

Purificación de la mezcla de los isómeros 3',4' y 4',6' isopropilidén de la lactosa

Purification of the mixture of the isomers 3', 4' and 4', 6' lactose isopropyliden

Denia González León^a, Liber Mesa Ramos^a, Idalis Vázquez Madera^a, Yasmani Valdespino Tesillo^a, Mercedes Rodríguez Edreira^a, José Ruíz García^b

^a Facultad de Ingeniería Química, Universidad Tecnológica de La Habana José Antonio Echevarría. <https://orcid.org/0000-0002-8493-5174>.

^a Facultad de Ingeniería Química, Universidad Tecnológica de La Habana José Antonio Echevarría. <https://orcid.org/0000-0003-1750-9332>.

^a Facultad de Ingeniería Química, Universidad Tecnológica de La Habana José Antonio Echevarría. <https://orcid.org/0000-0002-0297-1316>.

^a Facultad de Ingeniería Química, Universidad Tecnológica de La Habana José Antonio Echevarría. <https://orcid.org/0000-0002-9828-3998>.

^a Facultad de Ingeniería Química, Universidad Tecnológica de La Habana José Antonio Echevarría. <https://orcid.org/0000-0002-7934-9015>.

^b Instituto Finlay de Vacunas. <https://orcid.org/0000-0003-3522-3418>.

Recibido: 19 de agosto de 2020;

Aceptado: 02 de marzo de 2021;

RESUMEN

En la síntesis de aceptores de lactosa que serán utilizados para formar parte de oligosacáridos y glicoconjugados, es necesario la protección de las posiciones 3',4' de la lactosa con grupo isopropilidén. En la reacción química de protección de estas posiciones se obtienen varios productos colaterales que son necesarios separar del isómero de interés. Se ha reportado la realización de dos purificaciones en columna cromatográfica y una cristalización final. El presente trabajo propone la sustitución de la primera purificación cromatográfica por dos extracciones: una líquido-líquido y una líquido-sólido. Además, se realizó un diseño de experimento para determinar las mejores condiciones en las dos extracciones. En la extracción líquido-líquido se utilizó como disolvente diclorometano con una relación entre el disolvente orgánico y la fase acuosa en el nivel +1, una velocidad de agitación en el nivel +1 y se repitió la operación ocho veces. En la extracción líquido-sólido se utilizó como disolvente acetona con una relación líquido-sólido en el nivel +1, una velocidad de agitación en el nivel -1 y la operación se repitió 12 veces. Se comparó el método de purificación de la literatura y la propuesta realizada y en ambos se obtienen cantidades similares de la mezcla de los isómeros 3',4' y 4',6' isopropilidén de lactosa, pero en la propuesta se alcanza en un tiempo menor y con una notable reducción del consumo de reactivos.

Palabras claves: extracción líquido-sólido, 3',4'-isopropilidén and de lactosa, extracción líquido-líquido.

ABSTRACT

In the synthesis of lactose acceptor that will be used to take part of oligosacarides and glicoconjugate it is necessary the protection of the 3',4' lactose positions with the isopropylidene group. In the chemical reaction, several collateral products are also obtained that must be separated from the isomer of interest. Two chromatographic column purifications and one final crystallization have been reported. In this work, the first chromatographic purification is replaced by two extractions: one liquid-liquid and one solid-liquid. Besides, an experimental design was also made to identify the best operation conditions for the extractions. In the liquid-liquid extraction dichloromethane was used with a liquid-liquid ratio at level +1 and a stirring speed at level +1. The operation was repeated eight times. In the solid-liquid extraction, acetone was used with a liquid-solid ratio at level +1 and a stirring speed at level -1. The operation was repeated 12 times. The purification method described in the literature and the method proposed in the present work were compared, and both obtained similar amounts of the mixture of the 3', 4' and 4', 6' isopropylidene lactose isomers. Following the proposed method, the results are obtained in a shorter time and with a notable reduction in the consumption of reagents.

Keywords: liquid-solid extraction, 3', 4'-isopropylidene and lactose, liquid-liquid extraction.

INTRODUCCION

Los gangliósidos son carbohidratos que pertenecen al grupo de los glicoesfingolípidos, que participan en una gran variedad de eventos biológicos que ocurren en las células epiteliales de los vertebrados (Pilco *et al*, 2019; Blanco *et al*, 2015; Shimizu *et al*, 2020). Se ha demostrado que, durante la transformación maligna de la célula, la composición de los gangliósidos cambia cuantitativa y cualitativamente (Pilco *et al*, 2019; Blanco *et al*, 2015; González *et al*, 2016). 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 (Gentilini *et al*, 2016; González *et al*, 2018; Zheng *et al*, 2019).

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 (Zheng *et al*, 2020; Dorvignit *et al*, 2019; Uskent *et al*, 2020; Bjerregaard *et al*, 2020; Mulens *et al*, 2009). El gangliósido que contiene la variante N-glicolilada del ácido siálico (NGcGM3) se encuentra sobreexpresado en las células tumorales del cáncer de mama y melanoma (Bjerregaard *et al*, 2020), 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 (Mulens *et al*, 2009).

Los gangliósidos NGcGM3y NAcGM3 pueden obtenerse por extracción y purificación de fuentes naturales (eritrocitos de caballo y de perro). La producción de estas moléculas por esta vía se ve limitada por su fuente de procedencia y porque, además, existen regulaciones internacionales muy estrictas para la comercialización de productos provenientes de este tipo de fuente, pues se corre el riesgo de arrastrar contaminantes biológicos, por lo que la obtención de estos gangliósidos mediante la síntesis química resulta favorable, ya que se obtiene como compuesto puro y con una estructura definida (Espinosa *et al*, 2013). 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 (Zheng *et al*, 2019).

En la literatura se encuentra reportada la reacción de protección de estas posiciones con un grupo isopropilidén, de la cual se obtiene el 4-O-(3,4-O-isopropilidén-β-D-galactopiranosil)-α,β-D-glucopiranosido (3',4'-isopropilidén de lactosa). Como resultado de esta reacción el crudo que se obtiene de la misma contiene, además del 3',4'-isopropilidén de lactosa, el isómero 4',6'-isopropilidén de lactosa, los acetales mixtos y la lactosa que no reaccionó (Duclos, R.I. 2000).

Para la separación de 3',4'-isopropilidén de lactosa se deben realizar dos purificaciones cromatográficas en columnas (Duclos, R.I. 2000). Estas operaciones consumen gran cantidad de tiempo y de reactivos, los cuales son muy costosos y además los mismos tienen uso limitado a escalas superiores (Turner, C. 2006). Este trabajo se centra en la sustitución de la primera purificación cromatográfica por otra operación donde se mejore la economía del proceso y facilite el desarrollo de la operación a escala superior.

EXPERIMENTACION

Reactivos

Lactosa para síntesis, Merck
 Dimetilformamida para síntesis, Merck
 Cloroformo para síntesis, Merck
 Metanol para síntesis, Merck
 Ácido metanosulfónico para síntesis, Merck
 Trietilamina para síntesis, Merck
 Diclorometano para síntesis, Merck
 Acetona para síntesis, Merck
 Gel de sílice 60 (0,040-0,063) Merck

El material de referencia de 3',4'-O-isopropilidén- α , β -lactosa y 4',6'-O-isopropilidén- α , β -lactosa, fueron obtenidos en el laboratorio de síntesis química del Instituto Finlay de Vacunas y purificados por cromatografía de columna con una pureza mayor del 99 %, determinada por RMN ^1H (Espinosa *et al*, 2013).

Equipos

Agitador mecánico IKA-WERKE IKA®, Alemania
 Termopar HANNA, Thermometer PT 100, USA
 Termostato Julabo, Modelo ME-26, Alemania
 Rotoevaporador 2 L Buchi, Modelo R-215, Alemania
 Bomba de vacío de membrana Vacuubrand. Modelo MZ-2C, Alemania

Control de la calidad del proceso

En todo el proceso de síntesis se utilizó la cromatografía de capa delgada para el control del mismo. Para esto se emplearon placas pre-elaboradas de gel de sílice 60 GF254 (Merck) de 0,1 mm de espesor, en las cuales fueron aplicadas las muestras obtenidas en cada etapa y el material de referencia. El sistema de disolventes que se utilizó fue acetato de etilo: 2-propanol: agua (3:2:1; V:V:V). Los cromatogramas se visualizaron por tratamiento con una disolución de ácido sulfúrico al 5 % en etanol seguido por calentamiento a 105 °C durante 5 min.

Síntesis del 3',4'-isopropilidén de lactosa

La reacción se realizó en un reactor de 1 L de capacidad provisto de camiseta, agitador mecánico, condensador y un termopar. Primeramente, se suspendieron 50 g de lactosa en 500 mL de dimetilformamida mediante agitación. Cuando esta suspensión alcanzó la temperatura de 85 °C con ayuda de termostato, se añadieron 160 μL de ácido metanosulfónico y 42,3 mL de dimetoxipropano. El curso de la reacción se chequeó por cromatografía de capa delgada con el sistema de disolventes acetato de etilo: 2-propanol: agua en proporción 3:2:1. Transcurridos los 45 minutos de reacción se retiró el calentamiento y se enfrió a temperatura ambiente. Cuando se logró esta condición, se adicionaron 10 mL de trietilamina para neutralizar la reacción. Una vez terminada se eliminó la mezcla de disolventes por roto evaporación, usando un rotoevaporador de 2 L de capacidad con una temperatura de baño de 40 °C y una presión de 556 mbar (Espinosa *et al*, 2013).

Extracción líquido-líquido

Al crudo de la reacción de síntesis de 3',4'-isopropilidén de lactosa se le adicionaron 100 mL de agua y se agitó hasta total dilución.

En un embudo separador de 500 mL con agitación mecánica se colocó la fase acuosa y se le adicionaron 50 mL de diclorometano, se agitó por un tiempo de 5 minutos y luego se separaron ambas fases. Esta operación se realizó cinco veces más para extraer la mayor cantidad de acetales mixtos. La fase acuosa se evaporó a sequedad con ayuda de un rotoevaporador de 2 L de capacidad con una temperatura de baño de 50 °C y una presión de 72 mbar, hasta obtener un sólido espumoso. La operación se controla por cromatografía de capa delgada para comprobar que el sólido obtenido contiene lactosa y la mezcla de isómeros y en la fase orgánica se encuentra los acetales mixtos extraídos (Espinosa *et al*, 2013).

Estudio de las variables de operación en la extracción líquido-líquido

Se estudió el efecto de las variables velocidad de agitación y relación entre el disolvente orgánico y la fase acuosa para esta etapa de extracción. Para esto se realizó un diseño de experimento $3^1 \cdot 2^1$, con una réplica en cada punto, es decir una repetición del experimento básico, el cual se muestra en la tabla 1. Como niveles inferiores para las variables a estudiar se fijaron 300 rpm de velocidad de agitación y la relación entre el disolvente orgánico y la fase acuosa 0,5:1.

Tabla 1. Influencia de la cantidad de DCM y la agitación en la extracción líquido-líquido.

Experimento	Relación entre el disolvente orgánico y la fase acuosa		Velocidad de agitación	
	Nivel	(mL/mL)	Nivel	(min ⁻¹)
1	-1	0,5:1	-1	300
2	0	1:1	-1	300
3	+1	1,5:1	-1	300
4	-1	0,5:1	+1	700
5	0	1:1	+1	700
6	+1	1,5:1	+1	700

Los resultados fueron analizados con la ayuda del programa estadístico Statgraphics Centurion en su versión XV.II., donde se realizó el análisis de varianza para un 95 % de confianza. Se obtuvo además el modelo ajustado y la superficie de respuesta.

Extracción líquido-sólido

Esta extracción se realizó en el mismo balón donde se evaporó la fase acuosa de la operación anterior. Al sólido espumoso obtenido en la evaporación de la fase acuosa se le adicionaron 75 mL de acetona, le fue conectado un agitador mecánico y se agitó por un tiempo de 15 minutos. Ambas fases se separaron por filtración a vacío en un embudo Büchner con placa y papel de filtro. A la fase sólida obtenida se le realizó siete veces más esta operación con el objetivo de extraer la mayor cantidad posible de la mezcla de isómeros. La operación se controló por cromatografía de capa delgada para comprobar que la fase líquida contiene la mezcla de los isómeros 3',4' y 4',6'-isopropilidén de lactosa, la misma se evaporó a vacío con ayuda de un rotoevaporador de 2 L de capacidad con una temperatura de baño de 50 °C y una presión de 11 mbar (Espinosa *et al*, 2013)

Estudio de las variables de operación en la extracción líquido-sólido

Para estudiar el efecto de las variables velocidad de agitación y relación líquido-sólido en esta etapa, se realizó un diseño de experimento $3^1 \cdot 2^1$, con una réplica en cada punto, es decir una repetición del experimento básico. Como niveles inferiores para las variables a estudiar se fijaron 300 rpm de velocidad de agitación y la relación líquido-sólido 3:1.

Tabla 2. Efecto de la relación líquido-sólido y la agitación sobre la separación de la lactosa de la mezcla de isómeros.

Experimento	Relación líquido-sólido		Velocidad de agitación	
	Nivel	mL/g	Nivel	(min ⁻¹)
1	-1	3:1	-1	300
2	0	6:1	-1	300
3	+1	9:1	-1	300
4	-1	3:1	+1	700
5	0	6:1	+1	700
6	+1	9:1	+1	700

Los resultados fueron analizados con la ayuda del programa estadístico Statgraphics Centurion en su versión XV.II., donde se realizó el análisis de varianza para un 95 % de confianza. Se obtuvo además el modelo ajustado y la superficie de respuesta.

Determinación del número de extracciones líquido-sólido

Con el objetivo de definir el número de extracciones a realizar en ambas operaciones se realizaron cuatro extracciones más que las establecidas según el procedimiento, para encontrar el punto de agotamiento del producto a extraer. Con los resultados obtenidos se realizó la curva de agotamiento para cada uno de los productos a extraer, utilizando para ello el programa Curve Expert Professional.

Purificación cromatográfica

Se tomó una columna cromatográfica a la cual se le adiciona sílica gel 60 como fase estacionaria y se le comienza a adicionar mezcla de disolventes cloroformo metanol en proporción 50:1, para compactar la misma. Posteriormente, se adicionó el crudo de reacción previamente disuelto en metanol e impregnado en sílica gel 60. Luego se comienza a adicionar la mezcla de disolventes variando la polaridad de la misma, para obtener una primera fracción donde se encuentran los acetales mixtos y posteriormente la fracción de la mezcla de los isómeros. Esta última fracción se evaporó hasta peso constante.

RESULTADOS

Influencia de la relación entre el disolvente orgánico y la fase acuosa y la velocidad de agitación en la extracción líquido-líquido

En la tabla 3 se presentan los resultados alcanzados en el plan experimental descrito anteriormente, donde se aplicó el método gravimétrico para determinación de los mismos. Como variables respuestas se obtuvo la masa extraída de acetales mixtos y la masa de la mezcla de isómeros y lactosa al final de la extracción.

Tabla 3. Resultados obtenidos en la extracción líquido-líquido.

Velocidad de agitación	Relación entre el de disolvente orgánico y la fase acuosa	Acetales mixtos (g)	Mezcla de isómeros y lactosa (g)
-1	-1	5,70	25,10
-1	0	5,80	23,30
-1	1	5,30	23,20
1	-1	4,32	24,20
1	0	5,66	25,12
1	1	6,05	22,95

En las Figura 1 y 2 se muestran el diagrama de Pareto y la superficie de respuesta resultantes del análisis estadístico de estos resultados para la masa de acetales mixtos.

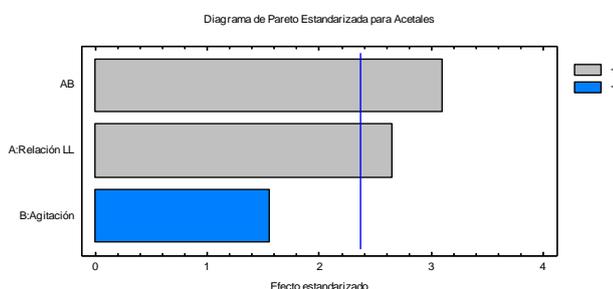


Fig. 1. Significación de las variables estudiadas sobre la masa de acetales mixtos.

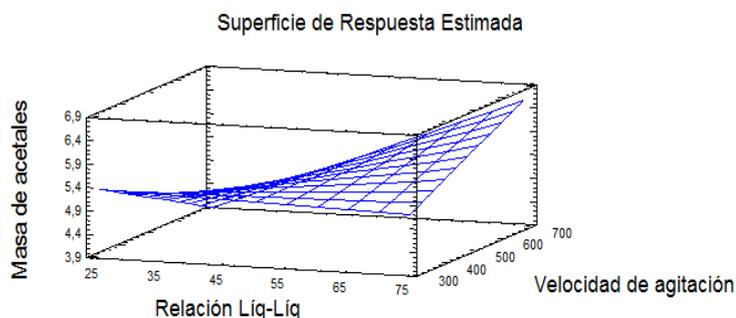


Fig. 2. Superficie de respuesta para las variables con significación en el proceso.

De este análisis se encontró como variables significativas ($p < 0,05$) la relación entre el disolvente orgánico y la fase acuosa y su interacción con la velocidad de agitación, ambas con efecto positivo. Esto demostró que al aumentarse la velocidad de agitación y la relación entre el disolvente orgánico y la fase acuosa se logra extraer una mayor masa de acetales mixtos del crudo de la reacción. Se comprobó a partir de cromatografía de capa delgada que en la fase orgánica solamente había acetales mixtos, no arrastrándose en esta operación el producto de interés.

De este mismo análisis se obtuvo el polinomio ajustado para el efecto de la relación entre el disolvente orgánico y la fase acuosa y de la velocidad de agitación sobre la masa de acetales mixtos en el proceso de extracción (ecuación 1)

$$\text{Masa acetales} = 5,261 - 1,252 (\text{relación líq-líq}) + 1,402 (\text{veloc. de agit.}) \quad (1)$$

Este mismo análisis se realizó para la masa extraída de isómeros y lactosa residual. En la Figura 3 se muestra el diagrama de Pareto correspondiente.

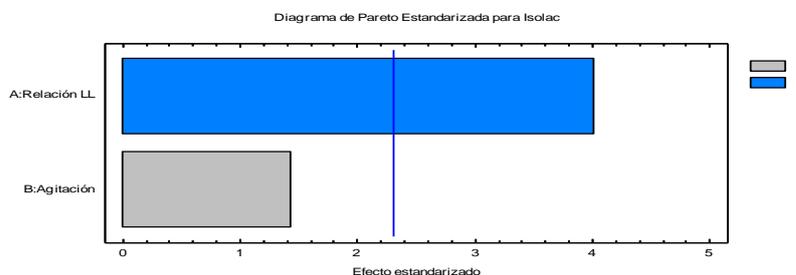


Fig. 3. Significación de las variables operación sobre la masa de isómeros y lactosa residual.

En el diagrama de Pareto se muestra que solamente una variable es significativa ($p < 0,05$): la relación entre el disolvente orgánico y la fase acuosa con efecto negativo. Esto demuestra que al aumentarse la relación entre el disolvente orgánico y la fase acuosa se obtiene menor cantidad de mezcla de isómeros y lactosa residual, debido a que se extrae mayor cantidad de acetales mixtos del crudo obtenido en la reacción, lo que se comprobó a partir de cromatografía de capa delgada como se explicó en el análisis de la influencia de estas variables sobre la masa de acetales mixtos.

De todo esto se tiene como conclusión que, la mejor condición de operación para esta extracción es trabajar con el nivel 1 de la relación entre el disolvente orgánico y la fase acuosa y con el nivel 1 de la velocidad de agitación.

Determinación del número de extracciones a realizar

En la Figura 4 se muestra la curva de agotamiento de los acetales mixtos, la misma se obtuvo de graficar las 10 extracciones realizadas a las mejores condiciones encontradas en esta operación. El modelo ajustado se representa en la ecuación 1, donde n representa el número de extracciones realizadas. El coeficiente de correlación obtenido fue 0,99.



Fig. 4. Masa de acetales mixtos extraída por número de extracciones.

$$\text{Masa de acetales extraída} = 0,153 - 0,0102 n + \frac{3,759}{n^2} \quad (2)$$

Mediante esta ecuación fue posible predecir el número de extracciones que son necesarios realizar para extraer totalmente los acetales mixtos. También es posible calcular la cantidad máxima de acetales a extraer y el porcentaje de agotamiento que se obtiene al cabo de un

determinado número de ellas. De esta manera se determinó que en ocho extracciones se separaba el 94,3 % de los acetales mixtos presentes en el crudo de reacción. De realizar un mayor número de extracciones se incurriría en un mayor gasto de disolvente, lo que afectaría la economía del proceso y además se tuvo en cuenta que el 5,7 % de acetales que no se remueve, no influye en los pasos posteriores del proceso.

Influencia de la relación líquido-sólido y la velocidad de agitación en la extracción líquido-sólido

Los resultados obtenidos para la extracción líquido-sólido se muestran en la tabla siguiente, donde se aplicó el método gravimétrico para determinación de los mismos. La variable respuesta analizada fue la masa de mezcla de isómeros 3',4' y 4',6'-isopropilidén de lactosa.

Tabla 4. Resultados obtenidos en la extracción líquido-sólido.

Velocidad de agitación	Relación líquido-sólido	Mezcla de isómeros (g)	
		3',4'	4',6'
-1	-1	7,00	3,20
-1	0	14,00	14,70
-1	1	14,10	16,80
1	-1	6,30	6,00
1	0	2,60	5,19
1	1	11,20	9,31

El análisis estadístico de estos resultados brindó el diagrama de Pareto y la superficie de respuesta que se muestran en las Figuras 5 y 6.

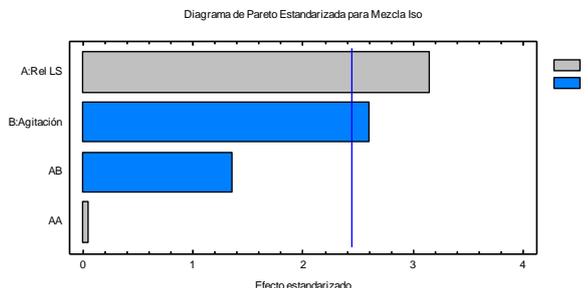


Fig. 5. Significación de la relación líquido-sólido y la velocidad de agitación sobre la extracción de la mezcla de isómeros.

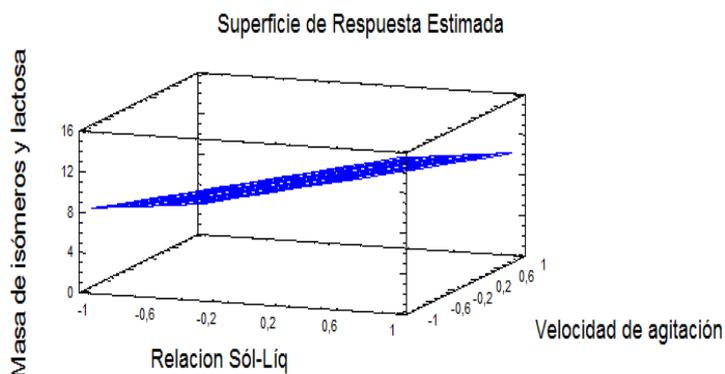


Fig. 6. Superficie de respuesta para las variables con significación en el proceso.

De este análisis se encontró que las dos variables estudiadas resultaron significativas, relación líquido-sólido con efecto positivo por lo que se decidió seleccionar el nivel 1 y la velocidad agitación con efecto negativo. La significación negativa de la velocidad de agitación puede explicarse teniendo en cuenta que el trabajo experimental se desarrolló en un balón y al aumentar la velocidad del nivel -1 al 1 aumentó considerablemente el vórtice, este fenómeno creado no es deseado por su efecto negativo sobre la calidad del mezclado. O sea que, se debe trabajar a una velocidad de agitación que garantice una adecuada calidad del mezclado para favorecer la separación de la mezcla de los isómeros de la lactosa residual.

De este mismo análisis se obtuvo el polinomio ajustado que describe el proceso de extracción líquido-sólido (ecuación 3)

$$\text{Masa isómeros y lactosa} = 9,28 + 3,50 (\text{relación líq-sól}) - 2,50 (\text{veloc. de agit.}) \quad (3)$$

Determinación del número de extracciones a realizar

En la Figura 7 se muestra la curva de agotamiento de la mezcla de isómeros 3',4' y 4',6' isopropilidén de la lactosa, la misma se obtuvo de graficar las 12 extracciones realizadas con las mejores condiciones encontradas en esta operación. La ecuación 4 representa el modelo ajustado donde n es el número de extracciones realizadas. El coeficiente de correlación obtenido fue 0,98.

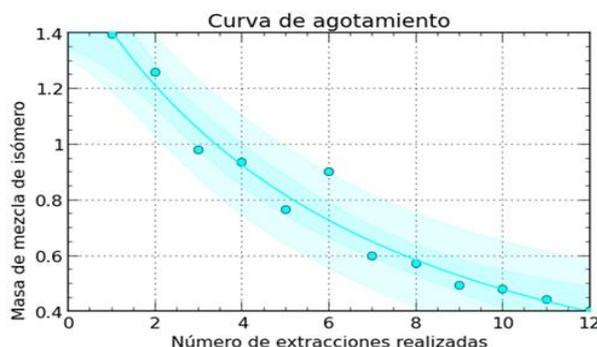


Fig. 7. Masa de isómeros extraída por extracción realizada.

$$\text{Masa de isómeros extraída} = 607,73 (n + 13,77)^{-2,25} \quad (4)$$

A partir de la ecuación 4 está claro que no se pueden separar completamente la mezcla de isómeros de la lactosa en un tiempo finito. No obstante, empleando esta ecuación, se estimó la masa de isómeros extraída en las extracciones posteriores al número 12 hasta no apreciar variaciones en esta en el orden de las centésimas, este límite se fijó teniendo en cuenta la precisión del método gravimétrico utilizado para medir la masa de la mezcla de isómeros. Como conclusión de este análisis se determinó que en 12 extracciones se separaba el 65 % de la mezcla de isómeros presentes en el crudo de la reacción. Se determinó además que de realizar un mayor número de extracciones aumentaría el consumo de disolvente y las cantidades que se obtendrían de masa de isómeros serían pequeñas, por lo que se vería afectada la economía del proceso.

Comparación de los dos procedimientos de purificación

Para comprobar la posibilidad de sustituir la primera purificación cromatográfica por una extracción líquido-líquido y una extracción líquido-sólido, se realizó la comparación de dos

lotes: uno donde los pasos de purificación coinciden con lo descrito en la literatura, una purificación cromatográfica utilizando como disolventes cloroformo: metanol y como fase estacionaria sílica gel 60 y otro donde se realizaron los pasos propuestos, una extracción líquido-líquido y una extracción líquido-sólido, ambas operaciones utilizando las mejores condiciones encontradas en los epígrafes anteriores. En ambos casos se obtiene la mezcla de los isómeros 3',4' y 4',6' isopropilidén de lactosa.

En la tabla 5 se aprecian las cantidades obtenidas siguiendo las dos variantes de purificación y en la tabla 6 se muestra una comparación de tiempo y volúmenes de disolventes consumidos en ambos métodos.

Tabla 5. Comparación de la masa de la mezcla de isómeros obtenida por las dos vías de purificación.

Tipo de Purificación	Masa de lactosa partida (g)	Masa obtenida de mezcla de isómeros (g)
Columna cromatográfica	25	11,89
Extracciones	25	13,38

Tabla 6. Comparación de los parámetros de operación de los dos métodos de purificación.

Método de purificación	Columna cromatográfica	Extracciones
Tiempo de operación (h)	40	16
Volumen de cloroformo (L)	30	-
Volumen de diclorometano (L)	-	0,6
Volumen de acetona (L)	-	2,7

Como se observa en la tabla 5 la masa de mezcla de isómeros que se obtuvo por la vía propuesta es superior a la obtenida por la vía reportada en la literatura (Duclos, R.I. 2000). Además, esto se logró con una sensible disminución del tiempo de operación y del consumo de reactivos (tabla 6), lo que impacta directamente en la económica del proceso.

CONCLUSIONES

Se encontraron las mejores condiciones en los intervalos estudiados en ambas extracciones que permiten obtener las mayores masas de los productos en cada uno de ellas. En la extracción líquido-líquido las condiciones adecuadas de operación son: relación entre el disolvente orgánico y la fase acuosa 1,5:1, velocidad de agitación 700 rpm y realizar ocho extracciones. En la extracción líquido-sólido las condiciones adecuadas de operación son: relación líquido-sólido 9:1, velocidad de agitación 300 rpm y realizar 12 extracciones.

El método de purificación propuesto de una extracción líquido-líquido y una líquido-sólido permiten obtener cantidades superiores de la mezcla de los isómeros 3',4' y 4',6' isopropilidén de lactosa a las logradas empleando purificaciones cromatográficas, en un tiempo menor y con una notable reducción del consumo de reactivos.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Bjerregaard K., Johannesen H., Abraha F., Šakanović A., Groer D., Coskun U., Anderluh G., Oscarson S., Moreno E., Grzybek M. & Krenzell U. (2020) Insight into glycosphingolipid crypticity: Crystal structure of the anti-tumor antibody 14F7 and recognition of NeuGc GM3 ganglioside, bioRxiv, , doi: <https://doi.org/10.1101/2020.09.18.294777>
- Blanco R., Blanco D., Escobar X., Reginfo Ch., Cedeño M., Alvarez R., Reginfo E. & Carr A. (2015). Immunoreaction of 14F7 Mab Raised against N-Glycolyl GM3 Ganglioside Correlates with High Histological Grade in some Tumors of Neuroectodermal and Epithelial Lineage, *Journal of Molecular Biomarkers and Diagnosis*, DOI:10.4172/2155-9929.1000525
- Dorvignit D., Boligan K., Relova E., Clavell M., López A., Labrada M., Uwe simon H., López A., Mesa C. & Gunten S. (2019). Antitumor effects of the GM3(Neu5Gc) ganglioside-specific humanized antibody 14F7hT against Cmah-transfected cancer cells. *Scientific Reports* 9:9921 <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46148-1>
- Duclos RI. (2000) The total synthesis of ganglioside GM3. *Carbohydrate Research*; 328(4):489-507.
- Espinosa M., González D., Márquez M., Ibarra Y. & Ruiz J. (2013) Estudio cinético de la reacción de formación de 3',4'-Oisopropiliden- α,β -lactosa. *Revista CNIC Ciencias Químicas*, 44: 33-38
- Gentilini M.V., Fernández P.M., Fainboim L. & Arana E. (2016).The tumor antigen N-glycolyl-GM3 is a human CD1d ligand capable of mediating B cell and natural killer T cell interaction. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 65(5):551–562
- González A., Blanco R., Escobar X., Blanco D., Gabri M. R., León Kalet & Carr A. (2016) Frequent co-expression of EGFR and NeuGcGM3 ganglioside in cancer: it's potential therapeutic implications, *Clin Exp Metastasis*; 33:717–725 DOI 10.1007/s10585-016-9811-0
- González A, López A., Segatori V., Barroso M.C., Blanco R., Gabri M. R., Carr A. & León K., (2018). Synergistic potentiation of the anti-metastatic effect of anti EGFR mAb by its combination with immunotherapies targeting the ganglioside NGcGM3 Oncotarget; 9(35):24069-24080
- Mulens V, Marinello P, Carr A, Mazorra Z & Fernández LE. (2009) Gangliósidos en la Biología e Inmunoterapia del Cáncer: la Experiencia Cubana. *Cancerología*; 13(4):155-67.
- Pilco D., De la Cruz M., Soriano J., Osorio M., Caballero I., Calvo A., Savon L., Cremades N., Blanco R. & Carr A. (2019). Aberrant expression of N-glycolyl GM3 ganglioside is associated with the aggressive biological behavior of human sarcomas. *BMC Cancer*, <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5743>
- Shimizu T., Nagane M., Suzuki M., Yamauchi A., Kato K., Kawashima N., Nemoto Y., Maruo T., Kawakami Y. & Yamashita T. (2020). Tumor hypoxia regulates gangliosideGM3 synthase, which contributes to oxidative stress resistance in malignant melanoma. *BBA-GeneralSubjects*, <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2020.129723>
- Turner C. (2006) *Modern Extraction Techniques*. Estados Unidos de América: American Chemical Society;
- Uskent N., Ayla S., Molinas N., Ozkan M., Teomete M., Baloglu H., Aydıncı C., Yergok H., Dogan E., Berk B. & Yazar A. (2020) Prognostic significance of tumor tissue NeuGcGM3 Ganglioside expression in patients receiving Racotumomab

- immunotherapy, Hindawi Journal of Oncology, Article ID 1360431, 7 pages
<https://doi.org/10.1155/2020/1360431>
- Zheng Ch., Terreni M., Sollogoub M. & Zhang Y. (2019). Ganglioside GM3 and Its Role in Cancer. *Current Medicinal Chemistry*, 26 (16), 2933-2947
- Zheng Ch., Huang R., Bavaro T., Terreni M., Sollogouh M., Xu J. & Zhang Y. (2020). Design, synthesis and biological evaluation of new ganglioside GM3 analogues as potential for cancer therapy. *European Journal of Medicinal Chemistry*, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112065>
- Zheng Ch., Guan H., Liu Y., Bavaro T., Terreni M., Sollogouh M., Xu J. & Zhang Y. (2019) Chemoenzymatically synthesized ganglioside GM3 analogues with inhibitory effects on tumor cell growth migration. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 165, 107-114. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.01.016>