



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

Desarrollo de una nanomedicina de Gemcitabina basada
en Redes Covalentes Orgánicas (COFs)

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: Cano Fajardo, María

Tutor/a: Murguía Ibáñez, José Ramón

Director/a Experimental: Botella Asuncion, Pablo

CURSO ACADÉMICO: 2025/2026

RESUMEN

En los últimos años, los nanomateriales han adquirido una creciente relevancia en las ciencias biomédicas, pudiendo ser empleados en diversas aplicaciones. En este contexto, la nanomedicina ha despertado un interés cada vez mayor en la terapia contra el cáncer, donde los nanomateriales pueden ser utilizados para actuar directamente como agentes anticancerígenos o como *nanocarriers* de fármacos de bajo peso molecular debido a ventajas tales como el aprovechamiento del efecto de permeabilidad y retención aumentada (EPR), la liberación prolongada de fármacos y su capacidad de usar como diana tejidos específicos.

Entre estos nanomateriales, las Redes Covalentes Orgánicas (COFs) constituyen una clase de materiales porosos cristalinos formados principalmente por elementos ligeros unidos mediante enlaces covalentes dinámicos y reversibles. Su estructura altamente ordenada, su capacidad de ajuste y la posibilidad de su funcionalización de forma posterior a su síntesis los convierte en excelentes candidatos para aplicaciones biomédicas. En particular, los COFs bidimensionales presentan características especialmente favorables para la liberación controlada de fármacos, como su elevada superficie específica. Dentro de este grupo destaca el COF-LZU1, cuyo tamaño de poro resulta adecuado para la encapsulación de gemcitabina, entre otros.

La gemcitabina es un profármaco comúnmente utilizado para tratar distintos tumores sólidos, incluido el cáncer de vejiga con infiltración muscular (MIBC). No obstante, aunque la gemcitabina ha demostrado éxito clínico, posee numerosas limitaciones, como por ejemplo sus efectos secundarios, que ponen de manifiesto la necesidad de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas, como sistemas de liberación controlada basados en *nanocarriers*, es decir, una nanomedicina.

Por ello, el objetivo principal de este Trabajo de Fin de Grado ha consistido en desarrollar una nanomedicina basada en el anclaje de un profármaco de gemcitabina funcionalizado con una cadena lateral de β -alanina sobre COF-LZU1. Para ello, se llevó a cabo la síntesis y caracterización de cada uno de los componentes de este sistema y del producto final.

En este marco, los resultados obtenidos apuntan a que la síntesis del COF produjo un material adecuado para su aplicación como *nanocarrier*, con una estructura altamente cristalina, una distribución uniforme de tamaño de partícula, aunque con una superficie específica inferior a la esperada. Asimismo, la síntesis del profármaco fue satisfactoria y permitió obtener la estructura deseada. Finalmente, el contenido del profármaco de gemcitabina en la nanomedicina sintetizada fue relativamente alto.

En conjunto, los resultados obtenidos constituyen una base prometedora para el desarrollo de este sistema, si bien la eficacia y toxicidad del producto generado deberán ser puestas a prueba en estudios futuros.

ABSTRACT

In recent years, nanomaterials have gained increasing relevance in the biomedical sciences due to their broad range of potential applications. In this context, nanomedicine has attracted growing interest in cancer therapy, where nanomaterials can be employed either as anticancer agents themselves or as nanocarriers for low-molecular-weight drugs. Their advantages include the exploitation of the enhanced permeability and retention (EPR) effect, sustained drug release, and the ability to target specific tissues.

Among these nanomaterials, Covalent Organic Frameworks (COFs) represent a class of crystalline porous materials composed mainly of light elements linked by dynamic and reversible covalent bonds. Their highly ordered structure, tunability, and the possibility of post-synthetic functionalization make them excellent candidates for biomedical applications. In particular, two-dimensional COFs exhibit especially favorable properties for controlled drug delivery, such as their high specific surface area. Among them, COF-LZU1 stands out due to its pore size, which is suitable for the encapsulation of gemcitabine, among other compounds.

Gemcitabine is a prodrug commonly used to treat various solid tumors, including muscle-invasive bladder cancer (MIBC). Although gemcitabine has demonstrated significant clinical efficacy, it presents several limitations, such as adverse side effects, highlighting the need to develop new therapeutic strategies, including controlled drug delivery systems based on nanocarriers, that is, a nanomedicine.

Therefore, the main objective of this Bachelor's Thesis was to develop a nanomedicine based on the immobilization of a gemcitabine prodrug functionalized with a β -alanine side chain onto COF-LZU1. To this end, each component of the system, as well as the final product, was synthesized and characterized.

The obtained results indicate that the synthesized COF is a suitable material for use as a nanocarrier, exhibiting a highly crystalline structure and a uniform particle size distribution, although its specific surface area was lower than expected. Furthermore, the synthesis of the prodrug was successful and yielded the desired structure. Finally, the loading of the gemcitabine prodrug in the synthesized nanomedicine was relatively high.

Overall, these results provide a promising foundation for the development of this nanomedicine. Nevertheless, the efficacy and toxicity of the synthesized system should be evaluated in future studies.

RESUM

En els últims anys, els nanomaterials han adquirit una rellevància creixent en les ciències biomèdiques gràcies a les seues nombroses aplicacions potencials. En aquest context, la nanomedicina ha despertat un interès cada vegada major en la teràpia contra el càncer, on els nanomaterials poden actuar directament com a agents anticancerígens o com a nanotransportadors de fàrmacs de baix pes molecular. Entre els seus avantatges destaquen l'aprofitament de l'efecte de permeabilitat i retenció augmentades (EPR), l'alliberament sostingut de fàrmacs i la seua capacitat de dirigir-se específicament a determinats teixits.

Entre aquests nanomaterials, les Xarxes Orgàniques Covalents (COFs) constitueixen una classe de materials porosos cristal·lins formats principalment per elements lleugers units mitjançant enllaços covalents dinàmics i reversibles. La seua estructura altament ordenada, la seua capacitat d'ajust i la possibilitat de funcionalització posterior a la síntesi els converteixen en excel·lents candidats per a aplicacions biomèdiques. En particular, els COFs bidimensionals presenten característiques especialment favorables per a l'alliberament controlat de fàrmacs, com ara la seua elevada superfície específica. Dins d'aquest grup destaca el COF-LZU1, la grandària de porus del qual és adequada per a l'encapsulació de gemcitabina, entre altres compostos.

La gemcitabina és un profàrmac utilitzat habitualment en el tractament de diversos tumors sòlids, inclòs el càncer de bufeta amb infiltració muscular (MIBC). No obstant això, malgrat la seua demostrada eficàcia clínica, presenta diverses limitacions, com ara els seus efectes secundaris, fet que posa de manifest la necessitat de desenvolupar noves estratègies terapèutiques, com els sistemes d'alliberament controlat de fàrmacs basats en nanotransportadors, és a dir, una nanomedicina.

Per això, l'objectiu principal d'aquest Treball de Fi de Grau ha sigut desenvolupar una nanomedicina basada en l'ancoratge d'un profàrmac de gemcitabina funcionalitzat amb una cadena lateral de β -alanina sobre COF-LZU1. Amb aquesta finalitat, es va dur a terme la síntesi i la caracterització de cadascun dels components del sistema, així com del producte final.

Els resultats obtinguts indiquen que la síntesi del COF va donar lloc a un material adequat per a la seua aplicació com a nanotransportador, amb una estructura altament cristal·lina i una distribució homogènia de la grandària de les partícules, tot i que amb una superfície específica inferior a l'esperada. Així mateix, la síntesi del profàrmac va ser satisfactòria i va permetre obtenir l'estructura desitjada. Finalment, el contingut del profàrmac de gemcitabina en la nanomedicina sintetitzada va ser relativament elevat.

En conjunt, els resultats obtinguts constitueixen una base prometedora per al desenvolupament d'aquest sistema. No obstant això, l'eficàcia i la toxicitat del producte sintetitzat hauran de ser avaluades en estudis futurs.

Índice de contenido

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Nanomedicina	1
1.1.1	Ventajas de la aplicación de nanomedicina en cáncer	1
1.1.2	Limitaciones y retos clínicos	2
1.2	Redes covalentes orgánicas (COFs)	2
1.2.1	COFs bidimensionales (2D COFs)	3
1.2.2	Diseño y modificación estructural de COFs 2D	3
1.2.3	Aplicaciones de COFs 2D en biomedicina	4
1.2.4	Limitaciones de los COFs en aplicaciones biomédicas	5
1.2.5	COF-LZU1	5
1.3	Gemcitabina como agente antitumoral	6
1.3.1	Gemcitabina como tratamiento para MIBC	7
2	OBJETIVOS	8
3	MATERIAL Y MÉTODOS	9
3.1	Síntesis de profármaco y nanopartícula	9
3.1.1	Síntesis de Gem-NH ₂	9
3.1.2	Síntesis de COF-LZU1	11
3.1.3	Síntesis de COF-LZU1-Gem	12
3.2	Caracterización de profármaco y materiales	12
3.2.1	Caracterización del profármaco Gem-NH ₂	12
3.2.2	Caracterización de COF-LZU1	13
3.2.3	Caracterización de COF-LZU1-Gem	15
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
4.1	Caracterización del profármaco	17
4.1.1	¹ H-RMN y ¹³ C-RMN	17
4.1.2	HPLC-MS	22
4.2	Caracterización de la nanopartícula COF-LZU1	22
4.2.1	Difracción de Rayos X (XRD) de COF-LZU1	22
4.2.2	Adsorción y desorción de N ₂	22
4.2.3	Microscopía electrónica	23
4.2.4	DLS y potencial ζ	24
4.3	Caracterización de la nanomedicina COF-LZU1-Gem	25
4.3.1	DLS y potencial ζ	25
4.3.2	HPLC-UV	25
5	CONCLUSIONES	27
6	BIBLIOGRAFÍA	28

Índice de figuras

Figura 1. Representación del apilamiento entre dos capas contiguas de COFs bidimensionales, eclipsado (AA) y alternado (AB), respectivamente (Bhunia et al., 2020).....	4
Figura 2. Condensación del enlace de tipo imina (Bhunia et al., 2020).	4
Figura 3. Esquema de la reacción y estructura de COF-LZU1. Los reactivos indicados son 1,3,5-triformilbenceno (1) y 1,4-diaminobenceno (2). Adaptación de Figura 1 de Ding et al., 2011.	5
Figura 4. Estructura de la gemcitabina. Figura realizada con ChemDraw.....	7
Figura 5. Esquema de la síntesis del profármaco de gemcitabina-NH ₂ : funcionalización de la gemcitabina con β-alanina. Figura realizada con ChemDraw.....	9
Figura 6. ¹ H-RMN del resultado de la síntesis de Gem 1.....	18
Figura 7. ¹ H-RMN del resultado de la síntesis de Gem 2.....	19
Figura 8. ¹ H-RMN del resultado de la síntesis de Gem 3.....	20
Figura 9. ¹ H-RMN del resultado de la síntesis de Gem 4.....	20
Figura 10. ¹³ C-RMN del resultado de la síntesis de Gem 4.....	21
Figura 11. 2D-HSQC del resultado de la síntesis de Gem 4.....	21
Figura 12. XRD en polvo de la nanopartícula COF-LZU1 (azul) y el patrón simulado (rojo).....	22
Figura 13. Isoterma de adsorción-desorción de COF-LZU1.....	23
Figura 14. Imágenes FESEM (A) Y TEM (B) de las nanopartículas COF-LZU1	24
Figura 15. Recta de calibrado de gemcitabina obtenida por HPLC-UV a partir de la relación entre la concentración de gemcitabina (mg/mL) y el área promedio de los picos cromatográficos.....	26

Índice de abreviaturas

ACN	Acetonitrilo
BET	Método Brunauer, Emmet y Teller
BJH	Método Barret-Joyner-Halenda
Boc	Tert-butoxicarbonilo
Boc ₂ O	Dicarbonato de di-terc-butilo
COFs	Redes covalentes orgánicas (<i>Covalent Organic Frameworks</i>)
DCM	Diclorometano
DLS	Dispersión de luz dinámica (<i>Dynamic Light Scattering</i>)
EPR	Efecto de permeabilidad y retención aumentada (<i>Enhanced Permeability and Retention effect</i>)
FESEM	Microscopía electrónica de barrido por emisión de campo (<i>Field Emission Scanning Electron Microscopy</i>)
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
MIBC	Cáncer de vejiga con infiltración muscular (<i>Muscle Invasive Bladder Cancer</i>)
MOFs	Redes metálicas orgánicas (<i>Metal-organic frameworks</i>)
NBPDA	N-(tert-butoxicarbonil)-1,4-fenilendiamina
PDI	Índice de polidispersidad (<i>Polydispersity Index</i>)
POMs	Materiales orgánicos porosos (<i>Porous Organic Polymeric Materials</i>)
PVP	Polivinilpirrolidona
RMN	Resonancia magnética nuclear (<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
SEM	Microscopía electrónica de barrido (<i>Scanning Electron Microscopy</i>)
TEA	Trietilamina
TEM	Microscopía electrónica de transmisión (<i>Transmission Electron Microscopy</i>)
TFA	Ácido trifluoroacético (<i>Trifluoroacetic Acid</i>)
TFB	1,3,5-triformilbenceno
TLC	Cromatografía en capa fina (<i>Thin Layer Chromatography</i>)
TME	Microambiente tumoral (<i>Tumor Microenvironment</i>)
XRD	Difracción de Rayos X (<i>X-Ray Diffraction</i>)

Relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la agenda 2030.

A. Indicar el grado de relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS).

	Alto	Medio	Bajo	No procede
ODS 1. Fin de la pobreza				X
ODS 2. Hambre cero				X
ODS 3. Salud y bienestar	X			
ODS 4. Educación de calidad				X
ODS 5. Igualdad de género				X
ODS 6. Agua limpia y saneamiento				X
ODS 7. Energía asequible y no contaminante				X
ODS 8. Trabajo decente y crecimiento económico				X
ODS 9. Industria, innovación e infraestructuras			X	
ODS 10. Reducción de las desigualdades				X
ODS 11. Ciudades y comunidades sostenibles				X
ODS 12. Producción y consumo responsables				X
ODS 13. Acción por el clima				X
ODS 14. Vida submarina				X
ODS 15. Vida de ecosistemas terrestres				X
ODS 16. Paz, justicia e instituciones sólidas				X
ODS 17. Alianzas para lograr objetivos.				X

B. Describir brevemente la alineación del TFG con los ODS, marcados en la tabla anterior, con un grado alto.

El presente trabajo se alinea con el Objetivo de Desarrollo Sostenible (ODS) 3, “Garantizar una vida sana y promover el bienestar para todas las personas en todas las edades”, al centrarse en el desarrollo de una nueva nanomedicina para el tratamiento del cáncer de vejiga con infiltración muscular. Esta investigación contribuye al avance de nuevas estrategias terapéuticas para mejorar la eficacia de los tratamientos oncológicos.

En particular, el trabajo está relacionado con la meta 3.4 de la Agenda 2030, que busca reducir la mortalidad prematura por enfermedades no transmisibles mediante la prevención y el tratamiento. La aplicación de la nanotecnología en el ámbito médico permite reducir los efectos adversos asociados a tratamientos convencionales y favorece el desarrollo e investigación de tratamientos más seguros, selectivos y personalizados. Así, el presente trabajo representa una aportación al desarrollo de tecnologías para mejorar la supervivencia y el bienestar de los pacientes oncológicos, en consonancia con los objetivos establecidos por la Agenda 2030.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Nanomedicina

La nanomedicina puede definirse como el conjunto de productos médicos formulados a partir de materiales en escala nanométrica con el objetivo de prevenir, diagnosticar y tratar enfermedades. Incluyen tanto dispositivos médicos basados en nanotecnología como nanofármacos. El tipo de nanopartícula utilizada en cada caso puede variar dependiendo de la función: mientras que en los dispositivos médicos es frecuente el empleo de materiales no biodegradables, como la plata, en el caso de los nanofármacos se suelen emplear nanopartículas biodegradables (Fröhlich, 2026).

En los últimos años, el campo de la nanomedicina, en concreto los nanofármacos, han adquirido un interés creciente en el ámbito de la investigación, especialmente en oncología. En este contexto, los nanofármacos pueden clasificarse, basándose en su función terapéutica, en dos clases: aquellos que son agentes anticancerígenos independientes o aquellos que son utilizados como *nanocarriers* para transportar pequeñas moléculas activas anticancerígenas. Generalmente, se usa el término nanomedicina para englobar a ambos tipos, ya que es posible combinar ambas funciones para obtener un efecto sinérgico (Wang & Zhang, 2023).

1.1.1 Ventajas de la aplicación de nanomedicina en cáncer

La creciente inclinación hacia la nanomedicina en el campo de la oncología se debe principalmente a la posibilidad de mejorar la eficacia y la selectividad de los tratamientos frente a las terapias convencionales. En este sentido, uno de los fenómenos más relevantes es el denominado efecto de permeabilidad y retención aumentada (EPR, *Enhanced Permeability and Retention effect*), una propiedad fisiopatológica típica de tumores sólidos. Este efecto se debe a la presencia de vasos sanguíneos defectuosos y drenaje linfático deficiente en dichos tumores. Esto puede favorecer, en determinados casos, la extravasación y acumulación de nanopartículas en el tejido tumoral, lo cual puede ser aprovechado en el diseño de una nanomedicina asegurando que el tamaño de esta sea adecuado (Fang et al., 2020; Wang & Zhang, 2023).

Además, las nanomedicinas diseñadas como *nanocarriers* presentan una función relevante en la protección del fármaco acoplado, evitando así su degradación mecánica y enzimática, y aumentando su estabilidad y vida media en circulación (Wang & Zhang, 2023).

Las nanomedicinas también pueden ser diseñadas para permitir una acumulación y liberación del medicamento controlada y en respuesta a estímulos concretos, evitando la liberación no específica asociada a tratamientos convencionales. Asimismo, es posible la funcionalización de la nanomedicina de tal forma que esta sea inerte en tejidos normales, pero se active o libere el agente terapéutico específicamente en el tumor, basándose en desencadenantes tales como las condiciones fisicoquímicas específicas del microambiente tumoral. También permiten la incorporación de grupos funcionales en la superficie de las nanopartículas para sobrepasar barreras biológicas, usando como dianas antígenos o receptores específicos de tumores. De esta forma es posible reducir la toxicidad y los efectos secundarios de los tratamientos oncológicos mediante el uso de las nanomedicinas, siendo estas bastante sensibles y selectivas (Li et al., 2019; Wang & Zhang, 2023).

Por otro lado, el microambiente tumoral (TME, *Tumor Microenvironment*) es un factor clave en la resistencia a fármacos en tratamientos contra el cáncer. Este entorno se caracteriza por condiciones como hipoxia, acidez, alteraciones inmunológicas y cambios metabólicos que pueden reducir la eficacia de los medicamentos. Por ejemplo, la acidificación del metabolismo anaerobio puede favorecer la disociación de determinados compuestos farmacológicos, disminuyendo su

actividad terapéutica (Raghunand & Gillies, 2000). En este contexto, el diseño de nanomedicinas permite no solo mejorar la entrega del fármaco, sino también atacar directamente componentes del TME implicados en resistencia tumoral.

Además, debido a la complejidad y heterogeneidad características del cáncer, es bastante común el tratamiento con una combinación de fármacos. En este sentido, las nanomedicinas permiten un diseño para crear un sistema de liberación controlada de múltiples fármacos de forma simultánea para el mantenimiento de relaciones sinérgicas entre ellos (Gadde, 2015).

Finalmente, cabe destacar la capacidad de algunas nanomedicinas de incorporar funciones de diagnóstico y terapia en un mismo sistema (teranóstico), ya que algunas nanopartículas empleadas en aplicaciones terapéuticas también presentan propiedades de imagen (Wang & Zhang, 2023)

1.1.2 Limitaciones y retos clínicos

A pesar de las ventajas descritas, la traslación clínica de la nanomedicina sigue siendo limitada, y el número de formulaciones aprobadas para uso clínico es muy reducido en comparación con tratamientos convencionales. Esta brecha entre investigación y aplicación clínica se debe a múltiples factores.

En primer lugar, uno de los primeros retos es la complejidad del diseño y síntesis de estos sistemas, ya que es necesario controlar parámetros como el tamaño o la superficie. Estos factores son determinantes, entre otros aspectos, para evitar la captación prematura de las nanopartículas por el hígado (Baboci *et al.*, 2020).

Asimismo, muchas nanomedicinas carecen de la capacidad de carga del fármaco y cinética de liberación apropiada para lograr una dosis terapéutica adecuada en el tejido diana. A esto se suma el hecho de que el *targeting* pasivo basado en el efecto EPR no garantiza el control sobre la liberación específica del fármaco (Fröhlich, 2026).

Desde el punto de vista de su fabricación, la producción a gran escala es limitada en comparación con fármacos convencionales, lo que dificulta su implementación industrial y clínica. Por último, aún existe falta de información sólida acerca de la toxicidad a largo plazo de muchas nanomedicinas, así como sus posibles interacciones con sistemas biológicos complejos (Wang & Zhang, 2023).

Como consecuencia, aunque la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA) y la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) han aprobado diversas formulaciones basadas en nanotecnología, el número de estas aprobadas para uso clínico sigue siendo reducido (Fröhlich, 2026).

1.2 Redes covalentes orgánicas (COFs)

En las últimas décadas se han desarrollado numerosos materiales poliméricos porosos para aplicaciones tecnológicas y biomédicas, tales como los materiales orgánicos porosos (POMs, *Porous Organic Polymeric Materials*) o materiales porosos inorgánicos, entre otros. Sin embargo, hasta la aparición de la química reticular, no fue posible controlar el diseño de estos materiales a medida. La química reticular supuso un gran avance en este campo, pues permitió combinar unidades moleculares de forma racional para formar materiales porosos altamente ordenados. (Bhunia *et al.*, 2020)

Las redes metálicas orgánicas (MOFs, *Metal-Organic Frameworks*) fueron el primer ejemplo de esos polímeros cristalinos altamente modificables, compuestas por bloques de construcción orgánicos e iones de metal unidos mediante enlaces covalente coordinados. Mediante sustitución de los

metales por moléculas orgánicas, se pudieron sintetizar las primeras redes covalentes orgánicas (COFs, *Covalent Organic Frameworks*), descritas por primera vez por Côté y colaboradores en 2005 (Bhunia et al., 2020; Cote et al., 2005)

Los COFs son una clase de polímeros porosos cristalinos formados por elementos ligeros unidos mediante enlaces covalentes. Estos se generan mediante reacciones de condensación reversibles entre bloques de construcción orgánicos, generando así estructuras extendidas con esqueletos periódicos y poros ordenados (Huang et al., 2016). Una de las características más relevantes de los COFs y que los diferencia del resto de materiales porosos es la posibilidad de diseñar racionalmente su esqueleto y poros mediante química reticular, ya que la geometría y unión de los bloques orgánicos utilizados para su síntesis permiten predecir la topología final de la red, pudiendo obtener así una geometría, dimensiones y tamaño de poro deseados. (Huang et al., 2016).

Los COFs pueden clasificarse dependiendo de diversos criterios, incluyendo la naturaleza de sus bloques de construcción, el tamaño de poro, la flexibilidad del esqueleto o su dimensionalidad. En función de esta última, es posible distinguir COFs bidimensionales (2D) y tridimensionales (3D). Los COFs 3D se caracterizan por presentar redes covalentes extendidas en las tres dimensiones espaciales. En cambio, los COFs 2D están formados por capas bidimensionales unidas mediante interacciones π - π , dando lugar a estructuras cristalinas altamente ordenadas (Huang et al., 2016).

1.2.1 [COFs bidimensionales \(2D COFs\)](#)

Dentro de los tipos de COFs, los bidimensionales están recibiendo un gran interés debido a sus estructuras columnares periódicas con sistemas π conjugados, su tamaño de poro y su fácil síntesis, además de una baja densidad, alta cristalinidad, alta estabilidad térmica y su gran superficie (Bhunia et al., 2020).

La formación de esos materiales mediante reacciones reversibles aporta ventajas adicionales, pues hace posible su biodegradación y la corrección de errores ocurridos durante la síntesis, pudiendo así romper y formar de nuevo enlaces covalentes. De forma adicional, su composición de átomos de baja masa atómica ofrece una mayor biocompatibilidad en comparación a otros polímeros, como los MOFs que contienen centros metálicos (Bhunia et al., 2020).

1.2.2 [Diseño y modificación estructural de COFs 2D](#)

Los COFs bidimensionales (2D) pueden clasificarse en función de los bloques orgánicos que los constituyen y del tipo de enlace que conecta dichos bloques. La geometría y conectividad entre las unidades orgánicas determinan la topología de la red resultante, mientras que la longitud de dichos bloques influye sobre el tamaño de los poros.

Además, la disposición espacial de los poros se ve influenciada por el apilamiento de las capas que componen la red. De esta manera, es posible distinguir un apilamiento eclipsado (AA), en la que los poros de capas consecutivas se encuentran alineados, y el apilamiento alternado (AB), donde existe un desplazamiento relativo en las capas (Figura 1). Esta disposición también puede ser susceptible de ser modificada mediante el diseño químico de las unidades orgánicas usadas en su síntesis (Bhunia et al., 2020).

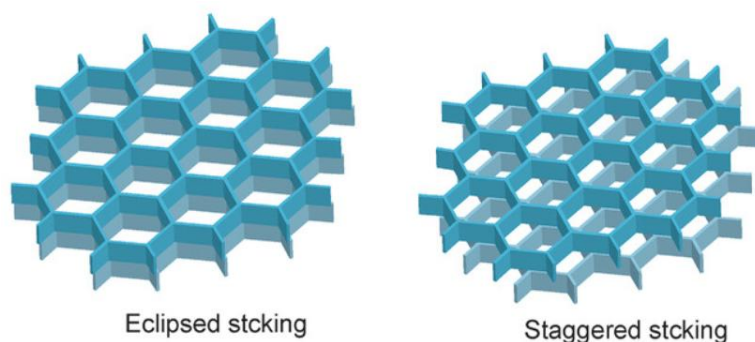


Figura 1. Representación del apilamiento entre dos capas contiguas de COFs bidimensionales, eclipsado (AA) y alternado (AB), respectivamente (Bhunia et al., 2020)

Finalmente, cabe destacar que es posible la modificación de la superficie de los COFs 2D pre-síntesis o post-síntesis. De esta manera, es posible incorporar grupos funcionales específicos en la superficie de los COFs para así poder modular propiedades como la biocompatibilidad o el reconocimiento selectivo de biomoléculas (Bhunia et al., 2020).

Los COFs también pueden clasificarse en función del tipo de enlace covalente que conecta sus bloques de construcción. Los primeros COFs sintetizados estaban basados en enlaces boronato (-B-O-), el cual posee una limitada estabilidad química e hidrolítica. Como alternativa, surgieron los COFs basados en enlaces imina (-C-N-), entre otros. Estos se obtienen mediante condensación entre los grupos aldehído y amina (Figura 2) y su conjugación π extendida a lo largo de la red confiere a estos materiales una gran resistencia química y estructural. No obstante, cabe destacar que la cristalinidad de los COFs basados en imina es menor que aquella de los basados en ácido borónico, ya que la reversibilidad de la reacción de condensación dealdimina reduce la capacidad de corrección de errores durante la síntesis (Bhunia et al., 2020).

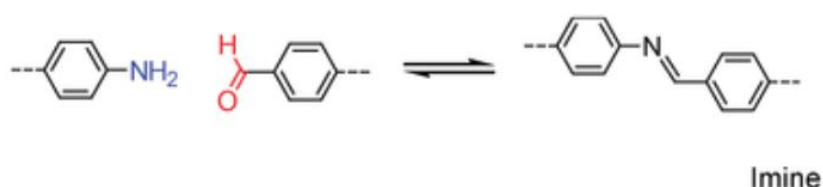


Figura 2. Condensación del enlace de tipo imina (Bhunia et al., 2020).

1.2.3 Aplicaciones de COFs 2D en biomedicina

A día de hoy, los COFs, concretamente los COFs bidimensionales, están siendo objeto de estudio en nanomedicina gracias a sus numerosas ventajas sobre otros materiales.

Una de las aplicaciones más prometedoras es su empleo como sistemas de liberación controlada de fármacos. Los COF 2D poseen una gran superficie y un gran volumen de poro, lo que permite una gran capacidad de carga. La reversibilidad del enlace no sólo hace que sean biodegradables, sino que también permiten su ruptura mediante pH, haciendo posible el desarrollo de sistemas de liberación controlada en respuesta a un estímulo como es el pH. Además, como ya se ha comentado, su alta capacidad de ajuste y su composición suponen propiedades favorables para este tipo de aplicaciones. (Bhunia et al., 2020)

Además de su uso como *nanocarriers*, los COFs han sido investigados en aplicaciones de biocatálisis, donde actúan como soportes para la inmovilización de enzimas, mejorando su estabilidad y facilitando su reutilización. Su alta densidad de electrones π le confiere propiedades aplicables en campos tales como la fototerapia y el biosensado. Asimismo, la incorporación de agentes terapéuticos en sus poros los convierte en una posible plataforma para tratamiento antibacteriano (Liang et al., 2023).

1.2.4 Limitaciones de los COFs en aplicaciones biomédicas

A pesar de sus numerosas ventajas, los COFs todavía presentan diversas limitaciones que dificultan su aplicación clínica. Entre ellas, podemos destacar su baja estabilidad fisiológica: la reversibilidad de su enlace los hace susceptibles de ser degradados por condiciones alcalinas, ácidas o húmedas. Esta baja estabilidad hace que su vida media sea muy limitada. En cuanto a la escalabilidad, como otras nanomedicinas, es difícil de producir a gran escala y la reproducibilidad entre lotes es baja. Además, los perfiles de seguridad de los COF aún no se han investigado en detalle, pues hasta ahora son pocos los estudios que se han llevado a cabo in vivo (Bhunja et al., 2020).

1.2.5 COF-LZU1

Entre los distintos COFs bidimensionales basados en enlaces imina, se encuentra COF-LZU1, desarrollada originalmente en la Universidad de Lanzhou. Está formado a partir de la unión de 1,3,5-triformilbenceno (TFB) y 1,4-diaminobenceno, dando lugar a una red covalente bidimensional de simetría hexagonal (Figura 3). Posee una estructura con apilamiento eclipsado (AA), generando canales unidimensionales de aproximadamente 1,8 nm de diámetro. (Ding et al., 2011).

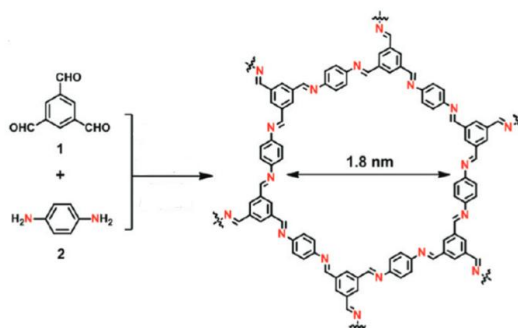


Figura 3. Esquema de la reacción y estructura de COF-LZU1. Los reactivos indicados son 1,3,5-triformilbenceno (1) y 1,4-diaminobenceno (2). Adaptación de Figura 1 de Ding et al., 2011.

Aunque en un principio el LZU1 destacó por su excelencia en la catálisis, se ha convertido en un candidato destacado para el desarrollo de nanomedicinas gracias a sus propiedades estructurales y químicas únicas. Las ventajas del LZU1 para la nanomedicina pueden clasificarse en cuatro puntos clave:

- a) Carga de fármaco: Porosidad ordenada: El LZU1 presenta una estructura en capas eclipsadas bidimensional (2D) con canales unidimensionales (1D) bien definidos de aproximadamente entre 1,8 y 2 nm. Este tamaño es ideal para encapsular fármacos de moléculas pequeñas (por ejemplo, 5-fluorouracilo, gemcitabina).

Además, presenta elevada superficie específica. Así, su amplia área superficial interna permite capacidades de carga de fármacos extremadamente elevadas en comparación con las

nanopartículas poliméricas tradicionales. Esto garantiza que una cantidad menor del portador pueda administrar una dosis terapéutica, reduciendo el riesgo de toxicidad relacionada con el portador.

- b) Liberación de fármacos sensible a estímulos: El LZU1 se construye utilizando enlaces imina (formados por la reacción de 1,3,5-triformilbenceno y p-fenilendiamina). Estos enlaces imina son estables a pH fisiológico (7,4), pero se vuelven lábiles (propensos a romperse) en entornos ligeramente ácidos, como el de los lisosomas y el microambiente tumoral. Dado que los tumores y los lisosomas suelen ser ácidos (pH 5,0-6,5), el LZU1 puede actuar como un nanotransportador «inteligente» que permanece intacto en el torrente sanguíneo, pero que desencadena la liberación de su carga de forma específica una vez que entra en el tejido tumoral o es internalizado por las células cancerosas.
- c) Modularidad para la teranóstica multifuncional: Una de las características más destacadas de LZU1 es su capacidad para coordinarse con iones metálicos (como Pd^{2+} , Cu^{2+} o Ag^{+}) a través de los átomos de nitrógeno de su estructura de imina. Esto resulta muy ventajoso para desarrollar agentes de contraste para imagen clínica, como resonancia magnética (MRI) o tomografía por emisión de positrones (PET).

También permite la terapia combinada. Así, la introducción de agentes fotosensibilizadores o nanopartículas metálicas en la estructura da lugar a nanomateriales híbridos para terapia fototérmica (PTT) o fotodinámica (PDT).

Finalmente, la superficie exterior del LZU1 puede modificarse fácilmente con moléculas directoras, como el ácido fólico, el ácido hialurónico y anticuerpos monoclonales. Esto permite que la nanomedicina «busque» receptores específicos sobreexpresados en las células cancerosas, mejorando la precisión del tratamiento y reduciendo los efectos secundarios.

- d) Alta biocompatibilidad y estabilidad. Se ha demostrado que el LZU1 presenta una citotoxicidad mínima a concentraciones elevadas ($\geq 200 \mu\text{g/mL}$) (Pi-Martín et al., 2025). En general, se considera más seguro que muchos nanotransportadores inorgánicos. Además, la sensibilidad al pH ácido garantiza la completa descomposición en el interior celular, eliminándose sus componentes estructurales (ligandos) mediante filtración renal.

Estabilidad en biofluidos: a pesar de su sensibilidad al pH, mantiene una buena integridad estructural en plasma, lo que garantiza que el fármaco quede protegido frente a una degradación prematura en el organismo antes de llegar a su diana.

1.3 Gemcitabina como agente antitumoral

La gemcitabina (dFdC, 2',2'-difluoro-2'-desoxicitidina) (Figura 4) es un fármaco anticancerígeno análogo de la citidina (Mini et al., 2006). Su eficacia está demostrada tanto *in vivo* como *in vitro*, siendo recomendado como tratamiento de una variedad de enfermedades oncológicas, como son el cáncer metastático de páncreas, el cáncer de vejiga o el cáncer de pecho, entre otros (Albain et al., 2008; Burris et al., 1997; von der Maase et al., 2000).

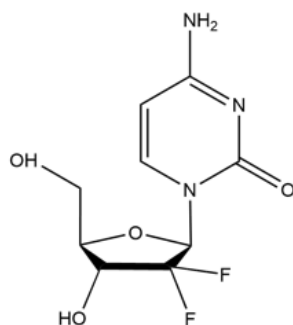


Figura 4. Estructura de la gemcitabina. Figura realizada con ChemDraw

La gemcitabina es un fármaco que requiere de un procesamiento intracelular para ejercer su función. Una vez internalizada, esta es fosforilada a gemcitabina monofosfato (dFdCMP) la cual vuelve a ser fosforilada a gemcitabina di- y tri- fosfato (dFdCDP y dFdCTP, de forma respectiva). Estos metabolitos constituyen las formas farmacológicamente activas responsables de la actividad antitumoral de la gemcitabina. Una vez generados los metabolitos activos, la gemcitabina actúa sobre múltiples dianas intracelulares, siendo su principal efecto la inhibición de la síntesis de ADN (Heinemann et al., 1988).

A pesar de sus demostrados efectos antitumorales, la gemcitabina también acarrea ciertas desventajas. Por ejemplo, su actividad tóxica antitumoral puede variar de paciente a paciente, y es posible el desarrollo de una resistencia hacia el fármaco. Estas diferencias se deben, entre otros factores, a la variabilidad en la concentración intracelular de los metabolitos derivados del profármaco, a las diferencias en la actividad de los transportadores responsables de su captación y eliminación, así como a la variabilidad de las enzimas implicadas en su metabolismo, sus dianas moleculares y los mecanismos de muerte celular. Como consecuencia, pueden producirse diferencias significativas tanto en la eficacia terapéutica como en la toxicidad del tratamiento. (Bergman et al., 2002).

1.3.1 Gemcitabina como tratamiento para MIBC

Como se ha mencionado anteriormente, la gemcitabina es el tratamiento estándar para una variedad de tumores sólidos. En el caso del cáncer de vejiga, es especialmente relevante, puesto que es uno de los más difíciles de tratar debido a su alta tasa de recurrencia y mortalidad, especialmente el cáncer de vejiga con infiltración muscular (MIBC, *Muscle Invasive Bladder Cancer*). En el caso de pacientes que padecen MIBC con metástasis, el tratamiento más común es la gemcitabina en combinación con cisplatino (Okabe et al., 2018).

Pese a su eficacia clínica, la gemcitabina como principio activo acarrea una serie de limitaciones y problemáticas asociados a su uso como antitumoral. Estas limitaciones ponen de manifiesto la necesidad de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas, como sistemas de liberación basados en *nanocarriers*, es decir, una nanomedicina.

2 OBJETIVOS

El presente trabajo tiene como finalidad el desarrollo y caracterización de una nueva nanomedicina de Gemcitabina basada en redes covalentes orgánicas (COFs) para el tratamiento del cáncer de vejiga con infiltración muscular (MIBC).

Para ello, se plantean los siguientes objetivos:

- 1) Sintetizar y caracterizar una nanopartícula basada en redes covalentes orgánicas (COFs) del tipo LZU1.
- 2) Sintetizar un nuevo profármaco mediante la funcionalización del profármaco Gemcitabina con la cadena lateral β -alanina y confirmar su estructura, así como la de los intermedios de síntesis.
- 3) Preparar y caracterizar una nueva nanomedicina de Gemcitabina obtenida mediante unión covalente del profármaco con las nanopartículas de COF-LZU1.

3 MATERIAL Y MÉTODOS

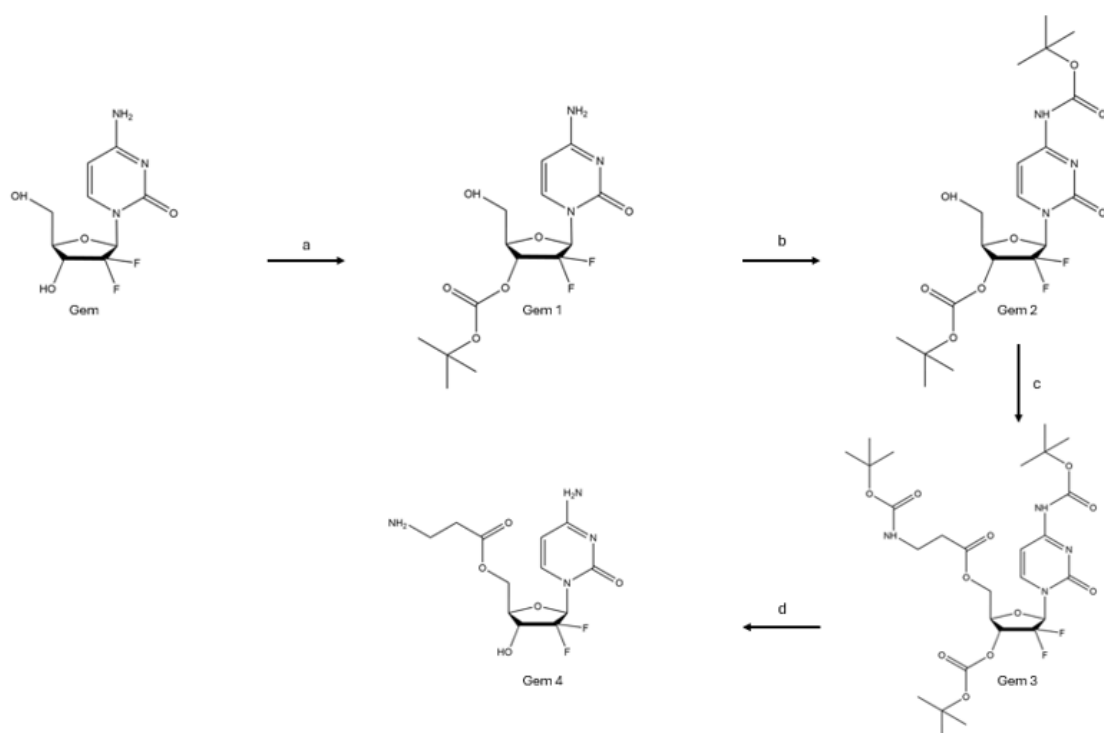
Todos los reactivos, salvo algunas excepciones, fueron comprados en Sigma-Aldrich y se usaron sin una mayor purificación. N-(tert-butoxicarbonil)-1,4-fenilendiamina (NBPDA) fue adquirido de Fluorochem. Polivinilpirrolidona (PVP) se compró a Fluka. Diclorometano (DCM) y acetonitrilo (ACN) se obtuvieron mediante un sistema de purificación de disolvente MB SPS-800.

Las purificaciones mediante columna de cromatografía se realizaron utilizando un sistema Biotage Selekt para cromatografía flash automatizada equipada con detector UV.

3.1 Síntesis de profármaco y nanopartícula

3.1.1 Síntesis de Gem-NH₂

La funcionalización del profármaco de gemcitabina con una amina primaria, el ácido 3-aminopropanoico, se dividió en un protocolo de 4 etapas (Figura 5) basadas en química orgánica de protección-desprotección mediante grupos Boc (tert-butoxicarbonil).



a. Boc-OH, Dix/H₂O (4:1), r.t., 48 h; b. Boc-OH, Dix, 37 °C, 72 h; c. DMAP, DCC, DCM, 0~r.t., 24 h; d. TFA/DCM (1/10, v/v), 0~r.t., 2 h.

Figura 5. Esquema de la síntesis del profármaco de gemcitabina-NH₂: funcionalización de la gemcitabina con β-alanina. Figura realizada con ChemDraw

3.1.1.1 PASO 1: Síntesis de carbonato de terc-butilo de (2R,3R,5R)-5-(4-amino-2-oxopirimidin-1(2H)-il)-4-amino-2-(hidroximetil)tetrahidrofurano-3-ilo

Se pesaron 2 g del fármaco gemcitabina junto con 1,82 g de Boc₂O (Dicarbonato de di-terc-butilo, 8,36 mmol) y 2 g de Na₂CO₃ (carbonato de sodio, 30,4 mmol). Estos reactivos se disolvieron en una mezcla 1,4-Dioxano/agua (5:1, v/v) y la reacción se mantuvo bajo agitación magnética a temperatura ambiente y 1000 rpm durante 48 horas.

Transcurrido ese tiempo, se realizó una cromatografía en capa fina (TLC) utilizando acetato de etilo como fase móvil para comprobar que la gemcitabina inicial se había consumido por completo.

Para la eliminación de impurezas de la reacción, esta se diluyó con agua Mili-Q y se realizó una extracción líquido-líquido con acetato de etilo, separando ambas fases mediante un embudo de decantación. Este proceso se repitió 3 veces. Posteriormente, la fase orgánica se lavó con una solución saturada de cloruro de sodio (*brine*) y se secó con sulfato de sodio anhidro, el cual fue filtrado.

El disolvente se eliminó mediante evaporación a presión reducida en rotavapor y el residuo se secó a vacío durante una noche.

Finalmente, la disolución se lavó con 100 mL de dietiléter bajo agitación magnética, se filtró y el sólido resultante se dejó a vacío durante una noche.

3.1.1.2 PASO 2: Síntesis de tert-butil (1-((2R,4R,5R)-4-((tert-butoxicarbonil)oxi)-3,3-difluoro-5-(hidroximetil)tetrahidrofuran-2-il)-2-oxo-1,2-dihidropirimidin-4-il)carbamato

Se pesaron 0,65 g del compuesto obtenido en el primer paso (denominado Gem 1 en adelante) junto con 3,9 g de Boc₂O (17,9 mmol). Estos se disolvieron en 25 mL de 1,4-dioxano y la reacción se dejó evolucionar durante 70 horas con agitación magnética a 40°C.

Transcurrido este tiempo, se realizó una TLC con acetato de etilo como fase móvil para comprobar el consumo completo de Gem 1. A continuación, se concentró la disolución mediante evaporación a presión reducida en rotavapor y el residuo se secó a vacío durante una noche.

Posteriormente, la mezcla se sometió a un procedimiento de extracción líquido-líquido análogo al del paso anterior, empleando diclorometano (DCM) como disolvente de la fase orgánica. La fase acuosa se lavó tres veces con diclorometano y, seguidamente, la fase orgánica se lavó una vez con una solución saturada de cloruro de sodio (*brine*). A continuación, se secó sobre sulfato de sodio anhidro, que fue eliminado por filtración.

La disolución resultante se concentró nuevamente mediante evaporación a presión reducida y se mantuvo bajo vacío durante una noche, obteniéndose un sólido en forma de polvo blanco.

Para mejorar el grado de purificación, el producto se sometió a cromatografía en columna sobre sílice en fase normal. Para ello, el sólido obtenido se disolvió en diclorometano, se absorbió sobre la sílice y se secó a vacío durante una noche para la preparación de la cabeza de columna.

Al día siguiente, se cargó la muestra en la columna y se realizó la separación usando acetato de etilo y hexano para una elución en gradiente. Las fracciones obtenidas se analizaron mediante TLC para identificar aquellas que contenían el producto de interés y dichas fracciones se combinaron, se concentraron mediante rotavapor y el residuo se secó a vacío durante una noche.

3.1.1.3 PASO 3: Síntesis de ((2R, 3R, 5R)-5-(4-((tert-butoxicarbonil)amino)-2-oxopirimidin-1(2H)-il)-3-((tert-butoxicarbonil)oxi)-4,4-difluorotetrahidrofuran-2-il)metil 3-((tert-butoxicarbonil)amino)propanoato

Se disolvieron 446 mg del compuesto obtenido durante el segundo paso (de ahora en adelante denominado Gem 2), 221 mg del ácido 3-tert-Butoxicarbonilaminopropiónico (1,92 mmol) y 355 mg de DMAP (4-Dimetilaminopiridina, 4,8 mmol) en 30 mL de diclorometano anhidro. A continuación, se añadió una solución de 241 mg de DCC (diclorohexilcarbodiimida, 1,92 mmol) disuelto en 5 mL de diclorometano anhidro, y se dejó reaccionar en agitación magnética durante 24 horas a temperatura ambiente.

Transcurrido ese tiempo, se hizo una TLC para comprobar el consumo completo de Gem 2.

Posteriormente, la mezcla de reacción se filtró a vacío, se concentró mediante rotavapor y el residuo se adsorbió sobre gel de sílice en fase normal, secándose a vacío durante una noche.

Al día siguiente, el producto se purificó mediante cromatografía en columna utilizando un gradiente de acetato de etilo/hexano para la elución. Las fracciones obtenidas se monitorizaron mediante TLC para identificar aquellas que contenían el producto de interés. Estas fracciones se combinaron, se concentraron mediante rotavapor y el residuo se secó a vacío durante una noche.

3.1.1.4 PASO 4: Síntesis de ((2R, 3R, 5R)-5-(4-amino-2-oxopirimidin-1(2H)-il)-4,4-difluoro-3-hidroxitetrahidrofuran-2-il)metil 3-aminopropanoato

Se disolvieron 360 mg de compuesto obtenido durante el tercer paso (ahora denominado Gem 3) en 20,6 mL de diclorometano bajo agitación magnética. A continuación, se añadieron 4,1 mL de ácido trifluoroacético (TFA) y se dejó reaccionar 1 hora a temperatura ambiente (28°C).

Pasado ese tiempo, se hizo una TLC utilizando acetato de etilo como fase móvil para comprobar que la de Gem 3 al completo había reaccionado. Después, se evaporó el disolvente mediante rotaevaporación y se añadieron 25 mL de diclorometano para lavar los restos que pudieran quedar de TFA y se rotaevaporó de nuevo. Este último paso de lavado se repitió un total de 4 veces.

El sólido resultante se secó a vacío durante una noche con sílice en fase reversa. Al día siguiente, se realizó una purificación en columna de cromatografía en fase reversa utilizando un gradiente acetonitrilo/agua como fase móvil. Se analizaron mediante TLC (utilizando metanol como fase móvil) las fracciones obtenidas y se aislaron los tubos que contenían el producto de interés (Gem 4) con una gran pureza.

Dado que en la TLC se pudo observar una pequeña impureza en la fracción de interés, esta se lavó a vacío utilizando agua Mili-Q. La disolución resultante se concentró con rotavapor y se secó a vacío durante una noche.

3.1.2 Síntesis de COF-LZU1

Primero se pesaron en un vial de microondas 50 mg de TFB (0,31 mmol), 100 mg de NBPDA (0,48 mmol) y 200 mg de PVP (Mw = 360.000). Después de añadir un imán, se cerró el vial y se purgó con N₂ a través del septum de la tapa durante un minuto. Posteriormente, se añadieron 18 mL de etanol anhidro y se introdujo la solución en un baño de ultrasonidos hasta que los ligandos estuvieron disueltos.

Se añadieron 2 mL de TFA, y se llevó a cabo la síntesis en un dispositivo microondas Biotage Initiator+ durante 2 horas, a 600 rpm y 20°C bajo condiciones de refrigeración.

Una vez terminada la síntesis, la muestra restante se trasvasó a un tubo de centrifuga Beckman Coulter. A continuación, se centrifugó la muestra durante 20 minutos a 20.000 rpm y 20°C.

Al finalizar la centrifugación, se descartó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido con 18 mL de etanol y 2 mL de TEA (trietilamina). Se sonicó la disolución resultante hasta la disolución del pellet y se realizó una centrifugación con los mismos parámetros de antes. Este paso de lavado se repitió 2 veces más, haciendo un total de tres lavados.

Por último, se eliminó el sobrenadante de la última centrifugación y se dejó la muestra secando a vacío. Al día siguiente, se pesó el polvo obtenido.

Este procedimiento se repitió un total de tres veces y se mezclaron los resultados de los lotes para poder tener la suficiente cantidad de muestra para la caracterización y la síntesis de la nanomedicina.

3.1.3 Síntesis de COF-LZU1-Gem

En un matraz de dos bocas se pesaron 51,65 mg de Gem 4 previamente liofilizada y se sometieron a vacío a 46 °C. Paralelamente, se dejaron secar a vacío 50 mg de COF-LZU1. Ambos compuestos se mantuvieron bajo vacío durante 3 horas. Transcurrido ese tiempo, los materiales se disolvieron en 20 mL de acetonitrilo (ACN) y se incorporaron 150 µL de ácido acético, que actuó como catalizador. La reacción se dejó evolucionar en una placa de agitación magnética durante 18 horas a 750 rpm a 55°C, bajo atmósfera inerte.

Una vez completada la reacción, la mezcla se filtró a vacío utilizando 150 mL de ACN y 100 mL de metanol. El filtrado se recuperó y se utilizó para determinar la cantidad de profármaco que no se había incorporado a la nanomedicina. Por su parte, el sólido correspondiente a la nanomedicina COF-LZU1-Gem se recuperó y se dejó secar a vacío durante una noche; al día siguiente se pesó.

3.2 Caracterización de profármaco y materiales

3.2.1 Caracterización del profármaco Gem-NH₂

3.2.1.1 ¹H-RMN Y ¹³C-RMN

Para confirmar la estructura basada en gemcitabina obtenida en cada paso, se registró el espectro de ¹H-RMN y ¹³C-RMN de cada intermedio de reacción del profármaco. Así, mediante espectroscopía de ¹H-RMN se identificaron los entornos químicos de los protones presentes, y la espectroscopía ¹³C-RMN proporcionó información acerca de los tipos de carbonos y la estructura química del material. Además, para el último paso se obtuvo un espectro 2D-HSQC.

Para la preparación de las muestras, se disolvieron 10 mg de cada intermedio de reacción del profármaco en 1 mL de dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d₆), excepto en el caso del último paso, cuyo producto se disolvió en metanol deuterado (MeOH-d₄). Posteriormente, la disolución se transfirió a tubos de RMN de 5 mm y la caracterización fue llevada a cabo por el servicio de Resonancia Magnética Nuclear del ITQ.

Los espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN se registraron en un espectrómetro de alta resolución en fase líquida Bruker Avance 300, (300 MHz para ^1H y 75 MHz para ^{13}C -RMN), estando el equipo equipado con gradientes de campo magnético en el eje z. Los desplazamientos químicos se expresan en ppm (δ).

3.2.1.2 HPLC-MS

La identificación y caracterización del profármaco se realizó mediante cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS). Las muestras se prepararon mediante dilución en metanol.

Las medidas se realizaron en un equipo HPLC-MS Shimadzu LCMS-8040 (Espectrómetro de Masas Triple Cuadrupolo y Sistema UHPLC 105 MPA).

La identificación del profármaco y de sus posibles productos de transformación se efectuó a partir de sus tiempos de retención y de los valores de m/z observados en los espectros obtenidos.

3.2.2 Caracterización de COF-LZU1

3.2.2.1 Difracción de Rayos X

La difracción de rayos X (XRD) es una técnica utilizada para determinar la estructura cristalina de un material. Se basa en la dispersión de fotones de rayos X por los átomos de la red cristalina cuando esta es irradiada por un haz monocromático. Esta dispersión se produce en ángulos que dependen de las distancias entre los planos cristalinos y mediante la Ley de Bragg, expresada en la Ecuación (1), es posible obtener la distancia entre los planos, obteniendo así información sobre la estructura del material.

$$\lambda n = 2d \sin \theta \quad (1)$$

Donde n es un número entero (orden de reflexión), λ es la longitud de onda de los rayos X, d es la distancia característica entre los planos de la muestra y θ es el ángulo entre el haz incidente y el reflejado (Ramachandran & Beaudoin, 2000).

El resultado de la síntesis de COF-LZU1 en forma de polvo seco se molió en un mortero y, debido a la pequeña cantidad que suponía, se colocó sobre un portamuestras de aluminio de fondo cero previamente limpiado y nivelado. Para la confirmación de la estructura COF-LZU1 se utilizó un difractómetro Phillips X'pert-3719, realizando barridos desde 2θ de $0,7^\circ$ a 70° .

3.2.2.2 Adsorción y desorción de N_2

El área de las nanopartículas COF-LZU1 se determinó mediante adsorción-desorción de nitrógeno utilizando un equipo Micrometrics ASAP 2420. Las muestras se deshidrataron realizando un pretratamiento a 100°C a vacío para eliminar humedad y especies adsorbidas.

El área superficial específica se calculó mediante el método BET (Brunauer, Emmet y Teller) a 77K. Este método se basa en la medición del volumen (o el cambio de presión) de un gas antes y después de adsorberse a una muestra (Sing, 2001). Por otro lado, el volumen de poro se calculó mediante el método BJH (Barret-Joyner-Halenda) utilizando la rama de desorción de la isoterma de adsorción-desorción de N_2 .

3.2.2.3 Microscopía electrónica (TEM y FESEM)

Para observar la morfología y estructura de las nanopartículas COF-LZU1, se utilizó microscopía TEM y FESEM.

La microscopía electrónica de transmisión (TEM, *Transmission Electron Microscopy*) se basa en la formación de imágenes mediante la transmisión de un haz de electrones a través de una muestra ultrafina. Este haz se genera gracias a un cañón de electrones y se enfoca en línea recta para atravesar la muestra mediante un condensador electromagnético. Gracias a su alta resolución, es posible observar la estructura interna de muestras a escala nanométrica (Bunker et al., 2008; Tortora et al., 2007).

Para preparar la medición, se disolvió una pequeña cantidad de COF-LZU1 sobre diclorometano y esta suspensión se depositó sobre una rejilla TEM recubierta con película de carbono. Después, se dejó evaporar el disolvente y se llevó a cabo la medición utilizando un equipo Philips CM10 a 100 kV.

La microscopía electrónica de barrido por emisión de campo (FESEM, *Field Emission Scanning Electron Microscopy*) es una tecnología que permite observar la microestructura de los materiales. Sigue los mismos principios que la microscopía electrónica de barrido (SEM, *Scanning Electron Microscopy*) solo que utilizando una fuente de electrones distinta. En SEM, un haz de electrones emitido reacciona con la muestra y produce electrones secundarios y retrodispersados, los cuales son detectados para formar una imagen de la muestra en un monitor. La fuente de electrones utilizada en SEM es termiónica, es decir, un filamento se calienta hasta liberar electrones. En el caso del FESEM, se utiliza un cañón de emisión de campo (*field emission gun*) que proporciona un haz de electrones muy focalizado, lo cual mejora la resolución (Abd Mutalib et al., 2017).

La muestra se preparó fijándola sobre un portamuestras metálico utilizando un recubrimiento de platino para tener una buena conexión eléctrica. La medición se realizó utilizando el equipo instalado en el Servicio de Microscopía de la UPV (ULTRA 55 de la marca ZEISS).

3.2.2.4 Dispersión de luz dinámica (DLS) y Potencial ζ

La dispersión de luz dinámica (DLS, *Dynamic Light Scattering*) es una técnica empleada para estudiar la difusión de macromoléculas en solución, proporcionando su coeficiente de difusión. El coeficiente de difusión depende de la forma y el tamaño de las macromoléculas, por lo que permite calcular el radio hidrodinámico. Además, también permite cuantificar el grado de heterogeneidad de la muestra mediante el índice de polidispersidad (PDI, *Polydispersity Index*) (Stetefeld et al., 2016).

Por otro lado, el potencial Zeta (ζ) es el potencial electrostático que se genera ante la diferencia de carga entre los iones adsorbidos a la nanopartícula y aquellos presentes en el medio de dispersión. Este parámetro proporciona información sobre la estabilidad coloidal de las suspensiones, ya que valores absolutos elevados de potencial ζ indican una mayor repulsión electrostática entre partículas y, por tanto, una menor tendencia a la agregación. Durante la medición se aplica un campo eléctrico a la muestra y se determina la movilidad electroforética de las nanopartículas, a partir de la cual se calcula el potencial ζ .

Las muestras se prepararon disolviendo 0,5 mg en 100 mL de etanol, en el caso de la medida de DLS, y en agua para la medida del potencial ζ . Ambas mediciones se realizaron utilizando el mismo equipo Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK). El análisis se llevó a cabo a 25 °C y un ángulo de dispersión de 173° (Clogston & Patri, 2011).

3.2.3 Caracterización de COF-LZU1-Gem

3.2.3.1 *DLS y Potencial ζ*

En este caso, la medición de DLS Y potencial ζ del anclaje COF-LZU1-Gem se llevó a cabo de forma análoga a la descrita para COF-LZU1. Se disolvieron 0,5 mg de la nanomedicina en 100 mL de etanol para DLS y en 100 mL de agua para la medida del Potencial ζ . Ambas mediciones se llevaron a cabo con un equipo Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK).

3.2.3.2 *HPLC-UV*

La cantidad de profármaco Gem 4 incorporado en la nanomedicina se calculó de forma indirecta analizando cuanta cantidad no había reaccionado realizando una medición HPLC-UV. Para ello, se recuperó el sobrenadante de la filtración a vacío que se realizó al terminar la síntesis de la nanomedicina. Este se concentró en rotavapor y se liofilizó durante una noche. Al día siguiente se pesó la cantidad de muestra obtenida (64 mg), se redisolvió en 10 mL de metanol apto para HPLC.

A partir de esta muestra se preparó una disolución mediante dilución 1:2 en metanol. Esta disolución se introdujo en un dispositivo HPLC-UV Agilent 1220 Infinity an analytical column (Mediterranean Sea C18, 3 μ m, 100 x 21 mm, Teknokroma).

Los disolventes utilizados fueron acetonitrilo/TFA a pH 3 y H₂O/TFA a pH 4,5 en un método isocrático 90% acetonitrilo/TFA + 10% H₂O/TFA. La estabilización de la columna se llevó a cabo en tres pasos: primero con un caudal de 0,1 mL/min, después se aumentó el caudal a 0,3 mL/min y el caudal final y el que se utilizó como flujo de método fue de 0,6 mL/min. La detección se realizó mediante un detector de arreglo de diodos (DAD) ajustado a una longitud de onda de 267 nm, utilizando un ancho de banda de 4 nm. Se realizaron 3 repeticiones por disolución, inyectando 5 μ L en cada caso y realizando purgas con metanol entre cada medición.

Paralelamente, se realizó una curva de calibrado de gemcitabina. Se prepararon disoluciones de gemcitabina en metanol a concentraciones de 0,15; 0,3; 0,6; 0,9; 1,2 y 1,5 mg/mL. Cada disolución se midió mediante HPLC-UV un total de tres veces con los parámetros especificados anteriormente, se obtuvo el área del pico de cada repetición, y se calculó el promedio de estas tres. Se realizó una curva de calibrado relacionando la concentración de gemcitabina en mg/mL con el promedio de las áreas cromatográficas, obteniéndose la siguiente ecuación:

$$y = 6001,6 \cdot x \quad (2)$$

donde x representa la concentración de gemcitabina en mg/mL e y el promedio de las áreas de los picos cromatográficos.

Posteriormente, se determinaron las áreas de los picos correspondientes a las muestras y se calculó el valor medio de cada una. Dichos valores se sustituyeron en la Ecuación (2) para así poder obtener

la concentración de gemcitabina presente en cada muestra. A continuación, la cantidad de gemcitabina presente en el sobrenadante se calculó mediante la Ecuación (3):

$$mg_2 = x \cdot F_d \cdot V_i \quad (3)$$

donde mg_2 corresponde a la cantidad de gemcitabina en miligramos presente en el sobrenadante, F_d es el factor de dilución aplicado y V_i el volumen de disolución de la muestra.

Se empleó un factor de 1:2 mientras que el volumen de disolución fue de 10 mL de metanol.

La cantidad de gemcitabina anclada al COF-LZU1 se obtuvo restando los miligramos de gemcitabina presentes en el sobrenadante a la cantidad inicial añadida a la síntesis (51,65 mg). Así, el porcentaje de gemcitabina anclado se calculó como la relación entre la masa de gemcitabina anclada y la masa inicial utilizada en la reacción multiplicados por 100 para expresarla en porcentaje.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Caracterización del profármaco

4.1.1 ^1H -RMN y ^{13}C -RMN

La caracterización por RMN de ^1H y ^{13}C permite comprobar si los productos obtenidos al finalizar cada fase se corresponden con su intermedio de reacción.

En el espectro correspondiente a Gem 1 (Figura 6), es posible extraer las siguientes señales (300 MHz, DMSO- d_6): 7,64 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H); 7,43 (d, $J = 9,0$ Hz, 2H); 6,22 (t, $J = 9,3$ Hz, 1H); 5,81 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H); 5,26 (t, $J = 5,7$ Hz, 1H); 5,17 (m, 1H); 4,15 (m, 1H), 3,69 (m, 2H); 1,46 (s, 9H).

En dicho espectro es posible observar un singlete intenso cuyo desplazamiento coincide con el de una cadena alifática (1,46 ppm). Este se corresponde a los nueve protones del grupo tert-butilo incorporado en este paso, confirmando la presencia del grupo protector Boc. También es posible observar dos dobletes cuya constante de acoplamiento es la misma ($\delta \approx 5,81$ y $\delta \approx 7,64$), situándose de este modo en carbonos vecinos. Estas señales se corresponden con los protones de la base pirimidínica, pues son los únicos protones que están contiguos y pueden generar una señal a un desplazamiento tan alto. La señal presente a 3,69 ppm podría corresponderse con los protones del carbono 5' del azúcar, pues integra para dos protones y entra dentro de la zona característica de aparición de cadenas alifáticas. Del mismo modo, teniendo en cuenta el desplazamiento químico, podemos asignar las señales a 4,15 ppm y 5,17 ppm a los protones H-4' y H-3' respectivamente del azúcar, pues el flúor del carbono 2' afecta a los desplazamientos químicos.

Podemos inferir, por lo tanto, que la señal a 5,26 ppm se corresponderá con el protón anomérico y las señales a 6,22 ppm y 7,43 ppm se corresponderán con los protones que acompañan a los halógenos, es decir, a los protones de los grupos hidroxilo y amino.

Teniendo en cuenta el conjunto de la información presentada, es posible afirmar que el resultado del primer paso de la síntesis del profármaco de gemcitabina se corresponde con el intermedio deseado.

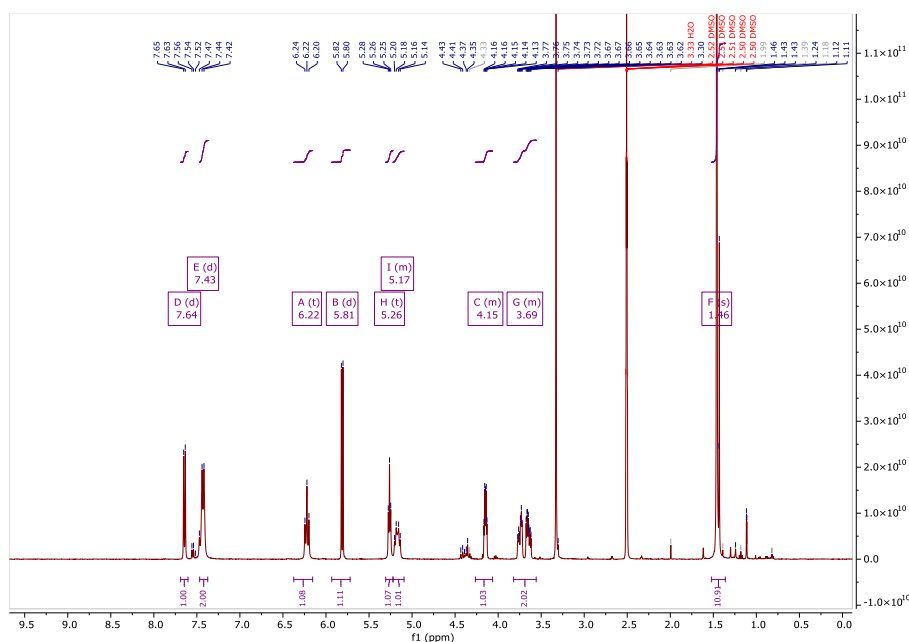


Figura 6. ^1H -RMN del resultado de la síntesis de Gem 1

Continuando con el espectro del producto de la reacción Gem 2 (Figura 7), podemos tener en cuenta las siguientes señales (300 MHz, DMSO-d_6): 10,57 (s, 1H); 8,11 (d, 1H); 7,09 (d, 1H); 6,28 (t, 1H); 5,32 (m, 1H); 5,20 (m, 1H); 4,24 (m, 1H); 3,71 (m, 2H); 1,47 (d, 18H).

En este caso, podemos observar que las señales son muy similares a las obtenidas en el espectro anterior, pues el único cambio que ha sucedido es la protección del grupo amino de la citosina con un grupo Boc. De esta manera, podemos observar que el cambio más notable es la señal presente a $\delta \approx 1,47$ ppm, que ahora integra por 18 hidrógenos. Esto se debe precisamente a la incorporación de los hidrógenos de este grupo Boc, los cuales poseen el mismo entorno químico, por lo que la misma señal que antes integraba por 9 hidrógenos, ahora integra el doble. Además, hay una nueva señal a 10,57 ppm, la cual probablemente se corresponda con el hidrógeno restante del grupo amino, ya que es posible que la sustitución de un protón del grupo amino de la citosina por el grupo Boc haya provocado que un desplazamiento en la señal del protón restante.

Así, es posible verificar la estructura obtenida, por lo que el producto es apto para continuar con la síntesis.

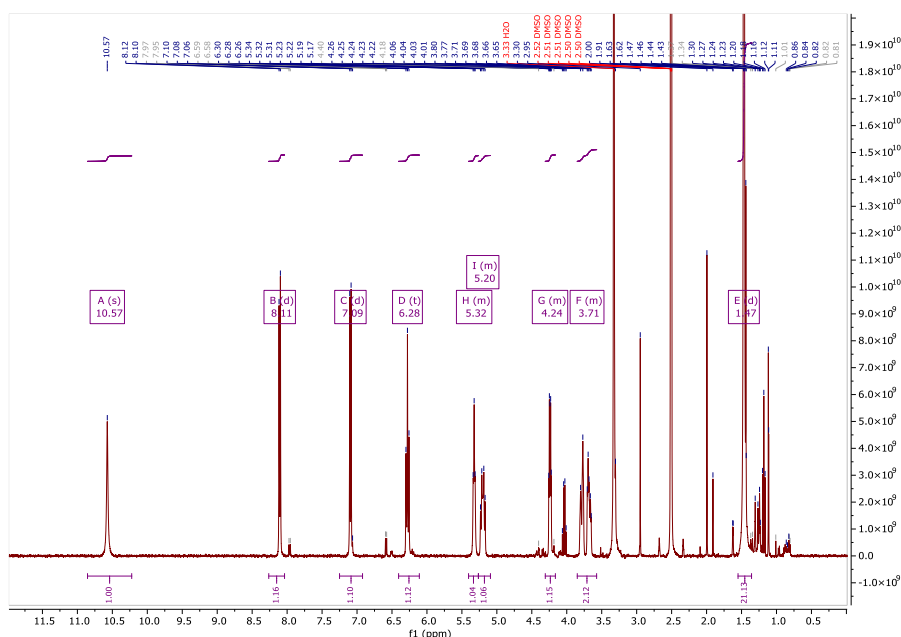


Figura 7. ^1H -RMN del resultado de la síntesis de Gem 2

Para el tercer paso de la síntesis (Figura 8) las señales obtenidas fueron (300 MHz, DMSO-d_6): 1,42 (s, 9H), 1,52 (d, 18H); 3,24 (m, 2H); 4,48 (m, 3H); 5,38 (m, 1H); 6,36 (t, 1H); 6,94 (m, 1H); 7,19 (d, 1H), 8,05 (d, 1H); 10,65 (s, 1H).

En este nuevo paso, el cambio en las señales obtenidas es más notable. Por ejemplo, aparece una señal a 1,42 ppm que integra por 9 hidrógenos. De forma similar al caso anterior, esta se corresponde con el recién incorporado grupo Boc de la cadena lateral R. Ya que este enlace se ha dado mediante unión al oxígeno de un alcohol, la señal de ese protón ya no está presente. Además, también aparece una nueva señal asociada al protón del grupo amino de la cadena R a 7,19 ppm, así como la señal de uno de los grupos CH_2 de esta a 4,48 ppm. Sin embargo, la señal del otro grupo CH_2 de la cadena lateral está debajo de la señal del DMSO-d_6 , por lo que no fue posible integrarla.

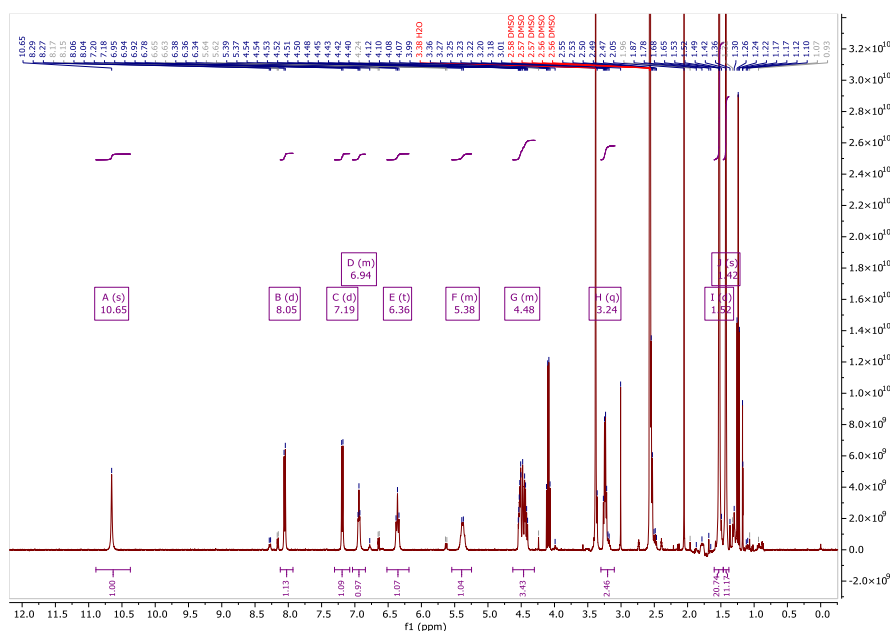


Figura 8. ^1H -RMN del resultado de la síntesis de Gem 3

Finalmente, para la síntesis del producto final, Gem 4, en el espectro de ^1H -RMN (Figura 9) se detectaron las siguientes señales (300 MHz, $\text{MeOH-}d_4$): 2,70 (m, 2H); 3,14 (m, 2H); 4,07 (m, 1H); 4,21 (m, 1H); 4,38 (m, 1H); 4,45 (m, 1H); 6,05 (m, 2H); 7,74 (d, 1H).

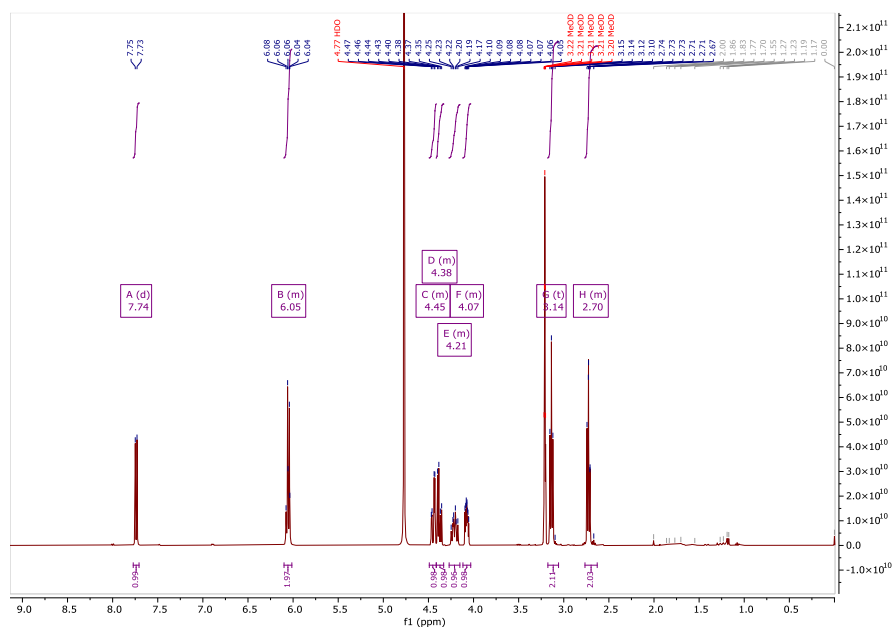


Figura 9. ^1H -RMN del resultado de la síntesis de Gem 4

Sin embargo, ya que la resolución del resultado de ^1H -RMN fue relativamente baja y el uso de metanol deuterado como dispersante cambia considerablemente el desplazamiento químico con respecto a los resultados de las otras síntesis, para facilitar la asignación de señales es necesario analizar a su vez el espectro de ^{13}C -RMN (Figura 10). En este, podemos encontrar las siguientes

señales (75 MHz, MeOH-d₄): 30,69; 34,86; 62,95; 70,71; 78,94; 94,71; 122,02; 124,59; 143,79; 149,96; 161,71; 170,44.

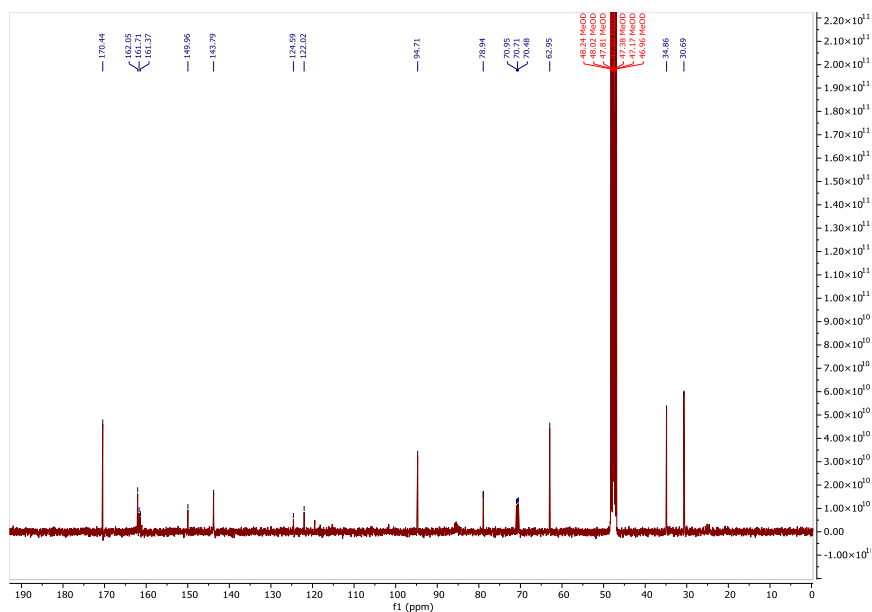


Figura 10. ¹³C-RMN del resultado de la síntesis de Gem 4

Asimismo, esta información se integró en una representación 2D-HSQC (Figura 11). Gracias a esta, podemos determinar que la señal del espectro de protón a 7,74 ppm y la señal a 6,05 ppm se corresponde con los protones de la base pirimidínica. Como es evidente, no hay señales en torno a 1,5 ppm pues todos los grupos Boc han desaparecido después de la desprotección realizada en este paso de síntesis. El resto de las señales detectadas en este espectro pueden ser asignadas a CH₂ o bien a CH presentes a lo largo del profármaco o de la cadena lateral.

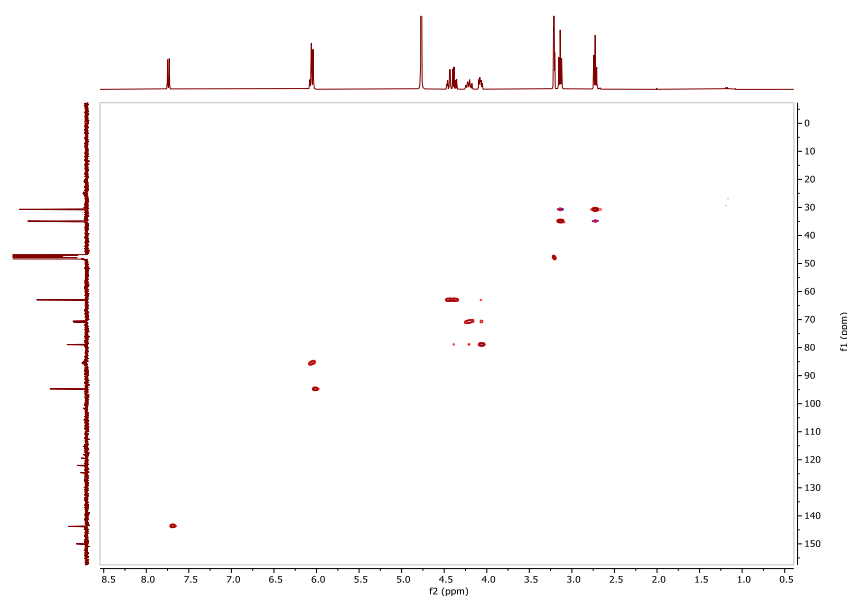


Figura 11. 2D-HSQC del resultado de la síntesis de Gem 4

4.1.2 HPLC-MS

La determinación de la masa del profármaco se llevó a cabo gracias a un sistema HPLC acoplado a espectrometría de masas triple cuadrupolo operando en modo de ionización por electrospray (ESI). En el espectro obtenido, se observó el ion $[M+H]^+$ correspondiente a la fórmula molecular $C_{12}H_{18}F_2N_4O_6$. El valor de m/z calculado teóricamente fue de 334,232, mientras que el valor experimental determinado fue de 334,166, mostrando una concordancia adecuada entre ambos valores y confirmando, junto a los datos anteriores, la identidad del compuesto analizado.

4.2 Caracterización de la nanopartícula COF-LZU1

4.2.1 Difracción de Rayos X (XRD) de COF-LZU1

Para comprobar la estructura cristalina de la nanopartícula sintetizada, se analizó el difractograma generado mediante difracción de rayos X (Figura 12). En este podemos observar picos de difracción bien definidos, por lo que hay regiones cristalinas en la muestra. Asimismo, también está representada la simulación de un patrón. Hay concordancia entre la posición de los picos medidos y los simulados, lo que indica que la fase cristalina obtenida se corresponde con la estructura propuesta en la simulación.

Por otro lado, al comparar el material con la caracterización llevada a cabo por Pi-Martín et al., (2025), se observa una coincidencia entre ambos patrones. Esta coincidencia confirma la formación de COF-LZU1 con éxito. Además, la presencia de señales de difracción definidas demuestra la estructura cristalina ordenada del material.

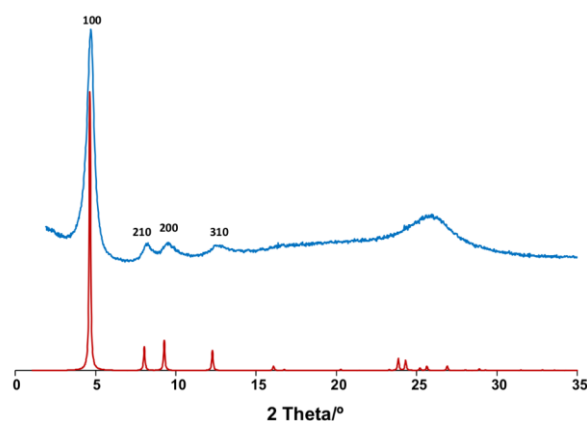


Figura 12. XRD en polvo de la nanopartícula COF-LZU1 (azul) y el patrón simulado (rojo)

4.2.2 Adsorción y desorción de N_2

Mediante absorción y desorción de nitrógeno fue posible determinar la superficie específica y el volumen y tamaño medio de poro del material.

El COF-LZU1 presentó una superficie específica BET de 65,2 m^2/g , mientras que el volumen de poro fue de 0,276 cm^3/g . El área calculada posee un valor relativamente bajo, teniendo en cuenta que se han reportado síntesis del mismo material que producían partículas del orden de incluso más de

200 nm (Pi-Martín et al., 2025). En cuanto al volumen y tamaño de poro, fueron menores de lo esperado basado en otras descripciones del material (Ding et al., 2011). Esto indica que, aunque como resultado de la síntesis se haya obtenido el producto deseado, la estructura de este es menos cristalina de lo que cabría esperar teniendo en cuenta la naturaleza reticular del material, probablemente debido a la mezcla de lotes que fue necesaria para tener la suficiente cantidad.

Por otro lado, la isoterma de adsorción-desorción del COF-LZU1 (Figura 13) presenta un comportamiento característico de una isoterma de tipo IV según la clasificación de la IUPAC, lo que indica que el material es mesoporoso. Sin embargo, cabe destacar que el incremento principal de adsorción de nitrógeno ocurre a altas P/P_0 , lo cual puede ser explicado por la baja superficie específica disponible, mientras que, a bajas presiones relativas, la adsorción de nitrógeno es limitada. Presenta una histéresis, asociada a la diferencia que se produce entre la adsorción y la desorción. Esta es de tipo H1, típicamente asociada con materiales que tienden a agregarse o con materiales compuestos por esferas dispuestas de forma uniforme, aunque esta no es muy marcada y se da principalmente a altas presiones relativas. Este tipo de isoterma sumada a la presencia de una histéresis respalda la naturaleza mesoporosa del material COF-LZU1.

En conjunto estos resultados son coherentes con la naturaleza reticular del material.

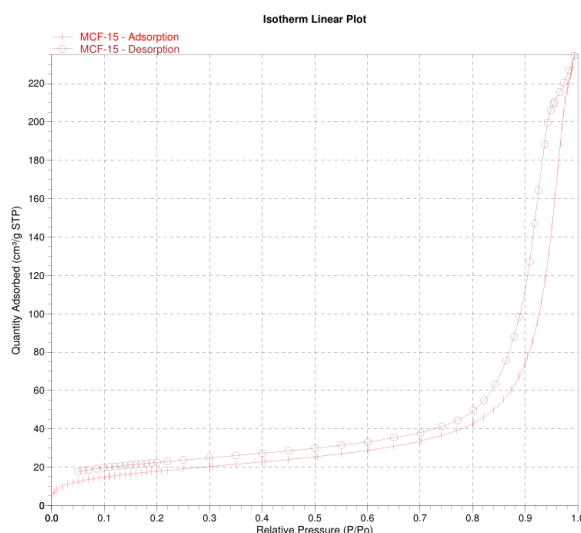


Figura 13. *Isoterma de adsorción-desorción de COF-LZU1*

4.2.3 Microscopía electrónica

La caracterización morfológica del COF-LZU1 se llevó a cabo mediante TEM y FESEM para analizar la morfología externa y la estructura interna del material.

La imagen obtenida mediante FESEM (Figura 14, A) muestra que el material COF-LZU1 sintetizado está compuesto por partículas con una distribución relativamente uniforme, y la superficie observada muestra una textura rugosa la cual es explicada por la naturaleza porosa característica de este tipo de redes covalentes orgánicas. Las partículas muestran una morfología esférica y homogénea, con un diámetro de aproximadamente, entre 200 y 300 nanómetros. Aunque en general la distribución de tamaño es homogénea, puede observarse cierta agregación debido la

tendencia de las partículas a agregarse para estabilizar las interacciones π - π entre capas adyacentes (Ding et al., 2011).

Por otro lado, en la imagen TEM (Figura 14, B) se puede observar una morfología en forma de estrella, en concordancia con lo descrito en la literatura (Pi-Martín et al., 2025). Asimismo, se aprecia cierto grado de agregación entre partículas, también de acuerdo con los resultados de la microscopía FESEM.

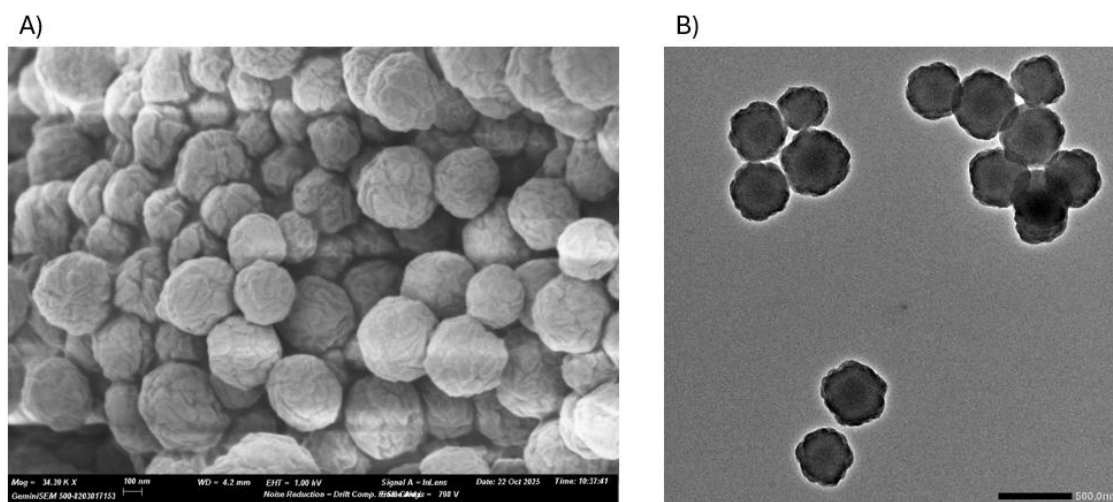


Figura 14. Imágenes FESEM (A) Y TEM (B) de las nanopartículas COF-LZU1

4.2.4 DLS y potencial ζ

El tamaño de las nanopartículas COF-LZU1 se determinó mediante dispersión dinámica de luz (DLS), obteniendo un valor de *Z-average* de 209,2 nm. El tamaño hidrodinámico de nanopartícula es muy relevante en el diseño de *nanocarriers* ya que nanopartículas con tamaños superiores a 200 nm tienden a acumularse en el hígado y en los riñones, mientras que nanopartículas con un diámetro menor a 5 nm son filtradas por el riñón antes de llegar a su sitio de actuación (Blanco et al., 2015). De esta manera, el tamaño del COF-LZU1 es lo suficientemente grande para evitar su eliminación por filtración renal, pero está cerca del límite superior de tamaño compatible con su acumulación en el hígado.

El índice de polidispersidad (PDI) fue de 0,041, lo cual indica una población muy homogénea ya que está muy por debajo de 0,3. Únicamente valores de PDI mayores de 0,7 pueden considerarse como una distribución del tamaño de partículas muy amplia. Como podemos observar, este está lejos de ser el caso de las nanopartículas estudiadas en el presente trabajo. De hecho, valores de PDI menores de 0,5; como ocurre para la medición de estas nanopartículas de COF-LZU1, se consideran como altamente monodispersos. Esto sugiere que no hay una agregación ya que no hay subpoblaciones de tamaños diferenciados: hay una alta uniformidad en el tamaño de las partículas y una buena reproducibilidad del proceso de síntesis (Danaei et al., 2018).

Por otro lado, el potencial ζ de las nanopartículas fue de -17,6 mV, lo que indica una carga superficial negativa en un medio acuoso. Según la literatura, un potencial ζ de entre -10 y +10 mV se considera neutral, mientras que un material con un potencial menor de -30 mV se considera muy aniónico (Clogston & Patri, 2011). Así, podemos considerar que el COF-LZU1 posee una estabilidad moderada, con repulsión entre las nanopartículas por la carga negativa, lo cual dificulta la agregación de estas.

Estos valores son relevantes ya que el tamaño de partícula y el PDI de un *nanocarrier* son características fisicoquímicas que resultan determinantes para la captación celular.

4.3 Caracterización de la nanomedicina COF-LZU1-Gem

4.3.1 DLS y potencial ζ

En este caso, el valor de *Z-average* obtenido para la nanomedicina COF-LZU1-Gem fue de 814,6 nm, mientras que el PDI fue de 0,690 y el potencial ζ fue de -6,91 mV.

Como podemos observar, el tamaño hidrodinámico es muy superior al obtenido para la nanopartícula. Un aumento de tamaño más de 600 nm no puede deberse únicamente a que la incorporación de gemcitabina haya aumentado las dimensiones de la nanomedicina en su conjunto, pues es una diferencia demasiado notable. Teniendo en cuenta la disminución de potencial ζ de -17,6 mV a -6,91 mV y al aumento del PDI con respecto a COF-LZU1, lo más probable es que haya habido una agregación que causara que las nanopartículas se unieran, lo que llevó a que el detector interpretara la agregación de varias nanopartículas como una sola, por lo que el diámetro medido es considerable.

Teniendo en cuenta la estructura de la gemcitabina, la explicación más plausible es que, debido al uso de etanol como dispersante, el grupo amino de la base pirimidínica de la gemcitabina se cargó positivamente, lo cual disminuyó la carga negativa total de la molécula y redujo la repulsión electrostática entre ellas, promoviendo así una cierta agregación, lo que da lugar a la formación de pequeños oligómeros de partículas. Por lo tanto, no podemos saber exactamente el tamaño de COF-LZU1-Gem sintetizadas por esta técnica, aunque podemos inferir que no dista mucho de aquel medido para COF-LZU1.

4.3.2 HPLC-UV

Mediante HPLC-UV fue posible analizar el porcentaje de gemcitabina anclado al COF-LZU1 en la reacción de síntesis de la nanomedicina analizando el sobrenadante. Así, ha sido posible calcular un área promedio de los picos cromatográficos de 13109, una concentración de gemcitabina presente en el sobrenadante de 2,18 mg/mL, lo cual se traduce a 43,68 mg de gemcitabina no anclada y 7,97 mg de gemcitabina anclada.

Estos cálculos se pudieron llevar a cabo gracias a la recta de calibrado llevada cabo mediante la medición HPLC-UV de concentraciones variables de gemcitabina (Figura 15).

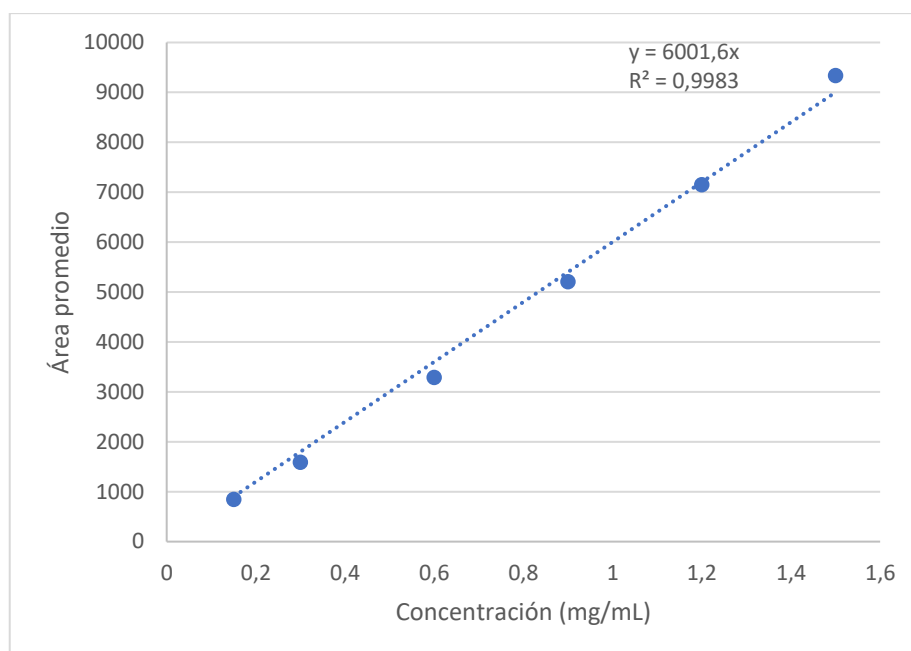


Figura 15. **Recta de calibrado de gemcitabina** obtenida por HPLC-UV a partir de la relación entre la concentración de gemcitabina (mg/mL) y el área promedio de los picos cromatográficos

En cuanto a la gemcitabina anclada, de los 51,65 mg añadidos para la reacción de síntesis, únicamente se anclaron al COF-LZU1 7,97 mg de gemcitabina, es decir, un 15,42 % en peso.

En comparación con otros sistemas descritos, el porcentaje es bajo. Por ejemplo, García-García et al. (2020) describieron un sistema de *nanocarriers* formado por nanopartículas de poli (ϵ -caprolactona) para encapsular gemcitabina, lo cual les proporcionó un porcentaje de gemcitabina encapsulada de $87,468 \pm 0,332$ % en peso. Sin embargo, cuando comparamos con otros sistemas en los que el fármaco se une covalentemente, la cantidad de gemcitabina incorporada es elevada. Así, Botella et al. (2011) incorporaron camptotecina en nanopartículas de sílice mediante unión éster, con una concentración máxima del 10 % en peso. Nuestro resultado es más comparable al obtenido por Cabrera-García et al. (2019), quien incorporó camptotecina en el MOF MIL-101 mediante enlace éster, con una concentración máxima del 18 % en peso. En este sentido, hay que tener en cuenta que la gemcitabina es muy hidrofílica, lo que puede resultar en una mala difusión en matrices hidrofóbicas, como es el caso de COF-LZU1. Además, como ya ha quedado demostrado mediante la medida de adsorción y desorción de nitrógeno, la superficie específica de las partículas es limitada es especialmente pequeña, lo que reduce su capacidad de incorporar gemcitabina. A pesar de ello, la cantidad de gemcitabina en las partículas de COF-LZU1 es suficiente para el estudio preclínico de esta nueva nanomedicina, tanto en sistemas in vitro como en modelos in vivo (Botella et al., 2011).

5 CONCLUSIONES

Los ensayos llevados a cabo en el presente trabajo han permitido extraer las siguientes conclusiones:

- 1) Ha sido posible sintetizar una nanopartícula de tipo COF, en específico COF-LZU1, así como su caracterización. Los resultados de dicha caracterización sugieren una nanopartícula reticular cristalina, mesoporosa, con una distribución uniforme y baja agregación debido a la negatividad de su potencial ζ , además de poseer una baja superficie disponible.
- 2) Mediante un protocolo de cuatro etapas basado en química orgánica de protección-desprotección, es posible la síntesis de un nuevo profármaco de gemcitabina con la cadena lateral β -alanina, habiendo sido estas estructuras y sus intermedios de síntesis comprobados y verificados mediante ^1H -RMN, ^{13}C -RMN y HPLC-MS.
- 3) Finalmente, el anclaje del profármaco de gemcitabina a la nanopartícula COF-LZU1 mediante unión covalente proporciona una nueva nanomedicina COF-LZU1-Gem, con un contenido en gemcitabina relativamente alto, y válido para estudios preclínico in vitro e in vivo.

6 BIBLIOGRAFÍA

- Abd Mutalib, M., Rahman, M. A., Othman, M. H. D., Ismail, A. F., & Jaafar, J. (2017). Chapter 9— Scanning Electron Microscopy (SEM) and Energy-Dispersive X-Ray (EDX) Spectroscopy. En N. Hilal, A. F. Ismail, T. Matsuura, & D. Oatley-Radcliffe (Eds.), *Membrane Characterization* (pp. 161-179). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63776-5.00009-7>
- Albain, K. S., Nag, S. M., Calderillo-Ruiz, G., Jordaan, J. P., Llombart, A. C., Pluzanska, A., Rolski, J., Melemed, A. S., Reyes-Vidal, J. M., Sekhon, J. S., Simms, L., & O'Shaughnessy, J. (2008). Gemcitabine plus Paclitaxel versus Paclitaxel monotherapy in patients with metastatic breast cancer and prior anthracycline treatment. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 26(24), 3950-3957. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.11.9362>
- Baboci, L., Capolla, S., Di Cintio, F., Colombo, F., Mauro, P., Dal Bo, M., Argenziano, M., Cavalli, R., Toffoli, G., & Macor, P. (2020). The Dual Role of the Liver in Nanomedicine as an Actor in the Elimination of Nanostructures or a Therapeutic Target. *Journal of Oncology*, 2020, 4638192. <https://doi.org/10.1155/2020/4638192>
- Bergman, A. M., Pinedo, H. M., & Peters, G. J. (2002). Determinants of resistance to 2',2'-difluorodeoxycytidine (gemcitabine). *Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy*, 5(1), 19-33. [https://doi.org/10.1016/s1368-7646\(02\)00002-x](https://doi.org/10.1016/s1368-7646(02)00002-x)
- Bhunja, S., Deo, K. A., & Gaharwar, A. K. (2020). 2D Covalent Organic Frameworks for Biomedical Applications. *Advanced Functional Materials*, 30(27), 2002046. <https://doi.org/10.1002/adfm.202002046>
- Blanco, E., Shen, H., & Ferrari, M. (2015). Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nature Biotechnology*, 33(9), 941-951. <https://doi.org/10.1038/nbt.3330>
- Botella, P., Abasolo, I., Fernández, Y., Muniesa, C., Miranda, S., Quesada, M., Ruiz, J., Schwartz, S., & Corma, A. (2011). Surface-modified silica nanoparticles for tumor-targeted delivery of camptothecin and its biological evaluation. *Journal of Controlled Release*, 156(2), 246-257. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.06.039>
- Bunker, K., Mcallister, D., Allison, K., Wagner, K., Rickabaugh, K., Levine, A., Strohmeier, B., & Lee, R. (2008). TEM and FESEM: The Right Combination for Enhanced Particle Characterization. *Microscopy and Microanalysis - MICROSC MICROANAL*, 14. <https://doi.org/10.1017/S1431927608083682>
- Burris, H. A., Moore, M. J., Andersen, J., Green, M. R., Rothenberg, M. L., Modiano, M. R., Cripps, M. C., Portenoy, R. K., Storniolo, A. M., Tarassoff, P., Nelson, R., Dorr, F. A., Stephens, C. D., & Von Hoff, D. D. (1997). Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: A randomized trial. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 15(6), 2403-2413. <https://doi.org/10.1200/JCO.1997.15.6.2403>
- Cabrera-García, A., Checa-Chavarria, E., Rivero-Buceta, E., Moreno, V., Fernández, E., & Botella, P. (2019). Amino modified metal-organic frameworks as pH-responsive nanoplatfoms for safe delivery of camptothecin. *Journal of Colloid and Interface Science*, 541, 163-174. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2019.01.042>
- Clogston, J. D., & Patri, A. K. (2011). Zeta Potential Measurement. En S. E. McNeil (Ed.), *Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery* (pp. 63-70). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-198-1_6
- Cote, A. P., Benin, A. I., Ockwig, N. W., O'Keeffe, M., Matzger, A. J., & Yaghi, O. M. (2005). *Porous, Crystalline, Covalent Organic Frameworks*. 310.
- Danaei, M., Dehghankhold, M., Ataei, S., Hasanzadeh Davarani, F., Javanmard, R., Dokhani, A., Khorasani, S., & Mozafari, M. R. (2018). Impact of Particle Size and Polydispersity Index on

- the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics*, 10(2), 57.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020057>
- Ding, S.-Y., Gao, J., Wang, Q., Zhang, Y., Song, W.-G., Su, C.-Y., & Wang, W. (2011). Construction of Covalent Organic Framework for Catalysis: Pd/COF-LZU1 in Suzuki–Miyaura Coupling Reaction. *Journal of the American Chemical Society*, 133(49), 19816–19822.
<https://doi.org/10.1021/ja206846p>
- Fang, J., Islam, W., & Maeda, H. (2020). Exploiting the dynamics of the EPR effect and strategies to improve the therapeutic effects of nanomedicines by using EPR effect enhancers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 157, 142–160.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.06.005>
- Fröhlich, E. (2026). Hype vs. Health: How Approved Nanomedicines Have Met (or Missed) Early Predictions. *Nanomaterials*, 16(5), 284. <https://doi.org/10.3390/nano16050284>
- Gadde, S. (2015). Multi-drug delivery nanocarriers for combination therapy. *MedChemComm*, 6(11), 1916–1929. <https://doi.org/10.1039/C5MD00365B>
- García-García, G., Fernández-Álvarez, F., Cabeza, L., Delgado, Á. V., Melguizo, C., Prados, J. C., & Arias, J. L. (2020). Gemcitabine-Loaded Magnetically Responsive Poly(ε-caprolactone) Nanoparticles against Breast Cancer. *Polymers*, 12(12), 2790.
<https://doi.org/10.3390/polym12122790>
- Heinemann, V., Hertel, L. W., Grindey, G. B., & Plunkett, W. (1988). Comparison of the cellular pharmacokinetics and toxicity of 2',2'-difluorodeoxycytidine and 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine. *Cancer Research*, 48(14), 4024–4031.
- Huang, N., Wang, P., & Jiang, D. (2016). Covalent organic frameworks: A materials platform for structural and functional designs. *Nature Reviews Materials*, 1(10), 16068.
<https://doi.org/10.1038/natrevmats.2016.68>
- Li, Y., An, L., Lin, J., Tian, Q., & Yang, S. (2019). Smart nanomedicine agents for cancer, triggered by pH, glutathione, H₂O₂, or H₂S. *International Journal of Nanomedicine*, 14, 5729–5749.
<https://doi.org/10.2147/IJN.S210116>
- Liang, S., Li, M.-H., Qi, M., Wang, L., & Yang, Y.-W. (2023). Nanoplatfoms Based on Covalent Organic Frameworks (COFs) for Biomedical Applications. *Chemistry of Materials*, 35(20), 8353–8370. <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.3c02095>
- Mini, E., Nobili, S., Caciagli, B., Landini, I., & Mazzei, T. (2006). Cellular pharmacology of gemcitabine. *Annals of Oncology*, 17, v7–v12. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdj941>
- Okabe, K., Shindo, T., Maehana, T., Nishiyama, N., Hashimoto, K., Itoh, N., Takahashi, A., Taguchi, K., Tachiki, H., Tanaka, T., & Masumori, N. (2018). Neoadjuvant chemotherapy with gemcitabine and cisplatin for muscle-invasive bladder cancer: Multicenter retrospective study. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 48(10), 934–941.
<https://doi.org/10.1093/jjco/hyy122>
- Pi-Martín, I., Vidaurre-Agut, C., Rivero-Buceta, E. M., Cebrecos, A., García-Garrigós, J. J., Jiménez, N., Benlloch, J. M., Botella, P., & Camarena, F. (2025). Nanoparticles of non-porphyrinic covalent organic frameworks as contrast agents for photoacoustic imaging. *Scientific Reports*, 15(1), 33909. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-08631-w>
- Raghunand, N., & Gillies, R. J. (2000). pH and drug resistance in tumors. *Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy*, 3(1), 39–47.
<https://doi.org/10.1054/drup.2000.0119>
- Ramachandran, V. S., & Beaudoin, J. J. (2000). *Handbook of Analytical Techniques in Concrete Science and Technology: Principles, Techniques and Applications*. Elsevier.
- Sing, K. (2001). The use of nitrogen adsorption for the characterisation of porous materials. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 187–188, 3–9.
[https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(01\)00612-4](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(01)00612-4)
- Stetefeld, J., McKenna, S. A., & Patel, T. R. (2016). Dynamic light scattering: A practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophysical Reviews*, 8(4), 409–427.
<https://doi.org/10.1007/s12551-016-0218-6>

- Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2007). *Introducción a la microbiología*. Ed. Médica Panamericana.
- von der Maase, H., Hansen, S. W., Roberts, J. T., Dogliotti, L., Oliver, T., Moore, M. J., Bodrogi, I., Albers, P., Knuth, A., Lippert, C. M., Kerbrat, P., Sanchez Rovira, P., Wersall, P., Cleall, S. P., Roychowdhury, D. F., Tomlin, I., Visseren-Grul, C. M., & Conte, P. F. (2000). Gemcitabine and cisplatin versus methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin in advanced or metastatic bladder cancer: Results of a large, randomized, multinational, multicenter, phase III study. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 18(17), 3068-3077. <https://doi.org/10.1200/JCO.2000.18.17.3068>
- Wang, C., & Zhang, S. (2023). Advantages of Nanomedicine in Cancer Therapy: A Review. *ACS Applied Nano Materials*, 6(24), 22594-22610. <https://doi.org/10.1021/acsanm.3c04487>