

## Resumen

La presente tesis doctoral titulada “Nanodispositivos mesoporosos híbridos funcionalizados con enzimas para detección, liberación controlada y comunicación molecular” se centra en el diseño, preparación, caracterización y evaluación de distintos nanodispositivos híbridos orgánico-inorgánicos utilizando como soporte nanopartículas tipo Janus de oro y sílice mesoporosa, que se equipan con enzimas, especies fluorescentes y puertas moleculares.

En el primer capítulo se introduce el marco en el que se engloban los estudios realizados donde se combinan distintas herramientas y conceptos relacionados con la nanotecnología, la química supramolecular, el campo de los materiales mesoporos y las puertas moleculares, así como partículas Janus y enzimas. A continuación, se presentan los objetivos generales que son abordados en los siguientes capítulos experimentales.

En el tercer capítulo se presenta un nanodispositivo para liberación controlada en respuesta al neurotransmisor acetilcolina. En concreto, se trata de nanopartículas Janus de oro-sílice mesoporosa funcionalizadas con la enzima acetilcolinesterasa en la parte del oro y con complejos supramoleculares de inclusión entre  $\beta$ -ciclodextrina y benzimidazol en la superficie de la sílice. El complejo supramolecular actúa como tapón o nanoválvula impidiendo la salida de la carga almacenada en el interior de la sílice. La liberación selectiva en respuesta a acetilcolina se produce debido a su hidrólisis mediada por la enzima, lo cual produce ácido acético e induce la apertura de la nanoválvula por protonación del benzimidazol.

En el cuarto capítulo se presenta un sistema de liberación controlado enzimáticamente basado en la apertura de una puerta sensible a tiolos utilizando como soporte nanopartículas Janus oro-sílice mesoporosa. En concreto, la parte mesoporosa está funcionada con cadenas de oligo(etilen glicol) unidas mediante un puente disulfuro, mientras que la parte del oro se utiliza para pegar la enzima acetilcolinesterasa. Como par sustrato-enzima modelo se utiliza acetiltiocolina-acetilcolinesterasa, ya que en este caso la reacción enzimática produce tiocolina como especie que induce la apertura de la puerta molecular. Asimismo, se demuestra que la unidad enzimática puede detectar la presencia de inhibidores y como resultado se obtiene una modulación de la liberación. Los estudios en células muestran que el dispositivo es biocompatible cuando está cargado con safranina O. Además, el nanodispositivo muestra una mayor eficiencia para liberar el citotóxico doxorubicina en células cancerosas en presencia de acetiltiocolina.

El quinto capítulo muestra un sistema de comunicación química entre dos nanopartículas Janus distintas que imita el modelo de comunicación interactiva. En concreto, la primera partícula ( $S1_{gal}$ ) está funcionalizada con la enzima  $\beta$ -galactosidasa en la parte del oro, y la parte mesoporosa está cargada con un colorante y tapada con  $\beta$ -ciclodextrina unida a la sílice mediante puentes disulfuro. En el segundo tipo de nanopartícula ( $S2_{gox}$ ), la parte mesoporosa está cargada con un agente reductor (*N*-acetil-L-cisteína) y tapada con una nanoválvula supramolecular ( $\beta$ -ciclodextrina:benzimidazol). El proceso de comunicación se dispara en presencia de lactosa. La lactosa es hidrolizada por la  $\beta$ -galactosidasa sobre la primera partícula ( $S1_{gal}$ ) y la glucosa generada (primer mensajero químico) difunde hacia la segunda

nanopartícula ( $S2_{\text{gox}}$ ), donde la glucosa oxidasa la transforma en ácido glucónico. Esto resulta en la bajada local del pH, lo cual produce la apertura de la nanoválvula supramolecular y la liberación de *N*-acetil-L-cisteína (segundo mensajero químico), que difunde de vuelta hacia la primera nanopartícula ( $S1_{\text{gal}}$ ). La *N*-acetil-L-cisteína induce la ruptura de los puentes disulfuro que tapan la parte mesoporosa de  $S1_{\text{gal}}$  y esto resulta en la liberación del colorante encapsulado.

En el sexto capítulo se presenta el diseño de nanodispositivos capaces de leer la presencia simultánea de varias biomoléculas del ambiente y actuar mediante el procesamiento de funciones lógicas que resultan en la liberación programada de la carga. En concreto, se prepararon nanopartículas Janus de oro-sílice mesoporosa funcionalizadas con la enzima glucosa deshidrogenasa en la superficie del oro y nanoválvulas supramoleculares ( $\beta$ -ciclodextrina:benzimidazol) como puertas sobre la superficie de la sílice. El nanodispositivo actúa como una puerta lógica AND y es capaz de leer la presencia simultánea de glucosa y  $\text{NAD}^+$  para disparar la liberación de la carga. Además, se muestra que se pueden coinmovilizar glucosa deshidrogenasa y la enzima ureasa para imitar la función lógica INHIBIT, de forma que la función AND se deshabilita en presencia de urea. Finalmente, se muestra que estas nanopartículas pueden liberar un fármaco citotóxico en células cancerosas tras detectar la presencia simultánea de glucosa y  $\text{NAD}^+$  intracelular.

En el séptimo capítulo, se propone una nueva aproximación para el diseño de nanosensores ópticos basados en el desanclaje mediado enzimáticamente de especies indicadoras. Como prueba de concepto, se presenta un nanosensor para la detección de urea basado en el desanclaje de un oligonucleótido fluorescente desde nanopartículas Janus de oro-sílice mesoporosa. En concreto, las nanopartículas se funcionalizan sobre la sílice con grupos amino (cargados positivamente a pH neutro) a los cuáles se pega el oligonucleótido fluorescente por interacciones electrostáticas, mientras que la parte del oro se utiliza para pegar la enzima ureasa. El mecanismo de sensado se basa en el reconocimiento de urea por la unidad enzimática y su transformación en amoníaco (mensajero químico), que produce la desprotonación de los grupos amino sobre la superficie de sílice y la liberación del oligonucleótido fluorescente al medio. El nanodispositivo se ha aplicado para la detección de urea en sangre y para la identificación de leche adulterada.

Como conclusión general, los estudios realizados muestran que la incorporación de enzimas sobre nanopartículas permite introducir funciones de reconocimiento con alta especificidad y diseñar nanodispositivos avanzados para distintas finalidades. La combinación de nanopartículas híbridas con grupos orgánicos como puertas moleculares, efectores enzimáticos y especies cromó- fluorogénicas o fármacos puede resultar muy versátil; y se espera que los resultados obtenidos puedan inspirar el desarrollo de nuevos materiales inteligentes con aplicación en distintas áreas como la nanomedicina y la detección de moléculas de interés.