

Resumen:

La presente tesis doctoral titulada “*New nanostructured supports with signal amplification features for the detection of molecules and biomolecules of interest*” se centra en el diseño y preparación de nuevos materiales híbridos orgánicos-inorgánicos constituidos por puertas moleculares soportadas sobre alúmina mesoporosa con el objetivo de desarrollar nuevos sistemas sensores con aplicaciones potenciales en el campo de la diagnosis y del control alimentario.

En el primer capítulo de la tesis se introducen los conceptos en los que están basados los estudios realizados y los materiales preparados. De esta forma se comentan las bases de la química supramolecular y del reconocimiento molecular, la síntesis y funcionalización de la alúmina mesoporosa, los materiales híbridos orgánico-inorgánicos y la aplicación de estos en procesos de reconocimiento. A continuación, en el segundo capítulo se describen los objetivos generales de la tesis que serán abordados en los siguientes apartados.

En el tercer capítulo se presenta en detalle el diseño y optimización de un nanodispositivo para la detección de la bacteria *Mycoplasma fermentans*. Esta bacteria puede producir infecciones en el ser humano, y es un contaminante habitual en cultivos celulares. En primer lugar, los poros de una placa de alúmina mesoporosa se cargan con un indicador fluorescente (rodamina B). Seguidamente, la superficie es funcionalizada con una secuencia de ADN complementaria a una región altamente conservada de la subunidad ribosomal 16S de la bacteria *Mycoplasma fermentans*. El impedimento estérico generado por las secuencias de ADN ancladas al exterior de los poros impide la salida del indicador encapsulado. Únicamente en presencia de DNA de la bacteria *Mycoplasma fermentans*, se produce la apertura de los poros permitiéndose la difusión de la carga (rodamina B) que es posteriormente medida mediante espectroscopía de fluorescencia.

En el capítulo cuatro se lleva a cabo el diseño y optimización de un nanodispositivo capaz de detectar de forma rápida, sensible y selectiva la bacteria *Staphylococcus aureus*. Para la preparación del material sensor, un

soporte de alúmina mesoporosa es, en primer lugar, cargado con el indicador fluorescente rodamina B. A continuación, los poros del soporte son tapados mediante el anclaje de un aptámero que reconoce de forma específica la bacteria. Solamente en presencia de *Staphylococcus aureus* se produce la liberación del indicador encapsulado, que es posteriormente medido mediante espectroscopía de fluorescencia. El dispositivo desarrollado permite reducir los tiempos de detección de *Staphylococcus aureus*. Mientras que métodos estándar empleados necesitan entre 48-72 horas, nuestro método propuesto tarda 1 hora. Además, la respuesta obtenida es específica para *Staphylococcus aureus*. Este sistema ha sido ensayado en muestras reales provistas por el servicio de microbiología del Hospital Politècnic i Universitari La Fe de València.

En el sexto capítulo, se detalla el diseño y optimización de un nanodispositivo híbrido orgánico-inorgánico consistente en un material de alúmina mesoporosa cubierto con una secuencia de ADN específica para la detección de ADN del hongo *Pneumocystis jirovecii*, principal causa de la neumonía *Pneumocystis*. En este caso, el soporte de alúmina cargado con rodamina B se recubre con una secuencia de ADN específica para el reconocimiento de este hongo y que presenta una conformación en forma de horquilla que inhibe la liberación del indicador. En presencia del organismo, la horquilla hibrida con el ADN del hongo, lo que resulta en una conformación *triplex* con elevada afinidad y estabilidad que induce, al mismo tiempo, el desplazamiento de este complejo de la superficie. Como consecuencia de este reconocimiento la carga se libera y es cuantificada mediante espectroscopía de fluorescencia. El sistema ha sido satisfactoriamente validado como método de diagnóstico mediante el análisis de muestras reales de pacientes provenientes del Servicio de Microscopía del Hospital Politècnic i Universitari La Fe de València.

En el séptimo capítulo, el interés de la tesis gira hacia el sector de la seguridad y control alimentario mediante el diseño y desarrollo de un sistema sensor con la capacidad de detectar gluten de forma rápida y sencilla en extractos de alimentos procesados y no procesados. Para ello, un soporte de alúmina mesoporosa se carga con rodamina B y los poros se recubren con un aptámero específicamente diseñado para la detección de la proteína gliadina,

que constituye el 50 % del total del clúster de elementos que forman el gluten. La elevada afinidad y especificidad entre el aptámero y la proteína en cuestión hacen que en presencia de ésta se produzca un desplazamiento de la puerta molecular que permite la difusión del colorante encapsulado que es finalmente monitorizado mediante espectroscopía de fluorescencia.

Finalmente, en el capítulo octavo se discuten de forma conjunta los resultados obtenidos en los capítulos anteriores y la potencial aplicación de los sistemas desarrollados en el actual sistema sanitario y de control alimentario.

Los sistemas desarrollados en esta tesis pretenden avanzar en el conocimiento en el campo de los sensores aplicados a la diagnosis y a la seguridad alimentaria. Se trata de sistemas con elevada sensibilidad y especificidad, son rápidos y económicos, y no requieren manos experimentadas para su manejo, a la vez que pueden ser fácilmente transportados para realizar los ensayos en el lugar de muestreo. Todos los sensores han sido validados con muestras reales, reflejando la robustez de los sistemas desarrollados. Algunos de los materiales descritos se han patentado y se espera que sirvan de modelo para el desarrollo de nuevos métodos de análisis.