNM se calienta a temperaturas mayores de $150\text{ }^\circ\text{C}$, sólo puede explicarse porque

además de la descarboxilación suceden otro tipo de reacciones, por ejemplo de polimerización, que afectan también los grupos fenólicos de las moléculas.

La reacción con bicarbonato de sodio indica que las muestras del LCNM natural y el calentado a $92\text{ }^\circ\text{C}$ tienen comportamiento ácido debido a la presencia de los ácidos anacárdicos. Sin embargo, para las muestras restantes la prueba fue negativa, confirmando la descarboxilación completa por efecto de los tratamientos térmicos aplicados.

Los incrementos en la densidad, viscosidad e índice de refracción pueden ser debidos a las reacciones de polimerización que generalmente ocurren en los compuestos fenólicos. (15).

En los espectros UV (Tabla 2) del LCNM natural y las muestras calentadas se observa que éstos poseen bandas de absorción características de compuestos aromáticos. Además se observa que al incrementarse la temperatura de calentamiento la banda en $318\text{-}320\text{ nm}$ desaparece gradualmente, lo que podría estar relacio-

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas del LCNM natural y de las muestras sometidas a tratamiento térmico.

Muestra	Índice de refracción	Densidad (g/mL)	pH	Reacción con NaHCO_3
LCNM natural	1,5030	0,9064	3,20	+++
LCNM _{92C} ¹	1,5031	0,9372	4,40	+++
LCNM _{150C} ¹	1,5192	0,9781	4,98	+
LCNM _{200C} ¹	1,5199	0,9575	8,76	-

¹ calentado a la temperatura indicada

+ Reacción débil

+++ Reacción fuerte

Tabla 2. Bandas de absorción al UV del LCNM natural y las muestras tratadas térmicamente.

Muestra	λ (nm)		
LCNM natural	268	280	318 (fuerte)
LCNM 92C	268	281	318 (fuerte)
LCNM 150C	272	279	319
LCNM 200C	269	279	-

nado con el deterioro de los dobles enlaces de la cadena alifática sustituyente.

En los espectros IR se observó que las muestras de LCNM natural y calentada a 92 °C poseen bandas características de ácido (3200 y 1645 cm^{-1}) las cuales desaparecen por efecto de la descarboxilación cuando la muestra se somete a temperaturas elevadas.

La CCD (Tabla 3) mostró un perfil cromatográfico similar para el LCNM natural y la muestra calentada a 92 °C por 10 minutos. Para las muestras calentadas a temperaturas superiores se observó la desaparición de la banda F₃ (Rf 0,53) correspondiente a los ácidos anacárdicos, un aumento en la concentración de Cardanol por la descarboxilación de los ácidos y la aparición de la

banda F₅ (Rf 0,08) correspondiente a productos de deterioro por efecto del calentamiento. Estos cambios en composición también se evidenciaron en los perfiles cromatográficos obtenidos por CLAE (Gráfica 1), donde la muestra calentada a 200 °C registró picos ensanchados, menos intensos y con aparición de colas.

Actividad antibacteriana

Como se observa en la Tabla 4, el calentamiento a 92 °C por 10 minutos no afecta las actividades bacteriostática y bactericida del LCNM (CMI y CMB 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$); el calentamiento a 150 °C por 5 minutos no afecta la actividad bacteriostática pero disminuye la bactericida, y el calentamiento a 200 °C disminuye tanto la actividad bacteriostática como la bactericida.

Los cambios químicos, especialmente la descarboxilación de los ácidos anacárdicos producidos en la estructura de los componentes del LCNM por efecto del calentamiento, disminuyen claramente la

Tabla 3. CCD del LCNM natural y las muestras tratadas térmicamente

Fracción	LCNM _{natural}	LCNM _{92C}	LCNM _{150C}	LCNM _{200C}
	Rf	Rf	Rf	Rf
F ₁	0,76	0,76	0,71	0,71
F ₂	0,65	0,65	0,57	0,59
F ₃	0,52	0,52	0,49	-
F ₄	0,36	0,36	0,36	0,36
F ₅	-	-	0,08	0,08
F ₆	0,00	0,00	0,00	0,00

Fase estacionaria: sílica gel GF₂₅₄ Fase móvil : éter de petróleo: acetato de etilo 70:30

Tabla 4. Efecto de las condiciones del tratamiento térmico del LCNM sobre el CMI y el CMB

Muestra	CMI($\mu\text{g/mL}$)	CMB($\mu\text{g/mL}$)
LCNM natural	5,00	5,00
LCNM 92°C	5,00	5,00
LCNM 150°C	5,00	10,00
LCNM 200°C	> 5,00	> 5,00

actividad antibacteriana; por ello se recomienda que la extracción de la almendra se lleve a cabo a una temperatura cercana a los 92°C , con el fin de preservar su actividad antibacteriana.

Bioautografías

Después de la incubación de las bioautografías a 37°C por 48 horas se observó que las fracciones F_2 y F_3 (Tabla 3) exhiben halos brillantes de inhibición del crecimiento bacteriano; la fracción F_4 presentó un pequeño halo de inhibición a altas concentra-

Tabla 5. Perfil cromatográfico por CLAE para las fracciones F_2 y F_3

F_2		F_3	
tr(min)	Área %	tr(min)	Área %
5,69	1,78	5,29	50,93
6,57	0,40	6,30	10,36
9,18	1,38	7,89	1,83
9,59	51,66	9,18	25,36
11,80	15,76	11,40	4,86
12,57	1,93	12,07	1,34
13,78	0,98	-	-
14,82	2,09	-	-
15,39	22,47	15,08	5,33
24,20	1,55	-	-

ciones, y las fracciones restantes no mostraron inhibición del crecimiento.

Los compuestos de polaridad media del LCNM (bandas F_2 y F_3 con R_f 0,65 y 0,52 respectivamente) son los que poseen mayor actividad antibacteriana en *S. mutans*.

Fraccionamiento y purificación de los componentes con mayor actividad antibacteriana

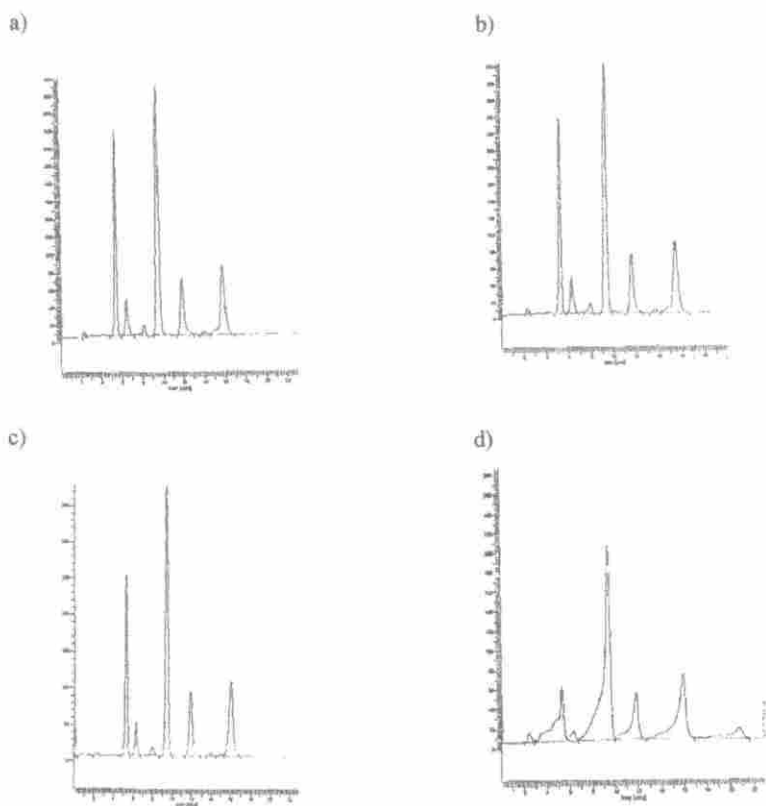
Las fracciones que registraron mayor actividad antibacteriana según las bioautografías se separaron por CCD preparativa y a cada una de ellas se le determinó la CMI y la CMB, siendo igual para ambas fracciones ($2,5 \mu\text{g/mL}$).

El perfil cromatográfico de las fracciones F_2 y F_3 , separadas por CLAE, se resume en la Tabla 5. Los componentes mayoritarios de la fracción F_3 eluidos a 9,59, 11,80 y 15,39 minutos, y de la fracción F_2 eluido a 5,29 minutos, se recolectaron y se les determinó CMI y CMB.

La actividad antibacteriana de los componentes mayoritarios separados por CLAE y recolectados se presenta en la Tabla 6.

Caracterización de los componentes con mayor actividad antibacteriana

Los resultados de la caracterización por RMN^1H y RMN^{13}C de los componentes mayoritarios de cada fracción, separados y purificados por CCD preparativa y CLAE (Tabla 7), confirman que la mayor ac-



Gráfica 1. Perfiles cromatográficos obtenidos por CLAE a) LCNM natural b) LCNM_{92C} c) LCNM_{150C} d) LCNM_{200C}.

tividad antibacteriana del LCNM en *S. mutans* se debe a los compuestos con núcleos de ácido anacárdico; además, que la actividad antibacteriana se encuentra relacionada con el grado de insaturaciones de la cadena alifática sustituyente del núcleo, siendo mayor cuanto más insaturada sea, lo cual está de acuerdo con los resultados obtenidos por Gellerman et al. (18), quien demostró que la permeabilidad de algunas membranas celulares a los ácidos anacárdicos depende de insaturación de la cadena alifática (18).

Los componentes del LCNM que poseen la mayor actividad antibacteriana en *Streptococcus mutans* son el ácido 6-[8(Z),11(Z),14(Z)-pentadecatrienil]salicílico (CMI y CMB <0,15 $\mu\text{g/mL}$) y 5-[8(Z),11(Z),14(Z)-pentadecatrienil]resorcinol (CMI 0,62 $\mu\text{g/mL}$ y CMB 1,25 $\mu\text{g/mL}$), con CMI y CMB inferiores a cualquiera de los antimicrobianos utilizados en el control de la caries dental, seguidos por el ácido 6-[8(Z), 11(Z)-pentadecadienil]salicílico y el ácido 6-[8(Z)-pentadecaenil]salicílico.

Con este trabajo se demostró que si bien el LCNM natural es una fuente excelente de agentes antibacterianos útiles en la prevención y control de la caries dental, la exposición a las altas temperaturas a las cuales el LCNM es comúnmente sometido durante el beneficio de la almendra (200 °C), disminuyen de manera considerable su actividad antibacteriana en *S. mutans* (CMI y CMB >5,0 µg/mL). Sin embargo, el LCNM calentado a 92 °C por 10 minutos, como lo sugiere el procedimiento alternativo para el beneficio de la almendra reportado por Rodríguez (7), no afecta la composición química ni la actividad antibacteriana. Por lo anterior, para que el LCNM pueda ser utilizado como agente potencial en el tratamiento y control de la caries dental, se recomienda que la temperatura de extracción de la almendra sea baja y no supere los 92 °C.

Tabla 6. CMI y CMB de los componentes mayoritarios separados por CLAE

Fracción	tr. (min)	CMI (µmg/mL)	CMB (µ/mL)
F ₃	5,29	0,62	1,25
	9,59	<0,15	<0,15
F ₂	11,80	1,25	2,50
	15,39	2,50	5,00

BIBLIOGRAFÍA

1. Loesche, W. J. (1986). Role of *Streptococcus mutans* in Human Dental Decay. *Microbiol. Rev.* **44**, 353-380.
2. Hamada, S.; Slade H. D. (1980). Biology, immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol. Rev.* **44**: 331-384.
3. Paramashivappa, R.; Phani, P.; Vitayathil, P.; Srinivasa, R. (2001). Novel Method for Isolation of Major Phenolic Constituents from Cashew (*Anacardium occidentale* L.). Nut

Tabla 7. Caracterización de los componentes con mayor actividad antibacteriana

Fracción	tr (min)	Componente	CMI (µmg/mL)	CMB (µmg/mL)
F ₃	5,29	5-[8(Z),11(Z),14(Z)-pentadecatrienil]resorcinol	0,62	1,25
F ₂	9,59	Ácido 6-[8(Z),11(Z),14(Z)-pentadecatrienil]salicílico	<0,15	<0,15
	11,80	Ácido 6-[8(Z),11(Z)-Pentadecadienil]salicílico	1,25	2,50
	15,39	Ácido 6-[8(Z)-pentadecaenil]salicílico	2,50	5,00

- Shel Liquid. *J. Agric. Food Chem.* **49**:2548-2551.
4. Himejima, M.; Kubo, I. (1991). Antibacterial Agents from the Cashew *Anacardium occidentale* (Anacardiaceae) Nut Shell oil. *J. Agric. Food Chem.* **39**:418-421.
 5. Muroi, H.; Kubo, I. (1993). Bactericidal Activity of Anacardic Acids against *Streptococcus mutans* and Their Potentiation. *J. Agric. Food Chem.* **41**, 1780-1783.
 6. Kubo, I.; Muroi, H.; Himejima, M. (1993). Structure-Antibacterial Activity Relationship of Anacardic Acids. *Extracción del líquido de la cáscara de la nuez del marañón. J. Agric. Food Chem.* **41**:1016-1019.
 7. Guatibonza, S. Extracción del líquido de la cáscara de la nuez del marañón. Trabajo de grado, Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 1999.
 8. George J.; Kuttan R. (1997). Mutagenic, carcinogenic and Cocarcinogenic Activity of Cashew nut Sell Liquid. *Cancer Lett.* **112**:11-16.
 9. Braga, S.; Juárez (1986). O Caju; Aspectos tecnológicos. Fortaleza, BNB, pp. 21-40, 145-159, 184-190.
 10. Rodríguez, C. Extracción y procesamiento de la almendra del marañón. Trabajo de grado, Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 1998.
 11. Thyman, J. H. P.; Muir, Johnson; Rokhgar, R. (1989). The extraction of natural cashew nut-shell liquid from their chashew nut (*Anacardium occidentale*). *JOACS.* **66**:553-557.
 12. Garzón J. Identificación de las sustancias responsables de la actividad antimicrobiana de Dryms granadiensis, 1992.
 13. Organización Panamericana de la Salud (1998). Identificación Bioquímica y Sexológica de *Haemophilus influenzae* y *Streptococcus pneumoniae*. Talle. Managua, Nicaragua.
 14. Horváth, Gy.; Kocsis, B.; Botz, L.; Németh J.; Szabó, LGy (2002). Antibacterial Activity of Thymus phenols by direct bioautography. *Acta Biologica Szegediensis.* **46**: 145-146.
 15. Phani, P.; Paramashivappa, R.; Vit hayathil, P.; Subba, P.; Srinivasa, A. (2002). Process for Isolation of Cardanol from Technical Cashew (*Anacardium occidentale* L.) Nut Shell Liquid. *J. Agric. Food Chem.* **50**:4705-4708.
 16. Kubo, I.; Komatsu, S.; Ochi, M. (1986). Molluscicides from the Cashew *Anacardium occidentale* and their Large Scale separation. *J. Agric. Food Chem.* **34**:970-973.
 17. Lie Ken Jie M.; Mustafa J. (1997). High-Resolution Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy - Applications to Fatty Acids and Tryacylglycerols. *Lipids.* **32**:1019-1034.
 18. Gellerman, JL.; Walsh, NJ.; Werner, NK.; Schlenk, H. (1969). Antimicrobial effects of anacardic acids. *Can. J. Microbiol.* **15**:1219-1223.