

Estudio cinético de la reacción de formación de 3',4'-*O*-isopropiliden- α,β -lactosa

Maryeris Espinosa-Morales, Denia González-León*, Maydit Márquez-Osorio, Yulianela Ibarra-Reyes y José Alberto Ruiz-García.

Centro de Química Biomolecular, Calle 200 y Avenida 21, Atabey, Playa. Apartado Postal 16042. La Habana, Cuba. jose.ruiz@cqb.cu *Instituto Superior Politécnico José Antonio Echeverría, La Habana, Cuba.

Recibido: 13 de septiembre de 2012.

Aceptado: 13 de febrero de 2013.

Palabras clave: lactosa, isopropilidén, gangliósidos, estudio cinético.

Key words: lactose, isopropylidene, gangliosides, kinetic study.

RESUMEN. Los gangliósidos son carbohidratos complejos enlazados covalentemente a lípidos (glicolípidos), los cuales se encuentran en gran concentración en varios tipos de carcinomas y en menor concentración en tejido sano, por lo que son objeto de investigación como componentes fundamentales de vacunas terapéuticas. El gangliósido *N*-glicolil GM₃ es uno de los principales componentes de la vacuna para el tratamiento del cáncer de mama. Este gangliósido está formado por una unidad de ácido siálico *N*-glicolilado, otra de lactosa enlazada a una ceramida. En su síntesis un intermedio clave es el aceptor de lactosa. El presente trabajo se centró en la obtención del 3',4'-*O*-isopropilidén- α,β -lactosa, que constituye la primera etapa del esquema de síntesis del aceptor. En esta reacción, además de formarse el isómero de interés, se obtienen varios productos colaterales como el 4',6'-*O*-isopropilidén- α,β -lactosa y los acetales mixtos. El objetivo de este trabajo consistió en realizar un estudio cinético de la reacción y determinar el efecto de las variables temperatura, tiempo y forma de adición del dimetoxipropano (DMP) sobre la formación de los isómeros 3',4' y 4',6'-*O*-isopropilidén- α,β -lactosa con la finalidad de encontrar las condiciones de reacción más favorables para la obtención del compuesto de interés. Mediante un diseño experimental se demostró que la mayor concentración de 3',4'-*O*-isopropilidén- α,β -lactosa se logra cuando la reacción se lleva a cabo a 95 °C durante 45 min con la adición del DMP de una sola vez.

ABSTRACT. Gangliosides are complex carbohydrates covalently linked to lipids (glycolipids), which are found in high concentrations in several types of carcinomas and in lower concentrations in healthy tissue, so that they are under investigation as essential components of therapeutic vaccines. The ganglioside *N*-glycolyl GM₃ is a major component of the vaccine for the treatment of breast cancer. This ganglioside is formed by a unit of *N*-glycolylated sialic acid, a lactose unit linked to a ceramide and a key intermediate of its synthesis is the acceptor lactose. This work is focused on obtaining 3',4'-*O*-isopropylidene- α,β -lactose, the first stage of the synthesis scheme of the acceptor. In this reaction, besides forming the isomer of interest, are obtained several side products such as 4',6'-*O*-isopropylidene- α,β -lactose and mixed acetals, so that the objectives of this work were the study of the kinetics of the reaction and determining the effect of the variables temperature, time and way of addition of dimethoxypropane (DMP) on the formation of isomers 3',4' and 4',6'-*O*-isopropylidene- α,β -lactose in order to find the most suitable reaction conditions for obtaining the compound of interest. By performing an experimental design, it was demonstrated that the highest concentration of 3',4'-*O*-isopropylidene- α,β -lactose is achieved when the reaction is carried out at 95 °C, for 45 min. and adding once the DMP.

INTRODUCCIÓN

Los gangliósidos son carbohidratos complejos enlazados covalentemente a lípidos (glicolípidos), los cuales se encuentran en gran concentración en varios tipos de carcinomas y en menor concentración en tejido sano, por lo que son objeto de investigación como componentes fundamentales de vacunas terapéuticas.¹⁻³ El gangliósido *N*-glicolil GM₃ es uno de los componentes fundamentales de la vacuna para el tratamiento del cáncer de mama.⁴ Este gangliósido está formado por una unidad de ácido siálico *N*-glicolilado (donante) y una unidad de lactosa (aceptor) enlazada a una ceramida. El aceptor de lactosa es un intermedio clave para la síntesis de dicho gangliósido.

La ruta de síntesis descrita para la obtención de dicho aceptor consta de tres reacciones químicas y un paso de purificación.⁵ El trabajo se centra en la obtención del 3',4'-*O*-isopropilidén- α β -lactosa (II), que constituye la primera etapa del esquema de síntesis del aceptor. En esta reacción, además de formarse el isómero de interés, se obtienen varios productos colaterales como el 4',6'-*O*-isopropilidén- α , β -lactosa (III) y los acetales mixtos (Fig. 1).

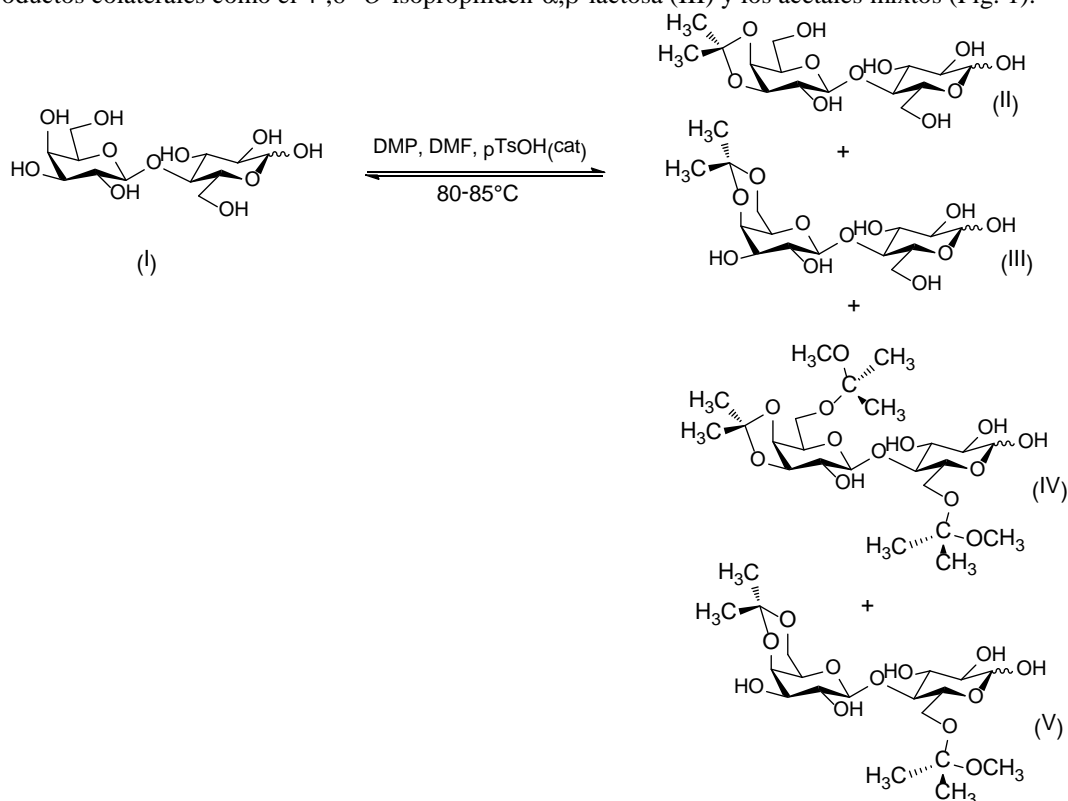


Fig. 1. Esquema general de síntesis del 3',4'-*O*-isopropilidén- α β -lactosa (II). Lactosa (I) sin reaccionar, 4',6'-*O*-isopropilidén- α , β -lactosa (III), acetales mixtos (IV) y (V), productos colaterales que se forman.

Baer y cols describen la obtención de II como producto mayoritario cuando reacciona lactosa (I) con dimetoxipropano (DMP) y ácido *p*-toluensulfónico (*p*-TsOH) como catalizador a temperatura entre 80 y 85 °C.⁶ En este caso, además de quedar lactosa sin reaccionar, también se obtienen los productos colaterales III, IV y V, (Fig. 1), lo que dificulta el proceso de purificación del producto principal (II).

El objetivo del trabajo consistió estudiar la influencia de la temperatura, tiempo y forma de adición del DMP en la reacción de obtención de II a partir de I mediante la realización de un diseño experimental factorial 2³ y, de esta manera, obtener las menores concentraciones del isómero III no deseado y las mayores concentraciones del producto de interés, II. En este procedimiento, se sustituye el ácido *p*-toluensulfónico (*p*-TsOH) por ácido metanosulfónico (MSA), por ser este último más estable y de más fácil manipulación en Cuba por la humedad relativa. Por último, los cambios a introducir persiguen el desarrollo de un procedimiento que sea más sencillo y factible de llevar a una escala productiva superior.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los reactivos y disolventes empleados fueron de calidad para síntesis (Merck). Los patrones de lactosa (I), 3',4'-*O*-isopropilidén- α , β -lactosa (II) y 4',6'-*O*-isopropilidén- α , β -lactosa (III), fueron obtenidos en el laboratorio y purificados por cromatografía de columna una pureza mayor del 99 %, determinada por RMN ¹H.

El proceso de síntesis se controló por cromatografía de capa delgada, en la que se emplearon placas pre-elaboradas de gel de sílice 60 GF₂₅₄ (Merck) de 0,1 mm de espesor. El sistema de disolventes que se utilizó fue acetato de etilo: 2-

propanol: agua (3 : 2 : 1). Los cromatogramas se visualizaron por tratamiento con una disolución de ácido sulfúrico a 5 % en etanol seguido por calentamiento a 105 °C durante 5 min.

La determinación cuantitativa de los productos se realizó por cromatografía de capa delgada de alta definición (HPTLC), mediante la aplicación semiautomática de las muestras con un equipo LINOMAT IV. La lectura de las placas se realizó en un equipo TLC Scanner II con la ayuda del programa BIOCROM.

Procedimiento para la obtención del 3',4'-*O*-isopropilidén- α,β -lactosa (II)

En un reactor enchaquetado de 100 mL provisto de un agitador magnético, se adicionan 2 g (5,6 mmol) de lactosa monohidrato, 20 mL de DMF previamente desaminada y con una humedad menor a un 0,1 %. Se calienta a 95 °C, para adicionar ácido metanosulfónico (6,4 mmol) y luego DMP (1,7 mmol) a intervalos de cinco minutos. La mezcla de reacción se agita por 45 min a la misma temperatura y posteriormente, se detiene la reacción por adición de trietilamina (0,4 mL; 2,9 mmol) y se evapora el disolvente bajo presión reducida. La tabla muestra el plan factorial empleado.

Tabla 1. Plan factorial para determinar la influencia de las variables en la reacción.

Experimento	Adición de DMP		Temperatura (° C)		Tiempo (min)	
1	Cada 5 min	1	95	1	45	-1
2	Cada 5 min	1	95	1	60	1
3	Cada 5 min	1	80	-1	45	-1
4	Cada 5 min	1	80	-1	60	1
5	De una vez	-1	95	1	45	-1
6	De una vez	-1	95	1	60	1
7	De una vez	-1	80	-1	45	-1
8	De una vez	-1	80	-1	60	1

DMP Dimetoxipropano

Cada experimento fue realizado por duplicado.

Estudio cinético

Para realizar el estudio cinético y determinar las mejores condiciones para obtener la mejor relación entre los dos isómeros, el 3',4' y el 4',6'-*O*-isopropilidén- α,β -lactosa, se sigue el procedimiento antes descrito. Se fija un intervalo de tiempo de reacción cada 5 min. entre las tres adiciones del DMP. Posteriormente, se establece un intervalo de tiempo de 10 min entre las corridas restantes hasta un tiempo máximo de reacción de 60 min. Posteriormente, se detiene la reacción a los diferentes tiempos por adición de trietilamina y el disolvente se evapora bajo presión reducida.

Las muestras se preparan disolviendo el producto crudo en agua hasta un volumen de 100 mL. De esta disolución, se toma una alícuota de 2 mL y se diluye hasta 10 mL.

Se preparan disoluciones patrones de (I) 5,6 $\mu\text{mol/mL}$; (II) 10,5 $\mu\text{mol/mL}$; (III) 7,9 $\mu\text{mol/mL}$.

Con posterioridad, se diluyen a la mitad, tanto las muestras como los patrones, para realizar la cuantificación por HPTLC. Para ello, se aplican en una placa de HPTLC con un tamaño de 20 cm x 10 cm recubierta con gel de sílice 60 F₂₅₄ (Merck) con un equipo de aplicación semiautomática IV de Camag.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los carbohidratos se caracterizan por la presencia de varios grupos hidroxilo de similar reactividad. Por tanto, para llevar a cabo reacciones en los grupos de interés se necesita proteger simultáneamente en ocasiones, a estos sistemas dioles mediante el empleo de acetales cíclicos. En este sentido, los acetales del tipo isopropilidén constituyen uno de los grupos más empleados por su versatilidad. Estos acetales se introducen bajo condiciones de equilibrio en las que se forman tanto anillos 1,3-dioxanos como 1,3-dioxolanos.⁷ Se plantea que, para este tipo de acetales cíclicos⁸, el anillo de cinco miembros (dioxolano) es más estable que el de seis miembros (dioxano).

En este caso, el isómero no deseado, (el 4',6'-*O*-isopropilidén- α,β -lactosa (III)) (Fig.1), es más inestable debido a que su estructura la constituye un anillo de seis miembros (dioxano) en el cual uno de los grupos metilo ubicado en posición 2 en relación con la conformación de silla formada, adopta una orientación axial, lo cual provoca interacciones 1,3-diaxiales que hacen de esta estructura la más desfavorecida energéticamente. El 3',4'-*O*-isopropilidén- α,β -lactosa (II) producto mayoritario es energéticamente más estable, pues en este caso, se forma un anillo de cinco miembros en el cual los sustituyentes adoptan orientaciones cuasi-axiales y cuasi-ecuatoriales.

En el estudio realizado, se pudo apreciar que a los 10 min de añadir el DMP se observó una mayor concentración del isómero 3',4' (II) que del isómero 4',6' (III) (Fig. 2). Esto demuestra que existe influencia de la temperatura en el orden y formación de los isómeros, es decir, que a 95 °C se favorece la formación de II (producto más estable) a pesar de que III es el favorecido cinéticamente.

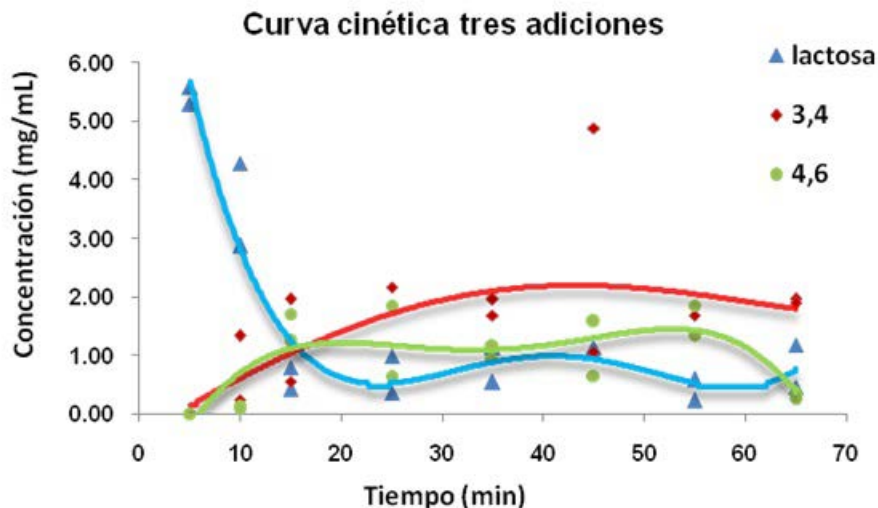


Fig. 2. Curva cinética para la obtención de 4',6' y 3',4'-O-isopropilidén- α,β -lactosa a partir de lactosa a 95 °C y adición a intervalos del DMP.

Al llevar a cabo la reacción, se pudo apreciar que existe una mayor dispersión en la concentración de los isómeros II y III en el tiempo que en el compuesto de partida (lactosa), la cual disminuye todo el tiempo hasta que permanece constante a partir de los 45 min en que se establece el equilibrio.

Teniendo en cuenta la conducta de los productos de la reacción bajo las condiciones establecidas, se decidió realizar un diseño experimental factorial 2³ y de esta forma, determinar la influencia de las variables: tiempo, temperatura y forma de adición del DMP sobre la concentración de esos productos (Tabla 2).

Tabla 2. Resultados del diseño experimental factorial 2³.

Temperatura (°C)	Tiempo (min)	FA (en porciones)	Concentración 3',4' (II) (mg/mL)	Concentración 4',6' (III) (mg/mL)
80	45	3	0,65	1,07
80	45	1	1,78	0,57
80	60	3	0,54	1,53
80	60	1	0,99	0,70
95	45	3	3,31	0,98
95	45	1	2,66	0,17
95	60	3	2,50	0,42
95	60	1	2,46	0,17

FA Forma de adición 3 indica que se añadió el DMP en tres porciones a intervalos de 5 min; 1 indica que se adicionó todo el DMP de una sola vez.

Con este análisis, se determinó que a 95 °C se obtienen las mayores concentraciones del producto deseado y con la adición del DMP en tres porciones, se obtienen también elevados rendimientos de él. La concentración del isómero III se ve afectada cuando se incrementa la temperatura y se adiciona el DMP de una vez.

El análisis del efecto de cada una de las variables estudiadas sobre la concentración del 3',4' y 4',6'-isopropilidén de lactosa se evidenció mediante los gráficos de Pareto con el empleo del programa Statgrafics 5.1 (Figuras 3 y 4).

Para el caso de la concentración de 3',4'-O-isopropilidén- α,β -lactosa (II) el análisis estadístico arrojó que la variable significativa es la temperatura, con efecto positivo por lo que se obtiene la mayor concentración de este isómero cuando la reacción se lleva a cabo a 95 °C.

Gráfico de Pareto estandarizado para la concentración del 3',4'-isopropilidén de lactosa

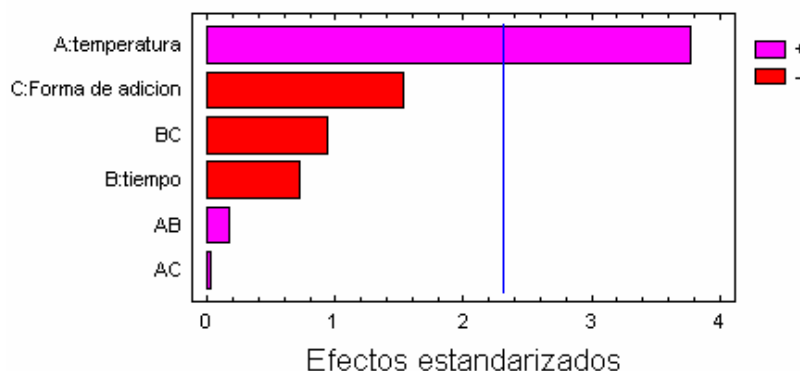


Fig. 3. Significación de la temperatura, el tiempo de reacción y la forma de adición del DMP sobre la concentración del 3',4'-*O*-isopropilidén- α,β -lactosa (II).

El polinomio ajustado para el efecto de la variable que resultó significativa sobre la concentración del 3',4'-*O*-isopropilidén- α,β -lactosa es el siguiente:

$$\text{Concentración} = -9,14141 + 0,12657 \text{ Temperatura}$$

Gráfico de Pareto estandarizado para la concentración del 4',6'-isopropilidén de lactosa

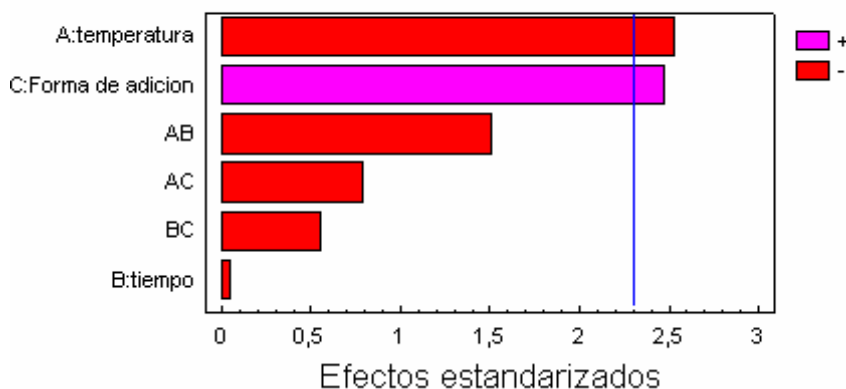


Fig. 4. Significación de la temperatura, el tiempo de reacción y la forma de adición del DMP sobre la concentración del 4',6'-*O*-isopropilidén- α,β -lactosa (III).

En el caso de la concentración del 4',6'-*O*-isopropilidén- α,β -lactosa (III) resultaron significativas las variables temperatura y forma de adición del dimetoxipropano. La temperatura tuvo un efecto negativo y como el objetivo es obtener la menor concentración posible de este isómero, se debe trabajar en el mayor nivel de temperatura estudiado (95 °C). Mientras que la forma de adición del DMP tiene un efecto positivo.

El polinomio ajustado para el efecto de las variables que resultaron significativas sobre la concentración del 4',6'-*O*-isopropilidén- α,β -lactosa, es el siguiente:

$$\text{Concentración} = 3,222\ 85 - 0,034\ 499\ 4 \text{ Temperatura} + 0,2524\ 4 \text{ FA}$$

Para determinar la influencia de las variables temperatura, tiempo y forma de adición del DMP sobre ambos productos de la reacción simultáneamente se realizó un análisis estadístico multivariable con ayuda del programa Statgrafics 5.1. Se obtuvieron los valores óptimos globales de las variables analizadas (Tabla 3).

Tabla 3. Condiciones óptimas de las variables estudiadas.

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Temperatura (°C)	80	95	95
Tiempo (min)	45	60	45
Forma de adición	1	3	1

Las condiciones óptimas encontradas para obtener la mayor concentración de **II** y la menor de su isómero no deseado (**III**), resultaron tiempo de reacción: 45 min; temperatura; 95 °C y adición del DMP de una sola vez.

El aumento que se alcanza de la diferencia en la concentración de ambos isómeros, contribuye de forma cuantitativa al mejoramiento del proceso de separación de los dos isómeros mediante un proceso de cristalización sin necesidad de llevar a cabo purificaciones más complejas. Esto facilita la obtención del isómero de interés a mayor escala en un periodo relativamente corto de tiempo y con menos gasto de disolvente.

CONCLUSIONES

El estudio cinético de la reacción de formación estudiada se demostró que a pesar de ser el 4',6'-*O*-isopropilidén- α,β -lactosa (**III**) el isómero más favorecido cinéticamente, con un aumento de la temperatura a 95 °C, desde del inicio de la reacción, se forma en mayor concentración el 3',4'-*O*-isopropilidén- α,β -lactosa (**II**) isómero termodinámicamente más estable que el anterior. Asimismo, también se demostró que la adición la cantidad del dimetoxipropano de una sola vez, permite obtener con una diferencia apreciable esos isómeros de la reacción.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kregel U, Olsson LL, Martínez C, Talavera A, Rojas G, Mier E, *et al.* Structure and Molecular Interactions of a Unique Antitumor Antibody Specific for *N*-Glycolyl GM₃. *J Biol Chem.* 2004; 279(7):5597-98.
2. Irie RF, Morton DL. Membrane antigen common to human cancer and fetal calf brain. *Cancer Research.* 1976; (36):3510-12.
3. Livingston PO, Zhang S, Lloyd KO. Carbohydrate vaccines that induce antibodies against cancer. *Cancer Immunology Immunotherapy.* 1997; 45(1):1-9.
4. Oliva JP, Valdés Z, Casacó A, Pimentel G, González J, Alvarez I, *et al.* Clinical evidences of GM₃ (NeuGc) ganglioside expression in human breast cancer using the 14F7 monoclonal antibody labelled with 99mTc. *Breast Cancer Research and Treatment.* 2006; 96(2):115-21.
5. Duclos RI. The total synthesis of ganglioside GM3. *Carbohydrate Research.* 2000; (328): 489-507.
6. 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. *Carbohydrates Research.* 1980; (84):53-60.
7. Stick RV. *Carbohydrates: the sweet molecules of life.* Great Britain: Edition MPG Books Ltd, Bodmin; 2001: p.50-55.
8. Boons GJ, Hale KH. *Organic Synthesis with carbohydrates.* England: Ed, Sheffield Academic Press; 2000: p.43-45.