

GUIA DE TECNICAS EN GLICOBIOLOGIA: UN EJEMPLO PRÁCTICO

Mauricio A. Ondarza-Beneitez

1) Investigador Asociado. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ AC). Guadalajara, Jalisco. México. Correo electrónico: biochem93@hotmail.com

Recibido: Septiembre 2015; Aceptado: Febrero 2016

RESUMEN:

Respecto a la fisiología de los glicoconjugados, se considera que las sustituciones en la cadena polimérica principal de los polímeros, es representativa de su biosíntesis. Diversas metodologías analíticas han sido brillantemente descritas en la "Guía de Técnicas en Glicobiología". Algunas de éstas son abordadas en esta revisión y se brinda asimismo, un ejemplo práctico de la caracterización de polisacáridos de la pared celular de la talofita rodoficea *Gracilaria verrucosa*. Los resultados han mostrado y demostrado la presencia del residuo 4-O-Metil-L galactosa en los polímeros del agar y su enlace a la unidad D-Galactopiranososa en la posición C-6, la cual resulta ser también el sitio de una O-metilación. Basados en el cociente 6-O-Me-Gal/ 4-O-Me-Gal y en el grado de sustitución de la Unidad D-Gal, se define aquí un nuevo enfoque de estudio para monitorear los eventos característicos del metabolismo del agar.

Palabras Claves: biosíntesis de glicoconjugados, O-metilaciones, cromatografía, metabolismo del agar, cociente 6-O-Me-Gal/ 4-O-Me-Gal.

ABSTRACT

Regarding glycoconjugate's physiology, it is considered that substitutions on the principal inner chain of polymers are representative of their biosynthesis. Several analytical methodologies have been extensively described. We mention some of them in this review article and provide a practical example performed within the Plant Cell Wall Polysaccharides of the rhodophycean thallophyte *Gracilaria verrucosa*. Results have shown and demonstrated the presence of a 4-Omethyl-L-galactose in agar polymers and its linkage on the C-6 position of the D-Gal unit, which is also the site of O-methylation. Based on the 6-O-Me-Gal/4-O-Me-Gal ratio and the degree of substitution of D-Gal unit, a new approach for monitoring the characteristic events of agar metabolism was defined.

Key words: glycoconjugate biosynthesis, O-methylation, chromatography, Agar's metabolism, 6-O-Me-Gal/ 4-O-Me-Gal ratio.

INTRODUCCIÓN

Los carbohidratos representan una de las clases más comunes de compuestos orgánicos presentes en la tierra y su análisis y purificación resulta ser de extrema importancia para los investigadores bioquímicos.

En los sistemas bioquímicos, los carbohidratos desempeñan diversas funciones como por ejemplo: son esenciales en el metabolismo de las plantas verdes, desempeñando un importante papel en la utilización del CO₂. Representan las últimas fuentes de carbono y de energía en los organismos no-fotosintéticos y pueden ser estructuralmente necesarios, como en el caso de la celulosa de las plantas o de la quitina, como constituyente principal del caparazón de varios organismos.

Otros tipos de carbohidratos juegan papeles diversos a la manera de: lubricantes, factores de reconocimiento celular, determinantes grupo sanguíneos y como anticongelantes celulares. Las

glicoproteínas (proteínas unidas a residuos de carbohidratos) por su parte, actúan como enzimas, anticuerpos, hormonas y receptores glicoconjugados en la relación huésped-patógenos. En éste caso, los carbohidratos pueden participar en la conformación estructural, metabolismo, tiempo de vida media y en el aporte celular de las proteínas.

Así también, eventos como la diferenciación y el reconocimiento celular y la actividad hormonal; pueden verse afectados por causa de las porciones glicánicas (carbohidratos) que conforman a las glicoproteínas [1].

Los carbohidratos son componentes integrales de moléculas amplias y complejas tales que las glicoproteínas, glicoesfingolípidos y de un diverso número de metabolitos secundarios de origen animal y vegetal. Los carbohidratos pueden unirse mediante derivatización natural o por conjugación a una amplia variedad de compuestos a través de múltiples maneras de naturaleza química o enzimática.

El análisis de los carbohidratos puede dividirse en 2 áreas: mediante los métodos basados en la cromatografía y de aquéllos que emplean otras técnicas diversas. Los primeros incluyen a los procedimientos inmunológicos como la inmunoprecipitación y la inmunofluorescencia a pesar de no ser específicamente enzimáticos, pero en base a su etiología biológica. Dos tipos de análisis enzimáticos son comunes: el específico para monosacáridos y, el específico para la hidrólisis de oligosacáridos de cadena larga [2].

Dichos métodos son extremadamente resolutivos pero se ven limitados por las interferencias derivadas de los contaminantes presentes en las soluciones de prueba, e incluso por la presencia de otros azúcares, sales y metales. Además, tanto la pureza como el origen de las enzimas, resultan ser críticos en la determinación de los carbohidratos.

La actividad y especificidad de las glicosidasas aisladas de diferentes fuentes, puede variar ampliamente. De la misma forma, pueden surgir confusiones en la liberación de más de un residuo monosacárido después de la hidrólisis de oligosacáridos ramificados mediante una sola exoglicosidasa. La falta de una hidrólisis puede no necesariamente indicar la ausencia de alguna unidad monosacáridica particularmente no-reductora; ya que el grado de liberación dependen tanto de la longitud como del arreglo secuencial de las unidades sacarídicas vecinas que conforman a la cadena oligosacáridica.

Aún más, se debe considerar también, de que existe la posibilidad de que un monosacárido dado se encuentre presente en la forma furanosa en lugar de la piranosa, así como la presencia de contaminantes inhibidores de glicosidasas.

La fuerte especificidad de los métodos enzimáticos, resulta ser igualmente contraproducente, dado que cada uno de los carbohidratos, requieren tanto de diferentes condiciones para su análisis, como de diferentes series de enzimas. Mientras que los métodos enzimáticos han sido los seleccionados para algunos carbohidratos, particularmente la glucosa; los métodos cromatográficos han sido de gran valía al bioquímico. El análisis cromatográfico de los carbohidratos, así como el de cualquier otro analito; puede dividirse en 2 distintas áreas: la separación y la detección. La confusión se puede presentar aquí, debido al hecho de que los carbohidratos hidrosolubles, fuertemente polares y no volátiles; no son separados con facilidad por alguno de los métodos de rutina disponibles. Dado que no son cromofóricos, no logran ser detectados mediante la espectroscopia de absorción. La derivatización de éstos, de manera a favorecer sus características cromatográficas y de absorbancia; pueden sin embargo, dar lugar a la formación de múltiples picos para cada analito, como resultado de una derivatización incompleta. Numerosas técnicas de separación de los carbohidratos se han desarrollado a lo largo de los años. La cromatografía en papel, aunque es extremadamente barata; requiere de varias horas e inclusive días para la separación de tan solo simples monosacáridos y si se trata de oligosacáridos, estas separaciones resultan a menudo imposibles [3]. Varias técnicas de cromatografía en capa fina y de alta resolución de la capa fina, han logrado desarrollarse [4] mientras que una selección adecuada de la fase estacionaria, fase móvil y ocasionalmente una derivatización pre cromatográfica pueden asegurar la separación de varios carbohidratos; una limitada resolución proporcionada por el número de platos de la capa fina, reduce el número de los posibles analitos que pueden ser separados.

Los carbohidratos presentes como mono o como oligosacáridos, deben ser derivatizados de manera a poder analizarlos mediante las técnicas de cromatografía de gases. Diversas técnicas de derivatización han sido desarrolladas e incluyen: la formación de alquil-éteres o alquil-ésteres, así como una trimetil-sililación [5]. En cualquiera de los casos antes mencionados, las muestras deben someterse a un pretratamiento, que a menudo incluye una remoción de proteínas y sales, antes de la derivatización.

A menudo, el método de detección empleado para la cromatografía de gases, como por ejemplo la ionización de llama o flama; tiende a ser destructivo y en el mejor de los casos, el trabajo preparativo requiere de reactivos de derivatización tóxicos, caros o químicamente lábiles.

Aún más, los grandes oligosacáridos aún derivatizados, pueden sufrir una descomposición dentro del cromatógrafo. En el caso de los monosacáridos, la derivatización puede ser incompleta y dar lugar a la formación de múltiples picos por cada analito.

La facilidad con la que se ha logrado establecer una interfase entre la cromatografía de gases y la espectrometría de masas; parece resultar muy útil en muchos de los casos. Cantidades significativas de datos estructurales pueden ser obtenidas cuando varios carbohidratos derivados son analizados [6].

Entre otras aplicaciones recientes, podemos mencionar el de la separación de carbohidratos sialilados, mediante la cromatografía por fluidos supercríticos. Dicho método promete avances pero al igual que la cromatografía de gases, se requiere que los carbohidratos sean derivatizados. Por otro lado, dado que se emplean bajas temperaturas, se reducen las posibilidades de una formación de artefactos inducidos térmicamente. En el caso de las técnicas de cromatografía líquida en columna abierta, la de la permeación en gel ha permitido la obtención de mejores resultados [7].

Otras técnicas a bajas presiones incluyen una fase normal y una cromatografía de afinidad con lectinas inmovilizadas [8]. Mientras que algunos carbohidratos son iónicos de manera natural (azúcares aminados, ácidos urónicos, carbohidratos complejos sialilados, carbohidratos fosforilados, etc.) y pueden por lo tanto ser naturalmente separados por intercambio iónico; la adición de borato al eluante para el análisis de los carbohidratos neutros, da lugar a la formación de complejos borato-carbohidratos aniónicos que de igual manera pueden ser separados por intercambio iónico [9].

Los carbohidratos muy polares pueden ser también separados por métodos en fase normal y bajo diferentes substratos que incluyen: la hidroxiapatita, celulosa microcristalina, sílica y soportes de mezclas de carbón activado.

Los carbohidratos pueden ser separados tanto en su forma natural no derivatizada o en sus formas químicas -acilo y -alquilo. Actualmente, la cromatografía líquida a alta presión o resolución incluye técnicas como: la permeación en gel, materiales de intercambio catiónico empacados con metales, fases de sílica aminopropilo y de fase reversa.

Para el análisis completo de una mezcla compleja de oligosacáridos derivados de glicoproteínas, se requiere emplear una técnica de dos columnas. El fraccionamiento por tamaños mediante una columna aminopropil, es seguida por una resolución de las especies estructuralmente distintas dentro de cada fracción, utilizando una columna de fase reversa [10].

La fase reversa ha permitido la separación de carbohidratos derivatizados mediante columnas C-18. Los derivados más comunes empleados en cromatografía de líquidos, son: los benzoatos, alquil-éteres y acetatos [11].

Las técnicas electroforéticas también pueden ser incluidas como del tipo cromatográfico. Se

han usado en la separación de carbohidratos de manera preparativa y analítica. En la mayoría de los casos, son los glicopéptidos preparados mediante hidrólisis enzimáticas o químicas; los que logran ser separados de manera electroforética, aunque también se les puede separar por cromatografía líquida a altas resoluciones o presiones.

Diversas técnicas han sido empleadas en la detección de los carbohidratos después de la separación cromatográfica. Aquí se incluyen las revelaciones con sprays o inmersiones de tiras de papel en paltos de capa fina conteniendo diversos reactivos de coloración. Aunque se trata de métodos sensitivos, resulta muy difícil realizar un análisis cuantitativo. Dentro de los sprays cromogénicos se mencionan: el ácido tiobarbitúrico para la determinación de ácidos siálicos; el orcinol-ácido sulfúrico para determinar galactosa; antrona para hexosas; carbazol para ácidos urónicos; el resorcinol para residuos de ácidos siálicos unidos, y otros generales y específicos.

Los métodos de detección basados en reacciones de unión enzimática, también han sido empleados y como ejemplo, se menciona el uso de la galactosa-oxidasa para determinar galactosa.

Por ejemplo, los hidratos de carbono en los mostos se presentan principalmente en forma de azúcares (glucosa y fructosa). Desde el punto de vista químico, la glucosa y fructosa son monosacáridos. La reacción de color para medir la concentración de carbohidratos solubles por espectrofotometría se basa en la utilización de un compuesto llamado antrona que se disuelve en ácido sulfúrico concentrado. El medio ácido hidroliza el enlace glicosídico de los oligosacáridos y los monosacáridos resultantes reaccionan con la antrona (Figura 1) produciendo un color verde – azulado. Otra técnica fuera de línea y que permite monitorear la radioactividad presente en carbohidratos marcados presentes en muestras colectadas, es la del centelleo líquido.

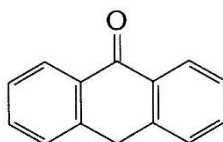


Figura 1. Estructura de la antrona.

En gases, además de la ionización de llama, se tienen otros detectores como el de Nitrógeno-Fósforo que determinan carbohidratos amino derivatizados; mientras que el detector de captura de electrones, permite la determinación de muestras derivatizadas con residuos halogenados o que contienen el grupo arilo.

Muchos carbohidratos exhiben actividad óptica, pero el problema que se presenta es que algunos desvían la luz hacia la izquierda (levógiros), otros hacia la derecha (dextrógiros) o son

inactivos. En líquidos, los métodos de detección son las bajas longitudes de onda ultravioletas (190 a 210 nm) [12] y el índice de refracción [13] que es un método no selectivo. La adición de cualquier soluto y el cambio mínimo de la temperatura, afectan éstos índices por lo que se dificulta su empleo.

Dionex (Sunnyvale, California) ha recientemente introducido al mercado las series BioLC™ tanto para sistemas de separación como de detección. Mientras que tanto la coulombimetría como la amperometría, parecen ofrecer limitados resultados en el análisis de los carbohidratos: una técnica reciente, "la pulsación amperométrica", parece brindar mejores resultados [14].

El detector de pulsación amperométrica logra detectar carbohidratos no reductores (alditoles y glicósidos) con la misma sensibilidad para los reductores. La combinación de resinas peliculares de intercambio aniónico con una detección pulso-amperométrica, parecen ofrecer hoy en día, el más rápido, selectivo, sencillo, sensitivo y el mejor método de análisis de los carbohidratos [15].

Para determinar la composición de monosacáridos en glicoconjugados es necesario romper el oligosacárido en sus componentes antes de su análisis. Existen tres métodos de ruptura: hidrólisis ácida, metanólisis y solvólisis con fluoruro de hidrógeno. Seguido de la ruptura, los residuos de monosacáridos no volátiles son a menudo derivatizados a formas volátiles y analizadas por cromatografía de fase gas-líquida y en combinación con la cromatografía de fase gas-líquida/espectrometría de masas [16].

Hay dos métodos para generar estos derivados volátiles: la producción de acetatos de alditol o la trimetilsilización (TMS). Debido a que los monosacáridos permanecen en la forma de anillo en la metanólisis, una mezcla de las formas furanosa y piranosa, así como de los anómeros α y β de cada monosacárido; son generados en la derivatización. Los diversos picos producen un patrón característico que permite la identificación mediante los tiempos de retención. Aún más, el método TMS facilita la identificación simultánea de carbohidratos neutros y amino azúcares, así como azúcares acídicos (por ejemplo. ácido siálico y ácido urónico) [17].

Una detallada discusión acerca de la química del método de derivatización ha sido descrita por *Fox et al.* [18]. Dado que la separación por cromatografía en fase gas-líquida depende de la diferente destilación de los componentes de la mezcla, un prerequisite para el análisis es la formación de derivados volátiles de los carbohidratos. El procedimiento de derivatización también ha sido desarrollado para el análisis de polisacáridos de la pared celular vegetal [19].

Un ejemplo práctico: El estudio de galactanos. En el caso de talofitas como *Gracilaria*

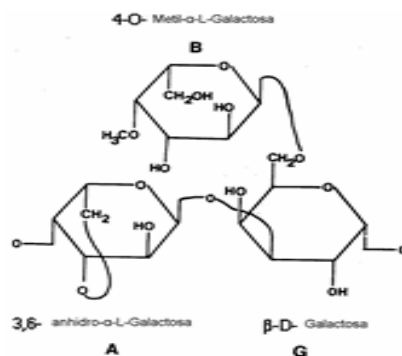
verrucosa (Hudson) Papenfuss, se sabe que el agar ha sido definido por mucho tiempo como un polisacárido relativamente homogéneo, soluble en agua caliente. Este concepto ha ido evolucionando por la demostración tanto de la heterogeneidad de las moléculas extraídas y por otra parte, por la obtención de fracciones solubles en agua destilada a temperatura ambiente.

El agar es un galactano gelificante extraído de la pared de ciertas algas rojas, estando conformado por unidades de repetición alternadas: El 3,6-anhidro- α -L-galactopiranososa y el β -D-galactopiranososa. La calidad industrial de los geles que se forman, depende de la proporción relativa en agarosa, siendo esta la forma ideal de esta familia de moléculas. Existe un cierto número de sustituciones que logran modificar la cadena principal: grupos éter-metilos, hemi-éster-sulfato, piruvato.

PARTE EXPERIMENTAL:

Material. Trabajos preliminares en nuestro laboratorio, han mostrado que la calidad del agar extraído de *Gracilaria verrucosa*, varía no solamente en función de las condiciones fisiológicas, sino igualmente en función de la edad y en la naturaleza de los tejidos. Se ha confirmado y correlacionado una heterogeneidad química con la calidad del ficocoloide [20].

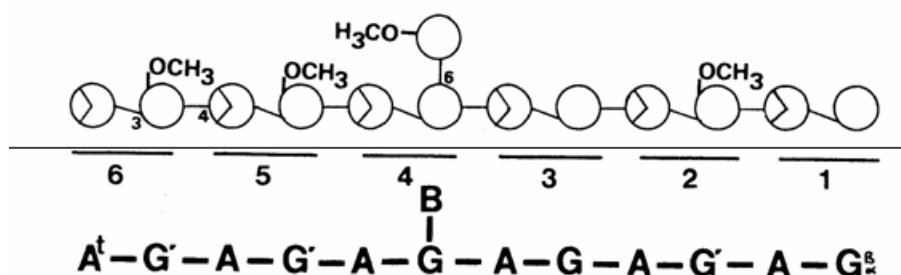
Determinación del contenido centesimal en galactosa total sustituida y no sustituida. Se concluye lo siguiente: La composición en galactosa no sustituida, así como en galactosa sustituida por grupos éter-metílicos; ha sido establecida por cromatografía en fase gaseosa (CFG). Los monosacáridos han sido analizados bajo la forma de acetatos de alditol, preparados previa hidrólisis ácida (HCl 2 M, 2 horas a 100°C) [21]. De la misma manera, por comparación con el testigo y su espectro de masas, hemos identificado en el laboratorio, la 4-O-metil- α -L-Galactopiranososa (Esquema 1).



Esquema 1. Estructura química del polímero del Agar, Unidades D- y L-Galactosa Punto de enlace del 4-O-metil- α -L-galactosa según Karamanos et al. [22].

RESULTADOS

La utilización de la β -agarasa I a partir de *Pseudomonas atlántica*, nos permitió aislar oligosacáridos enriquecidos en 4-O-metil-galactosa, el cual se demostró estar unido al C-6 de la Unidad D-galactosa. El hecho de que el contenido en 4-O-metil-galactosa sea superior en la fracción F I y en la fracción FRE (resistente a la enzima); demuestra que las sustituciones laterales protegen al polímero en contra de degradaciones enzimáticas, que se presentan probablemente por conglomeraciones estéricas [22]. Hemos asimismo constatado, que las sustituciones en la unidad D-galactosa en la posición C-6, intervienen en bloques, en promedio; de 6 unidades contiguas, conteniendo: 3 residuos 6-O-metil-galactosa y 3 residuos de galactosa, en donde uno de ellos, lleva el enlace con el 4-O-metil-galactosa (esquema 2). Dado que todos los oligosacáridos se terminan con el 3,6-AG en posición no reductora, parecería que 1 residuo de la D-galactosa permanece sin ser substituido.



G = galactosa, G' = 6-O-MeGal, A = 3,6-anhidro-galactosa

A^t = 3,6-AG en posición terminal no reductora, G β/α = en posición reductora, B = 4-O-MeGal, de 1 a 6 = unidades de neoagarobiosa.

Esquema 2. Estructura propuesta para el dodecasacárido estudiado.

Conociendo la especificidad de la β -agarasa I, la única posibilidad de localización que pudiese haber; es la de la unidad neoagarobiosa localizada cerca del punto de enlace señalado por *Karamanos et al.* [23].

CONCLUSIONES

La aplicación de condiciones de cultivo controlado, junto con la disponibilidad de especies bien definidas taxonómicamente, permiten conducir a resultados que puedan establecer la influencia de parámetros como: la intensidad luminosa, la temperatura y el aporte de nutrientes, en la calidad de polímeros glicoconjugados. En nuestro ejemplo práctico, y considerando la presencia novedosa de cadenas laterales simples de 4-O-metil galactosa (4-O-Me-Gal) que modifica la definición del

agar como cadena lineal polimérica, se decidió seguir la evolución de polímeros del agar y su metabolismo, a través de cultivos controlados, y la comparación de su composición química con la de plantas nativas en su estado natural [24]. Otros trabajos efectuados con polisacáridos del tipo agar utilizan la pirólisis acoplada a la cromatografía en fase gas-líquida/espectrometría de masas [25].

Otros estudios muestran los resultados de la separación de aceites esenciales y oleroresinas de especias mexicanas por fluidos supercríticos y cromatografía de gases [26].

También se cita el trabajo traducido al español “El análisis de glicolípidos neutros en sangre de conejo adulto y su función como receptores específicos de microorganismos” [27].

Finalmente se cita también el trabajo traducido al español “Estudio de *Entamoeba histolytica*: un eucarionte con metabolismo del tripanotión en lugar del metabolismo del glutatión” [28].

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Sharon N “*Complex Carbohydrates: their chemistry, Biosynthesis and Functions*”. (Addison-Wesley, New York, 1975)
- [2] Slomiany BL, Slomiany A, Zdebska A, *J. Biol. Chem.*, **257**, 2863 (1984)
- [3] Carlson DM, *J. Biol. Chem.*, **243**, 616 (1968)
- [4] Slomiany BL, Slomiany A, Zdebska A, *J. Biol. Chem.* **259**, 14743 (1984)
- [5] Albersheim P, Nevins DJ, English PD, Kurr A, *Carbohydr. Res.*, **5**, 340 (1967)
- [6] Strecker G, Pierce-Cretel A, Fournet B, Spik G, Montreuil J, *Anal. Biochem.*, **111**, 17226 (1981)
- [7] Kremmer T, Boross L “*Gel Chromatography. Theory. Methodology and Applications*”, Wiley-Interscience, New York, 1979
- [8] Picard JK, Feizi T, *Molecular Immunology*, **20**, 1215 (1983)
- [9] Green ED, Van Halbeek H, Boime I, Baenziger JU, *J. Biol. Chem.* **260**, 15623 (1985)
- [10] Dua VK, Goso K., Dube V.E., Bush C.A. *J. Chromatogr.*, **328**, 259 (1985)
- [11] Daniel PF, DeFeudis DF, Lott IT, McCleu RH, *Carbohydr. Res.*, **97**, 161 (1981)
- [12] Bergh M, Koppen P, Van Den Eijden D, *Carbohydr. Res.*, **94**, 225 (1980)
- [13] Clark PI, Narasimhan S, Williams JM, Clamp JR, *Carbohydr. Res.*, **118**, 147 (1983)
- [14] Rocklin RD, Pohl CA, *J. Liquid Chromatogr.*, **6**, 1577 (1983)
- [15] Olechno JD, Carter SR, Edwards WT, Gillen DG (Dionex Corp., Sunnyvale, California) September-October 1987
- [16] Montreuil JS, Bouquelet H, Debray B, Fournet G, Spik, Strecker G en “*Carbohydrate Analysis: A practical Approach*” (M.F. Chaplin and J. F. Kennedy, eds.), p.143. IRL Press, Oxford, 1986
- [17] Bhatti T, Chambers RE, Clamp JR, *Biochim. Biophys. Acta*, **222**, 339 (1970)
- [18] Fox A, Morgan SL, Gilbert J, en: “*Analysis of Carbohydrates by GLC and MS*” (CJ Biermann y GD McGinnis, editores), p. 87. CRC Press, Boca Raton, FL, 1989
- [19] York WS, Darvill AG, McNeil M, Stevenson TT, Albersheim P “*Methods in Enzymology, Guide to Techniques in Glycobiology*”, **118**, 3 (1994)
- [20] Ondarza M, Karamanos Y, Christiaen D, Stadler T “Variations in the composition of agar polysaccharides from *Gracilaria verrucosa*, cultivated under controlled conditions”, *Food Hydrocolloids*, **1(5/6)**, 507 (1987)
- [21] Sloneker JH “*Gas-liquid chromatography of alditol acetates*” en Whister RL, JN Bemiller. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, **6**, 20 (1972), Academic Press, New York
- [22] Karamanos Y, Ondarza, Morvan M, Stadler HT, Christiaen D “Polysaccharides (Convenors: S Arad y D Christiaen). *Metabolic Implications of 4-Omethyl-L-galactose substitutions on the D-galactose unit in agar polymers*. En Stadler T, J Mollion, MC Verdus, Karamanos Y, H Morvan, D Christiaen (editores).

- Algal Biotechnology, 477. Elsevier Applied Science Publishers Ltd., New York and London, 1988
- [23] Karamanos Y, Ondarza, M, Bellanger F, Christiaen D, Moreau S "The linkage of 4-O-methyl-Lgalactopyranose in the agar polymers from *Gracilaria verrucosa*", *Carbohydr. Res.*, **187**: 93 (1989)
- [24] Ondarza M "Substituciones en la unidad D-Galactosa de polímeros del agar: Implicaciones metabólicas", *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, **42(2)**, 201 (2007)
- [25] Ondarza M Pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry of agar-type polysaccharides from *Gracilaria verrucosa* (Hudson) Papenfuss", *Rev. Latinoamer. Química*, **23/4**, 129 (1995)
- [26] Ondarza M, Sánchez A "Steam distillation and Supercritical fluid extraction of some mexican spices", *Chromatographia*, **30**, 16 (1990)
- [27] Ondarza M, Sotelo F "Neutral glycolipids in adult rabbit blood and analysis of their function as specific receptors for microorganisms", *Biomedical Chromatography*, **10**, 6 (1996)
- [28] Ondarza RN, Tamayo E, Ondarza M et al. "Entamoeba histolytica: a eukaryote with trypanothione metabolism instead of glutathione metabolism", *Biotechnology & Applied Biochemistry*, **30**, 47 (1999)