

Selectividad: criterio de diseño para reacciones complejas

Denia González,^{1*} Gemma Vinent,² María del Carmen Rodríguez,² Mercedes Rodríguez¹

¹ Facultad de Ingeniería Química, Instituto Superior Politécnico "José Antonio Echevarría". Calle 114 No. 11901 e/ Rotonda y Ciclo Vía, Marianao. CP19390, La Habana, Cuba.

² Centro de Química Biomolecular. Calle 21 esq. 200, Rpto. Atabey, Playa, La Habana, Cuba.

email: denia@quimica.cujae.edu.cu

Los gangliósidos son glicoesfingolípidos que se encuentran distribuidos en el organismo de forma diferente. Se ha descrito la presencia del gangliósido N-Glicolil GM3 (NGcGM3) en células tumorales humanas, que lo ha convertido en blanco atractivo para la terapia antitumoral específica. Esta molécula es el componente fundamental de un candidato vacunal contra el cáncer de mama que se encuentra en fase de ensayo clínico. Para la obtención de este gangliósido, mediante síntesis química, un intermedio clave es el aceptor de lactosa. En la síntesis de aceptores de lactosa que se utilizan para formar parte de oligosacáridos y glicoconjugados es necesario la protección de las posiciones 3',4' de lactosa con un grupo isopropilidén. Este trabajo se centra en la reacción de la síntesis del 3',4'-isopropilidén de lactosa, un intermedio en la síntesis del aceptor de lactosa. Se estudió el efecto de la temperatura y el tiempo de reacción sobre la selectividad, encontrándose que en el rango estudiado los mejores resultados se encuentran con el nivel +1 de temperatura y el nivel -1 de tiempo de reacción. Se llevó a cabo la reacción en un reactor de 5 L y se logró reproducir los mejores resultados encontrados en el diseño experimental. La cromatografía de capa delgada semicuantitativa permitió cuantificar las cantidades de los isómeros 3',4'-isopropilidén de lactosa y 4',6'-isopropilidén de lactosa que se obtienen en dicha reacción.

Palabras clave: reacciones múltiples, selectividad, 3',4'-isopropilidén de lactosa.

Introducción

Los gangliósidos son carbohidratos que pertenecen al grupo de los glicoesfingolípidos y se localizan en las células epiteliales que actúan como receptores de virus, bacterias y toxinas (1).

Se ha demostrado que las células tumorales liberan al microambiente moléculas que alteran la presentación antigénica y provocan un impacto negativo sobre la proliferación linfocitaria, lo cual afecta la actividad de las células efectoras (2), tal es el caso de los gangliósidos. Por esta razón se encuentran expresados en mayor concentración en los tejidos cancerosos, en comparación con el resto, lo que posibilita el uso de anticuerpos contra él (3).

Dado las potencialidades como inmunosupresor de los gangliósidos N-Acetil GM3 (NAcGM3) y N-glicolil GM3 (NGcGM3) y su importancia en el desarrollo tumoral, se han convertido en probados blancos terapéuticos (4-7).

El gangliósido que contiene la variante N-glicolilada del ácido siálico (NGcGM3) se encuentra sobreexpresado en las células tumorales del cáncer de mama (8) y melanoma (9), convirtiéndose este en uno de los componentes fundamentales de un candidato vacunal contra estas enfermedades, el cual ha mostrado no solo ser eficaz en modelos animales, sino también ha reportado beneficios clínicos palpables en varios ensayos clínicos conducidos (5).

La obtención de estos gangliósidos mediante la síntesis química resulta favorable, ya que se obtiene como compuesto puro y con una estructura definida. Un intermedio importante en la obtención de esta molécula es el aceptor de lactosa. Para la síntesis de glicoconjugados y oligosacáridos que contengan una unidad de lactosa en su estructura, con frecuencia es necesario proteger las posiciones 3',4' de la unidad de galactosa que forma la lactosa.

En la literatura se encuentra reportada la reacción de protección de estas posiciones con un grupo isopropilidén, del cual se obtiene el 4-O-(3,4-O-isopropilidén-β-D-galactopiranosil)-α,β-D-glucopiranosido (3',4'-isopropilidén de lactosa) (10). Este producto se obtiene mediante la reacción de lactosa con dimetoxipropano (DMP) en presencia de dimetilformamida (DMF) y ácido p-toluensulfónico a una temperatura entre 80 y 85 °C durante 45 min. Como resultado de esta reacción, además del 3',4'-isopropilidén de lactosa se obtiene el isómero 4',6'-isopropilidén de lactosa y los acetales mixtos. Posteriormente, se reporta un procedimiento para la obtención de un aceptor de lactosa en el cual el primer paso es la obtención del 3',4'-isopropilidén de lactosa, y se utiliza la metodología descrita (11).

En los dos trabajos mencionados anteriormente, la separación de 3',4'-isopropilidén de lactosa de los productos colaterales consume gran cantidad de tiempo y de reactivos muy costosos que, además, tienen uso limitado a escalas

* Ingeniera Química, Máster en Análisis y Control de Procesos.

superiores. Como la mejor forma de separar el producto deseado del indeseado es producir la menor cantidad posible de este último (12), en este trabajo se analiza el efecto de los tiempos de reacción y la temperatura sobre la reacción del 3',4'-isopropilidén de lactosa.

Materiales y Métodos

Reacción de obtención de 3',4'-isopropilidén de lactosa

La reacción se llevó a cabo en un reactor enchaquetado de 13 mL de volumen efectivo, con condensador, termómetro, agitación magnética y agua, como medio de calentamiento. Se partió de la lactosa anhidra (1 g) y se agitó a temperatura de 80-85 °C en DMF (10 mL). Se adicionó ácido p-toluensulfónico monohidratado (10 mg) y luego DMP (0,84 mL); este último se adicionó en tres porciones de 0,28 mL cada una a intervalo de 5 min. La lactosa se disolvió de forma gradual en aproximadamente 30 min y se dejó por un tiempo adicional de 15 min.

El curso de la reacción se chequeó por cromatografía de capa delgada (CCD), la cual se corrió en un sistema de disolventes: cloroformo, metanol en proporción 2:1. En la misma se obtienen dos manchas con $R_f \sim 0,3$ que corresponden a 3',4' y 4',6'-isopropilidén de lactosa: una mancha en el punto de aplicación de $R_f \sim 0,1$ que corresponde a la lactosa que no reacciona y manchas de R_f entre 0,6 y 0,9 que representan acetales mixtos que se forman. Concluido el tiempo de reacción se retira el calentamiento, se espera a que se alcance temperatura ambiente y se adiciona trietilamina hasta pH = 7 (0,2 mL). Una vez neutralizada la reacción se procede a eliminar por rotoevaporación la mezcla de disolventes (10).

Plan experimental

Con el objetivo de evaluar el efecto de la temperatura y el tiempo de reacción en la obtención de 3',4'-isopropilidén de lactosa se realizó un plan factorial 22, con un punto central y una réplica en cada punto. Como niveles inferiores para las variables a estudiar se fijaron los establecidos (8) a 80 °C y 45 min.

Como variable de respuesta se utilizó la selectividad, que se define según Levenspiel O (13) como:

$$\eta = \text{Selectividad} = \frac{\text{Cantidad de 3',4'-isopropilidén de lactosa}}{\text{Cantidad de 4',6'-isopropilidén de lactosa}}$$

Para cuantificar las cantidades de 3',4' y 4',6'-isopropilidén de lactosa, se utilizó la cromatografía de capa delgada semicuantitativa de manera conjunta con la densitometría.

Determinación de las condiciones de operación en un reactor de 5 L

Para corroborar estos resultados se llevó a cabo la reacción en un reactor de 5 L provisto de una agitación mecánica.

Para seleccionar el tipo de impelente se tuvo en cuenta la viscosidad de los reactivos y las características del sistema reaccionante, para el cual se recomienda usar impelentes tipo turbinas con cuchillas a 45° (14). Para establecer la velocidad de agitación se utiliza el procedimiento descrito (15).

Análisis estadístico

Los resultados se analizaron con la ayuda del Statgraphics 5.1. Se muestra el análisis de regresión, donde la variable dependiente es la selectividad y las variables independientes son: la temperatura, el tiempo y la interacción tiempo-temperatura. Los valores $p < 0,05$ se consideraron significativos.

Resultados

Plan experimental

Los resultados del plan experimental y los valores de selectividad obtenidos en cada caso aparecen en la Tabla 1. El efecto de la temperatura y el tiempo de reacción sobre la selectividad se muestra en la Figura 1. Puede decirse que en el intervalo estudiado la selectividad aumenta con la disminución del tiempo de reacción y con el incremento de la temperatura; pero este último efecto es menos marcado en la medida que se aumenta el tiempo de reacción.

En la Tabla 2 se muestra que los coeficientes del modelo son estadísticamente significativos ($p < 0,05$). El modelo reporta buena calidad de ajuste, lo que se evidencia en la Tabla 3, donde se obtuvo una Razón-F mayor que el requerido, para un 95% de confiabilidad que se manifiesta en valor-p que se muestra en esta misma tabla. Puede considerarse que el modelo ajustado es adecuado ($R^2 = 97,3252\%$). Además, puede afirmarse que los residuos del modelo son independientes, lo que se corrobora con el valor del estadígrafo Durbin-Watson ($p > 0,5$).

Según los resultados brindados por el análisis estadístico las dos variables estudiadas, así como su interacción, son significativas. Esto corrobora las observaciones realizadas (Fig. 1) que

Tabla 1. Efecto de la temperatura y el tiempo de reacción sobre la selectividad.

Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Masa (µg)		Selectividad
		3',4'-isopropilidén	4',6'-isopropilidén	
-1	-1	6,574	5,093	1,291
		8,929	5,942	1,503
-1	1	5,616	4,36	1,288
		4,245	4,916	0,864
0	0	8,670	3,722	2,329
		9,733	4,469	2,178
1	-1	4,282	0,564	7,592
		2,735	0,637	4,294
1	1	4,489	2,189	2,051
		5,818	2,787	2,051

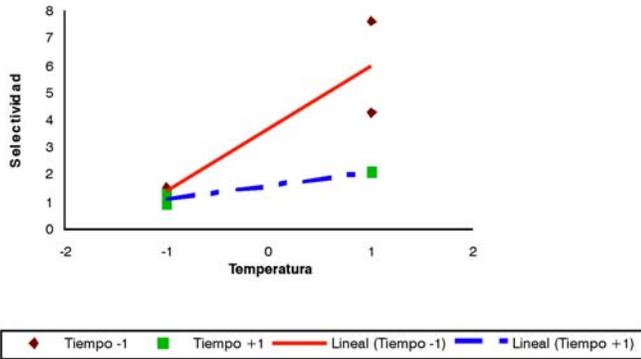


Fig. 1. Efecto de la temperatura y el tiempo de reacción sobre la selectividad.

Tabla 2. Análisis de regresión múltiple.

Parámetro	Estimación	Error Estándar	Estadístico T	Valor-P
CONSTANTE	-103,367	13,6835	-7,55411	0,0003
Temperatura	1,31997	0,155814	8,47143	0,0001
Tiempo	1,65021	0,258023	6,39561	0,0007
Tiempo-Temperatura	-0,0208956	0,00293806	-7,11204	0,0004

muestran el efecto de la temperatura y el tiempo de reacción sobre la selectividad. Con las mejores condiciones encontradas disminuyó la cantidad del isómero 4',6'-isopropilidén de lactosa, el cual constituye una impureza de la reacción. Una muestra de esto es que la selectividad aumentó desde valores alrededor de 2 con el procedimiento establecido hasta valores entre 4 y 7 con las condiciones propuestas. De esta forma se obtendrán las menores cantidades de producto no deseado y se facilitarán los pasos de purificación del crudo de reacción requeridos para la obtención del 3',4'-isopropilidén de lactosa.

Resultados obtenidos en el reactor de 5 L

Para realizar la reacción en un reactor de 5 L con agitación mecánica, se tomaron las mejores condiciones alcanzadas en el diseño experimental: nivel 1 de temperatura y -1 de tiempo, ya que con estas se alcanzaron los mayores valores de selectividad.

En el trabajo previo realizado la agitación era magnética, así que para el establecimiento de la velocidad del impelente mecánico se siguió el procedimiento señalado en Materiales y Métodos. Se seleccionó una intensidad de agitación 1-2, que

Tabla 3. Análisis de Varianza.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	47,7019	3	15,9006	72,77	0,0000
Residuo	1,31101	6	0,218502		
Total (Corr.)	49,0129	9			

$R^2 = 97,3252\%$
 Estadístico Durbin-Watson = 1,26359 ($p = 0,2155$).

corresponde a una velocidad del fluido de (0,03048-0,06096 m/s), para lo cual la velocidad del impelente debía ser de 400 rpm.

Se alcanzó un valor de 5,549 que se encuentra dentro del intervalo de los resultados obtenidos en el reactor de 13 mL y agitación magnética, ya que en estas condiciones la selectividad osciló entre 7,592 y 4,294.

Con este resultado se confirma que el método seguido para el establecimiento de las condiciones de operación en el reactor de 5 L resultó adecuado, lo que contribuyó a tener cantidades suficientes del producto para continuar los ensayos clínicos de este candidato vacunal.

Se determinó que en el intervalo estudiado un aumento de la temperatura y una disminución del tiempo de reacción incrementa en más de dos veces la selectividad del producto de interés. Por eso las mejores condiciones de operación halladas fueron la reacción al nivel +1 de temperatura y el nivel -1 de tiempo de reacción.

Referencias

- Fraser-Reid BO, Taksuta K, Thieme J. Glycoscience. Chemistry and Chemical Biology. Berlín: Springer; 2001.
- Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. Annual Review of Immunology 2004;22:329-60.
- Oliva JP. Clinical evidences of GM3 (NeuGc) ganglioside expression in human breast cancer using 14f7 monoclonal antibody labeled with 99mTc. Breast cancer Research and Treatment 2006;92(2):115-21.
- De León J, Fernández A, Clavell M, López A, Labrada M, Bebelagua Y, et al. La variante N-glicolilada del gangliósido GM3 en la biología de los tumores: un blanco atractivo para la inmunoterapia del cáncer. Biotecnología Aplicada 2008;25(2):161-5.
- Mulens V, Marinello P, Carr A, Mazorra Z, Fernández LE. Gangliósidos en la Biología e Inmunoterapia del Cáncer: la Experiencia Cubana. Cancerología 2009;13(4):155-67.
- Blanco R, Quintana Y, Blanco D, Cedeño M, Rengifo E, Frómata M, et al. Tissue Reactivity of the 14F7 Mab Raised against N-Glycolyl GM3 Ganglioside in Tumors of Neuroectodermal, Mesodermal, and Epithelial Origin. Journal of Biomarkers 2013. (2013):1-9. Consultado en: doi.org/10.1155/2013/602417
- Blanco R, Rengifo ChE, Cedeño M, Frómata M, Rengifo E, Carr A. Immunoreactivity of the 14F7 Mab (Raised against

- N-Glycolyl GM3 Ganglioside) as a positive prognostic factor in non-small-cell lung cancer. *Pathology Research International* 2012; 2012:1-12. Disponible en: <http://www.hindawi.com/journals/pri/2012/235418/>
- Marquina G, Waki H, Fernández LE, Carr A, Valiente O. Gangliosides expressed in human breast cancer. *Cancer Research* 1996;56(22):5165-71.
 - Carr A, Mulet A, Mazorra Z, Vázquez AM, Alfonso M, Mesa C, et al. A mouse IgG1 monoclonal antibody specific for N-glycolyl GM3 ganglioside recognized breast and melanoma tumors. *Hybridoma* 2000;19(3):241-7.
 - Baer HH, Abbas SA. Synthesis of O- α -L-fucopyranosyl-(1-3)-O- β -D-galactopyranosyl-(1-4)-D-glucose(3'-O- α -L-fucopyranosyllactose), and an improved route to its β -(1'-3')-linked isomer. *Carbohydrate Research* 1980;84(2):53-60.
 - Duclos RI. The total synthesis of ganglioside GM3. *Carbohydrate Research* 2000;328(4):489-507.
 - Turner C. *Modern Extraction Tecnics*. Washington: American Chemical Society; 2006.
 - Levenspiel O. *Chemical Reaction Engineering*. New York: John Wiley Sons; 1999.
 - McCabe WL, Smith CJ. *Operaciones Básicas en Ingeniería Química*. New York: McGraw Hill; 2002.
 - Hicks RW, Morton JR, Fenic JG. How to design agitators for desired process response. *Chemical Engineering* 1976;83(7):102-10.

Selectivity: design criterion for complex reactions

Abstract

The gangliosides are glycosphingolipids that are distributed in the organism in different forms. The presence of the ganglioside N-Glycolil GM3 (NGcGM3) has been described in human tumoral cells, that is why it has become an attractive target for the specific antitumoral therapy. This molecule is the main component of the vaccine candidate for breast cancer in clinical trials phase. Lactose acceptor is a key intermediate to obtain this ganglioside by chemical synthesis, the protection of the positions 3',4' of lactose with an isopropiliden group is necessary in the synthesis of lactose acceptors that will be used to form part of oligosaccharides and glycoconjugates. This work is focused in the reaction to obtain 3',4'-lactose-isopropiliden, an intermediate in lactose acceptor synthesis. The reaction conditions were studied and the best results were found working at +1 level of temperature and -1 level of time reaction. The reaction was made in a 5 L reactor and the results were reproducible. The thin layer semi-quantitative chromatography was chosen to quantify the amount of the isomers 3',4' and 4',6'-lactose isopropiliden obtained in the reaction.

Key words: multiple reactions, selectivity, 3',4'-lactose-isopropiliden.

Recibido: Marzo de 2013

Aceptado: Mayo de 2013