

ARTÍCULO ORIGINAL

Fraccionamiento y elucidación de compuestos bioactivos de *Reseda luteola* por CC y TLC

Julio Alfonso Armenta-Barrios^{1*}, Jocabel Extocapan-Molina¹, Maricela Ávila-Soto¹, Luis Felipe Juárez-Santillán¹, Yolanda Magdalena García-Rodríguez², Francisco Javier Espinoza-García²

¹Ingeniería en Agrobiotecnología, Universidad Tecnológica de Gutiérrez Zamora, Veracruz, México

²Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad, Morelia, Michoacán, México

Recepción 12 de julio de 2023. Aceptación 17 de julio de 2023

PALABRAS CLAVE

Reseda luteola,
Cromatografía en
columna,
Cromatografía en capa
fina.

Resumen

La cromatografía en columna (CC) y la cromatografía en capa fina (TLC) son dos técnicas comunes utilizadas en química analítica y química orgánica para separar y analizar mezclas de compuestos. La cromatografía en columna se basa en la separación de los componentes de una mezcla utilizando una columna rellena con un gel, un adsorbente sólido o una resina, se carga la muestra en la parte superior de la columna y se hace pasar a través de ella utilizando un solvente o una mezcla de ellos llamados fase móvil, los componentes se separan en función de sus afinidades, mientras que la cromatografía en capa fina, la muestra se aplica en una placa recubierta con una capa delgada de un adsorbente, como sílice gel o alúmina en un recipiente cerrado que contiene una mezcla de solventes (fase móvil), ascendiendo por capilaridad, separa los componentes de la muestra, revela el patrón de separación al utilizar una sustancia reveladora, como una luz ultravioleta o un reactivo químico específico, permitiendo visualizar los componentes como bandas en la placa y determinar su presencia y cantidad relativa por medio del factor de retención (R_F) que se utiliza para identificar y caracterizar los compuestos en una muestra y puede ser útil para comparar la retención de diferentes analitos en un sistema cromatográfico determinado. El presente estudio tuvo como objetivo elucidar los componentes bioactivos presentes en *Reseda luteola* utilizando el factor R_F por TLC a partir del fraccionamiento de sus extractos acetónicos por CC, logrando identificar 5 compuestos (kaempferol, quercetina, rutina, carvacrol/timol y luteolina) con actividad bioactiva comprobada, utilizando soluciones estándar de referencia.

KEYWORDS

Reseda luteola,
Column chromatography,
Thin-layer chromatography.

Abstract

Column chromatography (CC) and thin layer chromatography (TLC) are two common techniques used in analytical chemistry and organic chemistry to separate and analyze mixtures of compounds. Column chromatography is based on the separation of the components of a mixture using a column packed with a gel, a solid adsorbent or a resin, the sample is loaded on top of the column and passed through it using a solvent or a mixture of them called mobile phase, the components are separated based on their affinities, while thin layer chromatography, the sample is applied to a plate coated with a thin layer of an adsorbent, such as silica gel or alumina in a closed container containing a mixture of solvents (mobile phase), rising by capillarity, separating the components of the sample, revealing the separation pattern by using a revealing substance, such as ultraviolet light or a specific chemical reagent, allowing visualization of the components as bands on the plate and determine their presence and relative amount by means of the retention factor (RF) which is used to identify and characterize compounds in a sample and can be useful for comparing the retention of different analytes on a given chromatographic system. The objective of this study was to elucidate the bioactive components present in *Reseda luteola* using the RF factor by TLC from the fractionation of its acetone extracts by CC, managing to identify 5 compounds (kaempferol, quercetin, rutin, carvacrol/thymol and luteolin) with activity Proven bioactive, using standard reference solutions.

Introducción

La cromatografía es una técnica de análisis químico, descubierta en 1906, la cual se utiliza para separar componentes presentes en mezclas complejas, permitiendo determinar las propiedades físico-químicas de los componentes aislados dependiendo de su solubilidad, tamaño, diferencia de cargas, grado de pureza, su posterior caracterización de las diferentes biomoléculas mediante manchas o gráficos del cromatograma (Ruiz, 2020).

Las técnicas cromatográficas se pueden clasificar atendiendo a varios criterios: naturaleza de las fases (sólido, líquido, gas), relación de polaridad de las fases (fase normal, fase inversa), mecanismo de separación (adsorción, exclusión, intercambio iónico, reparto, afinidad), disposición de las fases (en columna, en plano) y forma de desarrollo del proceso (frontal, de desplazamiento, de elución). Existen diferentes técnicas de cromatográficas y de acuerdo con su clasificación en la disposición de la fase estacionaria está la cromatografía plana: cromatografía de papel y la de capa fina y la cromatografía en columna: cromatografía de líquidos, de gases y de fluidos supercríticos (Robards y Ryan, 2021).

En la cromatografía en columna (CC) la fase estacionaria consiste en un sólido adsorbente empaquetado comúnmente se utiliza sílica gel o alúmina, en una columna de vidrio, la muestra a separar se deposita sobre la parte superior de la fase estacionaria quedando adsorbida en ella, se vierte la fase móvil en la parte superior de la columna y se permite su paso a través de la fase estacionaria, durante el proceso cromatográfico los componentes de la muestra son arrastrados por la fase móvil a distintas velocidades efectuándose la separación, dependiendo de su grado de adsorción y de su afinidad por la fase móvil, la cual consiste en un disolvente o mezcla de disolventes, seleccionado en base a su polaridad con el fin de optimizar la separación de los componentes de la muestra en la columna (Zumbado, 2010).

La cromatografía en capa fina (TLC) es una técnica analítica rápida y sencilla que consiste en la separación de los componentes de una muestra debido a su migración

diferencial a través de una capa delgada de adsorbente, generalmente sostenido por una superficie plana inerte, se basa en el principio de adsorción entre dos fases, en donde la separación se realiza de acuerdo con los coeficientes de reparto de las moléculas de la muestra (Sgariglia *et al.*, 2010). La técnica se basa en introducir un pequeño volumen del solvente o mezcla de solventes que constituyen la fase móvil en un recipiente cerrado y se espera a que se sature el ambiente, en ese momento se introduce la fase estacionaria, donde se ha aplicado previamente la muestra, a través de la cual circulará la fase móvil debido al fenómeno de capilaridad, lo que conllevará un reparto diferencial de los productos que están presentes en la muestra entre el solvente y el adsorbente, una vez el frente del solvente alcance el límite de la placa, los puntos procedentes de la muestra separados se visualizan por absorbancia o fluorescencia, ya sea nativa o mejorada con agentes de visualización, para finalmente, los productos pertinentes se identifican por sus colores característicos o fluorescencia combinados con los valores del factor de retención (R_f), los cuales, al ser comparados con un patrón de referencia permiten la tipificación de sustancias que forman la muestra, identificando así los compuestos de interés (Spangerberg *et al.*, 2011).

Debido a que el fenómeno en el cual se basa la técnica es la adsorción, existen en el mercado diferentes tipos de adsorbentes como son: la sílice, la alquilsílice (C8 o C18), la alúmina, la celulosa y la poliamida, lo que le confiere una mayor versatilidad y aplicabilidad a la técnica para analizar sustancias en matrices complejas (Kumar *et al.*, 2013).

Reseda luteola es una planta anual de 1 m de altura, florística, pertenece a dos regiones: la xerofítica mexicana y, en menor proporción, la mesoamericana de montaña (Rzedowski, 2006), con tallo erguido, hojas simples enteras y lanceoladas y onduladas, produce flores amarillas y verdosas en racimos densos y alargados como espigas, nativa de Euro-Asia y naturalizada en la región mediterránea, presentando una fuente de pigmentos amarillos para la producción de textiles naturales (Angelini *et al.*, 2003), hasta

la efectividad probada contra diversos patógenos de interés farmacológico (Raji *et al*, 2023).

El presente estudio tuvo como objetivo elucidar los componentes bioactivos presentes en *Reseda luteola* utilizando el factor de retención (R_F) por cromatografía de capa fina (TLC) a partir del fraccionamiento de sus extractos acetónicos por cromatografía en columna (CC).

Material y métodos

El presente estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Tecnológica de Gutiérrez Zamora (UTGZ), Veracruz, y el Laboratorio Ecología Química y Agroecología del Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad (IIES), Morelia, Michoacán, los pasos empleados en el proyecto fueron:

Obtención del extracto acetónico de *Reseda luteola*

El material vegetal utilizado para la obtención del extracto consistió en tallos y flores sanas de *Reseda luteola*, colectadas en el jardín botánico del Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad, Morelia, Michoacán. El material vegetal se lavó con agua corriente por 5 min para eliminar el excedente de polvo y tierra, se eliminó el exceso de humedad y se maceraron 100 g de la muestra cortada en trozos de aproximadamente 1 cm con 450 mL de acetona marca JT Baker grado reactivo durante 15 días en oscuridad agitándolo ocasionalmente a una temperatura de 15°C (Ellof, 2001), después de transcurrido este tiempo el extracto obtenido se filtró utilizando Papel filtro marca Whatman con tamaño de poro de 8 μm y llevándolo a sequedad con ayuda de una línea de Schlenk con un flujo de Nitrógeno gaseoso de 30 l/min; para posteriormente guardarlo en congelación a -4°C hasta su utilización.

Resuspensión del extracto acetónico de *Reseda luteola*

Se utilizaron 0.646 gr de extracto acetónico seco de raíces de *Reseda luteola*, la cual fue suspendida en una solución constituida por 3 mL de diclorometano, 1.5 mL de acetona y 1 mL de metanol, todos los reactivos utilizados fueron de la marca JT Baker grado reactivo.

Preparación de la columna de fraccionamiento

Se preparó una columna de fraccionamiento en una bureta de 1L utilizando sílica 200 μm marca Sigma-Aldrich, partiendo de la cantidad de muestra a fraccionar, de la cual se obtuvo un peso inicial de 0.646 gr, ocupando la relación de 1:100 se pesó 64.6 gr de sílica para realizar el fraccionamiento, mientras que, para obtener la cantidad de solvente para elución, se calculó el volumen de sílica a utilizar, dando un volumen de 121.5 mL. Para montar la columna de elución, se colocó en el fondo de esta una borla de algodón al cual se le dio un tratamiento con hexano marca JT Baker grado reactivo para eliminar cualquier impureza que pudiera afectar en los resultados, posteriormente se colocaron 5 g de sulfato de sodio con el fin de crear una superficie plana en el fondo de la columna, agregando además 4mL de hexano, dejándolo fluir fuera de la columna.

Para la preparación de la muestra a separar, se pesaron 4 gr de sílica, la cual se mezcló con 6 mL de extracto suspendido y se llevó a sequedad utilizando un flujo de Nitrógeno gaseoso de 30 l/min.

Se mezclaron los 121.5 mL de hexano con los 60.4 g de sílica restante formando una pasta la cual se introdujo a la columna de elución con ayuda de un embudo para formar la fase estacionaria, después se le adicionó la muestra suspendida hasta formar una banda uniforme en la superficie de la sílica (Kotzé, 2002), como se muestra en la Figura 1.



Figura 1 Montaje de la columna de fraccionamiento

Fraccionamiento del extracto acetónico de *Reseda luteola*

Se utilizaron 3 solventes orgánicos (hexano, acetato de etilo y metanol) con el fin de conseguir diversas fracciones con polaridades diferentes obteniendo así separar varios compuestos con respecto a su índice creciente de polaridad; la composición de cada fracción se aprecia en la tabla 1.

Tabla 1. Composición de cada fracción eluida en la columna de fraccionamiento

| Fracción | Composición de la fracción |
|----------|----------------------------|
| F1 | 100% Hexano |
| F2 | 100% Acetato de etilo |
| F3 | 100% Metanol |

Se procedió a la elución de la muestra en la columna empacada con sílica, utilizando cada fracción en orden creciente dando el cambio de mezcla del solvente utilizado cuando la fracción eluida salió completamente incolora, lo que nos indica que la columna ya no presenta compuestos que puedan ser obtenidos con la polaridad de la mezcla actual (Moulishankar *et al*, 2020).

Al finalizar la separación, la columna se limpió utilizando una mezcla 95:5 metanol/ácido fosfórico para obtener cualquier componente que se haya quedado alojado en esta.

Las fracciones fueron colectadas para posteriormente ser concentradas por evaporación en un rotavapor Büchi RE 121 y posteriormente guardadas en frascos ámbar lejos de la luz para evitar la degradación de sus componentes.

Separación de fracciones por TLC

Cada fracción concentrada obtenida de la columna de elución fue separada utilizando la técnica de cromatografía en capa fina, utilizando placas para TLC de aluminio con sílica 60 marca Binder, cortando con un bisturí tiras de 1 cm de ancho correspondientes al número de muestras a analizar, se marcó con un lápiz los puntos correspondientes de carga de muestras a una distancia de 1cm del borde inferior de la placa y se añadieron 10 μL de las respectivas muestras en los puntos antes marcados (Legerská *et al*, 2020).

Se introdujo cada una de las placas en una cámara de elución con solvente como fase móvil (como se muestra en la tabla 1) de forma que el líquido no moje la línea y posteriormente se cerró la tapa para que no se evapore la fase móvil, dejando

eluir por 20 minutos, para después retirar las placas y secarlas con aire a temperatura ambiente en una campana de extracción de gases, todas las muestras fueron tratadas por triplicado.

Cálculo de factor R_F y elucidación de compuestos bioactivos

Se analizaron los resultados de la placa de TLC mediante la visualización directa buscando la presencia de bandas correspondientes a cada compuesto, adicionalmente, se revelaron utilizando yodo y se visualizaron en luz blanca y luz ultravioleta a 254 nm y 365 nm respectivamente.

Para medir el recorrido de los compuestos en la TLC se utilizó el factor de retención (R_F) la cual define como la distancia recorrida por un componente con respecto a la distancia total recorrida por el disolvente (Malathi & Thamizhseran, 2021), y se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$R_F = \frac{\text{Distancia recorrida por el compuesto}}{\text{Distancia recorrida por el disolvente}}$$

Utilizando el factor de retención (R_F) el cual fue calculado para cada una de las bandas presentes en los cromatogramas preparados, los cuales fueron comparados contra diversos valores estándar R_F de biomoléculas comúnmente conocidas a varios niveles de polaridad, estos valores estándar fueron facilitados por el Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad (IIIES) campus Morelia, Michoacán.

Una vez comparados los valores de R_F contra los estándares se realizó una búsqueda bibliográfica en una base de datos facilitada por el IIIES campus Morelia, para cotejar el tipo de biomolécula que se encuentra en las bandas visualizadas en cada uno de las fracciones obtenidas.

Resultados

Obtención de fracciones por CC de *Reseda luteola*

Se obtuvieron 5 fracciones del extracto resuspendido en sílica de la raíz de *Reseda luteola*, por CC, utilizando diversas composiciones de eluyente con índice de polaridad creciente, para lograr así obtener la mayor cantidad de compuestos presentes en dichas fracciones, eluyendo cada una de ellas hasta que el solvente saliera transparente de la columna como se muestra en la figura 2.



Figura 2. Fraccionamiento del extracto acetónico de *Reseda luteola*

Estas fracciones obtenidas fueron concentradas en un rotavapor marca Büchi RE 121 con una temperatura de 30°C, una presión de vacío de 250 mbar como se muestra en la figura 3, obteniendo las fracciones concentradas para después almacenarlas a 4°C en refrigeración hasta su posterior uso.



Figura 3. Concentración de las fracciones obtenidas utilizando un rotavapor

Obtención de cromatogramas por TLC y factor R_F

Se obtuvieron cromatogramas de las fracciones evaluadas las cuales fueron reveladas con yodo y visualizadas a diferente longitud de onda, en la figura 4 se muestran las principales bandas encontradas, así como el valor R_F calculado de ellas utilizando la fórmula anterior (no se muestran los cromatogramas con bandas duplicadas ni aquellos que no presentaron bandas).

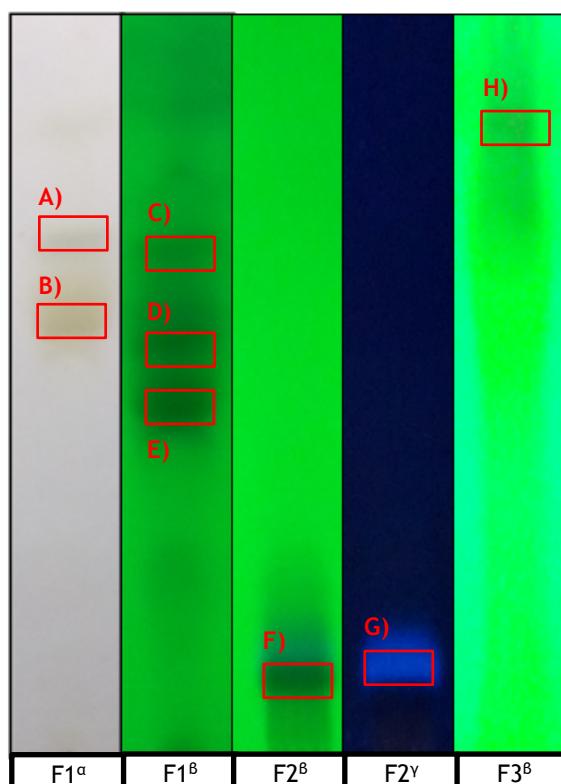


Figura 4. Cromatogramas de TLC de diversas fracciones revelados a diferentes tipos de luz (α : luz visible, β : 254 nm, γ : 365 nm)

En la figura 4, se puede observar que existen bandas muy similares, en las mismas fracciones a diferente longitud de onda, estas se desestimaron, siendo semejantes entre sí, por lo que solamente se trabajó con las bandas A), B), E), F) y H). Se calculó el factor R_F de cada uno de las bandas obtenidas en los cromatogramas mostrados en la figura 4, utilizando la fórmula vista anteriormente, los resultados se muestran en la

tabla siguiente:

Tabla 2 Factor R_F de cada banda visualizada en las fracciones obtenidas por TLC

| Banda | Composición de la fracción | Factor R_F |
|-------|----------------------------|--------------|
| A) | 100% Hexano | 0.74 |
| B) | 100% Hexano | 0.63 |
| E) | 100% Hexano | 0.55 |
| F) | 100% Acetato de etilo | 0.15 |
| H) | 100% Acetato de etilo | 0.89 |

Elucidación de compuestos bioactivos

Se utilizaron valores estándar de biomoléculas básicas a diversas polaridades, las cuales fueron comparadas con el valor de R_F de las 5 bandas reveladas obtenidas en los cromatogramas preparados que se muestran en la tabla 2. Así mismo, se realizó una búsqueda en la base de datos proporcionada por el IIES campus Morelia, para cotejar el tipo de molécula que pudiera estar presente en cada fracción anteriormente evaluada, estos resultados se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Compuestos activos atribuidos con respecto al factor R_F

| Banda | Factor R_F | Compuesto bioactivo atribuido |
|-------|--------------|-------------------------------|
| A) | 0.74 | Kaempferol |
| B) | 0.63 | Quercetina |
| C) | 0.55 | Rutina |
| D) | 0.15 | Carvacrol/Timol |
| E) | 0.92 | Luteolina |

Discusión

Los compuestos elucidados en la tabla 3, se obtuvieron al comparar el valor R_F de diversos compuestos estándar con valores conocidos, a diferentes polaridades, pudiendo mostrar la presencia de estos.

El Kaempferol representa uno de los flavonoides más encontrados y es un compuesto amarillo, se encuentra en varias plantas, demostrando efectos cardioprotectores, neuroprotectores, antiinflamatorios, y actividad anticancerígena probada (Imran *et al.*, 2019).

La quer cetina es el principal representante de la subclase de flavonoides, ampliamente distribuida en frutas y verduras, es un flavonoide conocido por sus propiedades antioxidantes, antivirales, antimicrobianas y antiinflamatorias (Di Petrillo *et al.*, 2022).

La rutina, se encuentra entre los flavonoides encontrados en frutas, verduras y bebidas de origen vegetal como té y vino; tiene varias propiedades farmacológicas, incluyendo efectos anticancerígenos, antiinflamatorios, neuroprotectores, anticancerígenos y antioxidantes (Imani *et al.*, 2020).

El timol y carvacrol son dos compuestos fenólicos que tienen potentes propiedades antimicrobianas naturales y se producen por varias especies de plantas como un mecanismo de defensa química contra microorganismos fitopatógenos, en consecuencia, presentan propiedades antimicrobianas y fungitóxicas contra diversos patógenos de las plantas (Vázquez *et al.*, 2021).

La luteolina es uno de los flavonoides más comunes presentes en plantas comestibles y en plantas utilizadas en la medicina tradicional para tratar una gran variedad de patologías, presentando actividad antimicrobiana, antiinflamatoria, antioxidante y anticancerígena (López, 2019).

Estos compuestos antes mencionados, presentan gran actividad biológica comprobada por diversos autores, y

concuerdan con lo reportado en otras investigaciones utilizando técnicas de reconocimiento y elucidación avanzadas como cromatografía líquida de alta resolución o HPLC (Cristea *et al.*, 2003).

Conclusiones

Se realizó un barrido utilizando 3 solventes de polaridad creciente, obteniendo mejores resultados al utilizar hexano y acetato de etilo, pues con estos podemos extraer compuestos como alcaloides y terpenoides respectivamente.

La obtención de compuestos bioactivos por métodos de separación y su posterior elucidación por cromatografía, es un método fácil de operar en fitoquímica con numerosas aplicaciones, que se pueden utilizar en el desarrollo de nuevos fármacos y diversos tipos de formulaciones medicinales; pero es necesaria realizar una investigación detallada para el desarrollo sostenible de las técnicas.

La utilización de técnicas preparativas como la cromatografía en columna (CC) y de separación inicial como la de cromatografía en capa fina (TLC) son útiles para elucidar compuestos de gran interés bioactivo, ya que son técnicas de sondeo y cribado inicial, las cuales son de fácil aplicación y bajo costo.

Contribución de los autores

JAAB, diseño del trabajo, análisis y redacción.

JEM, diseño del trabajo y revisión.

MAS, diseño del trabajo y redacción.

LFJS análisis y redacción.

YMGR, diseño del trabajo, pruebas químicas, revisión.

FJEG, diseño del trabajo y revisión.

Financiamiento

Ninguno.

Conflictos de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Presentaciones previas

Ninguna.

Referencias

- Angelini L., Bertoli A., Rolandelli S. & Pistelli L. (2003) Agronomic potential of Reseda luteola L. as new crop for natural dyes in textiles production. Industrial Crops and Products Volume 17, Issue 3, Pages 199-207
- Cristea D., Bareau I. & Vilarem G. (2003) Identification and quantitative HPLC analysis of the main flavonoids present in weld (Reseda luteola L.), Dyes and Pigments, Volume 57, Issue 3, Pages 267-272, ISSN 0143-7208.
- Di Petrillo A., Orrù G., Fais A. & Fantini M. (2022). Quercetin and its derivates as antiviral potentials: A comprehensive review. Phytotherapy Research, 36(1), 266-278.
- Eloff J. (2001) Antibacterial activity of Marula (*Sclerocarya birrea* (A. rich.) Hochst. subsp. *caffra* (Sond.) Kokwaro) (Anacardiaceae) bark and leaves, Journal of Ethnopharmacology, Volume 76, Issue 3, Pages 305-308.
- Imani A., Maleki N., Bohloul S., Kouhsoltani M., Sharifi S. & Maleki Dizaj S. (2020). Molecular mechanisms of anticancer effect of rutin. Phytotherapy Research.
- Imran M., Salehi B., Sharifi-Rad J., Aslam T., Saeed F., Imran A. & Estevinho L. M. (2019). Kaempferol: A Key Emphasis to Its Anticancer Potential. Molecules, 24(12), 2277.

7. Kotzé M (2002) Extraction of antibacterial compounds from *Combretum Microphyllum* (Combretaceae). *S Afr J Bot*;68(1):62-7.
8. Kumar S., Jyotirmayee K. & Sarangi, M. (2013) Thin layer chromatography: a tool of biotechnology for isolation of bioactive compounds from medicinal plants. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res*, 18(1), 126-132.
9. Legerská B., Chmelová D. & Ondrejovič, M. (2020). TLC-Bioautography as a fast and cheap screening method for the detection of α -chymotrypsin inhibitors in crude plant extracts. *Journal of biotechnology*, 313, 11-17.
10. López-Lazaro, M. (2009). Distribution and Biological Activities of the Flavonoid Luteolin. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 9(1), 31-59.
11. Malathi H. & Thamizhseran N. (2021). Thin Layer Chromatography and GC-MS Analysis of Bioactive Molecules of the *Acacia ferruginea* DC. Thorn Extract. *Asian Journal of Biological and Life Sciences*, 10(1).
12. Moulishankar A., Ganesan P., Elumalai M, & Lakshmanan K. (2020). Significance of TLC and HPTLC in phytochemical screening of herbal drugs. *J. Glob. Pharma Technol*, 13, 30-45.
13. Raji Y., Nadi A., Chemchame Y., Mechouli I., Bouari A., Cherkaoui O., & Zyade S. (2023). Eco-friendly Extraction of Flavonoids Dyes from Moroccan (*Reseda luteola* L.), Wool Dyeing, and Antibacterial Effectiveness. *Fibers and Polymers*, 24(3), 1051-1065.
14. Robards K. & Ryan D. (2021). Principles and practice of modern chromatographic methods. Academic Press.
15. Ruiz M. (2020). Cromatografía en capa fina y en columna, Universidad Simón Bolívar, Colombia.
16. Rzedowski, J. (2006). Vegetación de México. México: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO).
17. Sgariglia M. Soberón J., Sampietro D. & Vattuone M. (2010) Cromatografía: Conceptos y Aplicaciones. Arakuku, 2(1), 1-6.
18. Spangenberg B., Poole C. & Weins, C. (2011) Quantitative thinlayer chromatography: a practical survey Springer Science & Business Media.
19. Vázquez B., Fente C., Franco C., Vázquez M. & Cepeda A. (2001) Inhibitory effects of eugenol and thymol on *Penicillium citrinum* strains in culture media and cheese. *Int J Food Microbiol*. Jul 20;67(1-2):157-63.
20. Zumbado H. (2010) Cromatografía en columna, Métodos Cromatográficos, Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana, Cuba.