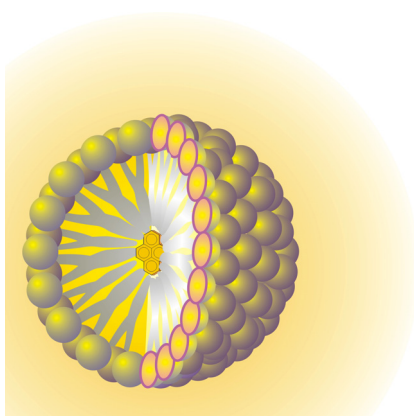


Micelle come nano-contenitori per sensori fluorescenti autoassemblati.

Luca Pasotti

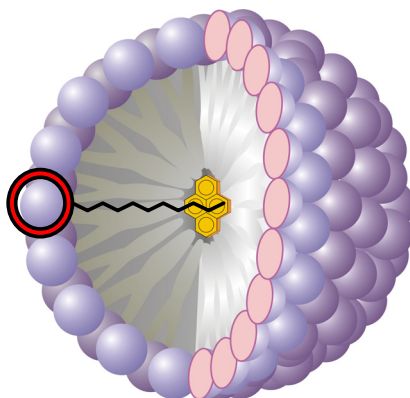
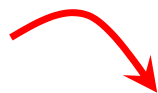


un contributo del **Dipartimento di Chimica Generale dell'Università di Pavia**, in collaborazione con l' Institut de Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne, Dijon e il Dipartimento di Chimica e Tecnologia Farmaceutiche, Università degli Studi di Palermo,

Un approccio molto efficace nella costruzione di dispositivi molecolari:

utilizzare le micelle come strutture autoassemblate per contenere molecole che svolgono funzioni complesse.

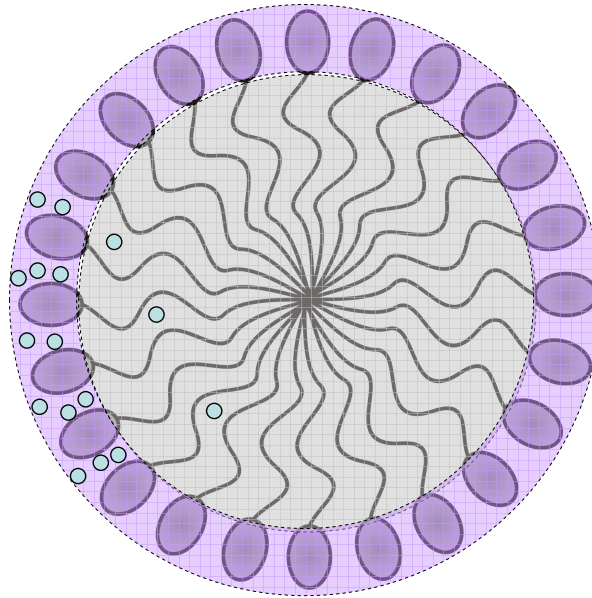
Sopra la CMC (critical micelle concentration)



Diverse molecole lipofiliche possono inserirsi all'interno della micella e interagire tra loro.

Approccio multicomponente

○ = acqua

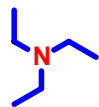


Core
idrofobico

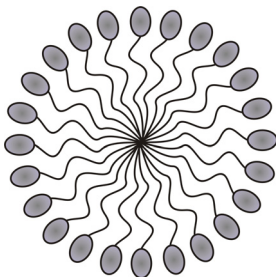
Strato
idrofilico

- _ Sistema dinamico che permette diffusione al suo interno e scambio con l'esterno
- _ Scarsa idratazione dovuta all'ambiente idrofobico

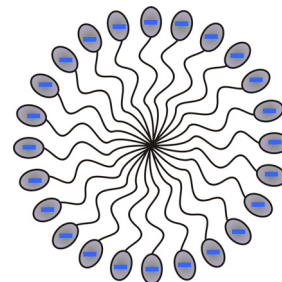
L'inclusione in micella influenza molto le proprietà termodinamiche osservate delle molecole



$\log K = 10.77$ in acqua

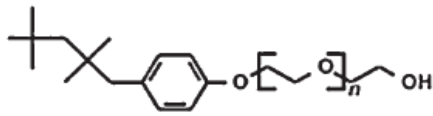


$\log K = 7.84$



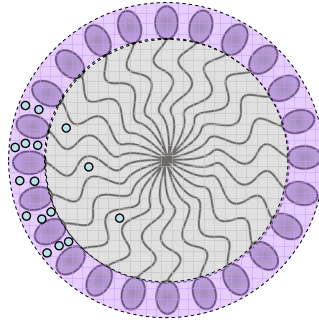
$\log K = 11.51$

La micella di Triton X-100



CMC = 2×10^{-4} M

AN ~ 110/140



Raggio medio 4.6 nm

Volume medio 410 nm³

Aumentata concentrazione locale dovuta alla confinazione delle specie idrofobiche in un **volume molto piccolo**

Tirando le somme

_lavoriamo in **acqua** anche con molecole **poco solubili**

_il **confinamento in un volume nanometrico** e la **scarsa idratazione** all'interno della micella permettono l'**approccio multicomponente**

Vedremo in particolare il funzionamento di due dispositivi molecolari:

Un sensore per H⁺ a finestra di pH

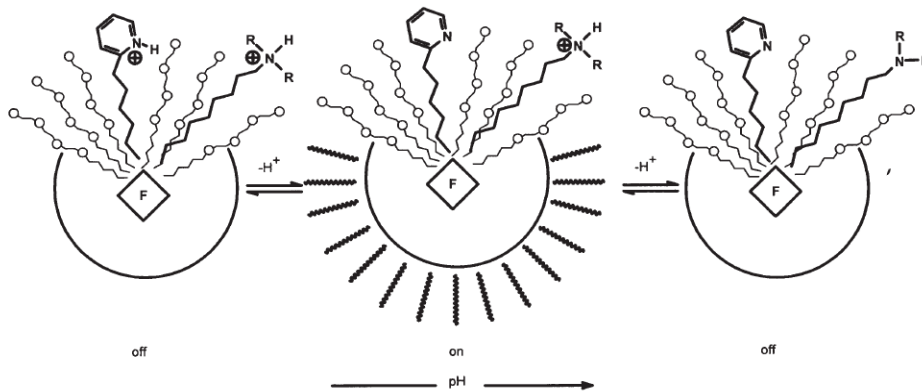
Un misuratore di lipofilità

Sensori a finestra di pH

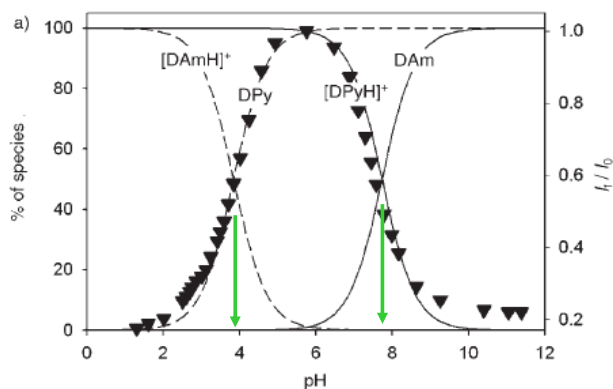
Sono dispositivi molecolari in grado di segnalare quando il pH si sposta da un'intervallo scelto.

Possono essere usati come indicatori fluorescenti che ci dicono quando, in un microambiente, il pH si sposta da un valore che sappiamo essere la situazione normale.

Sono facilmente regolabili sul range di pH richiesto.



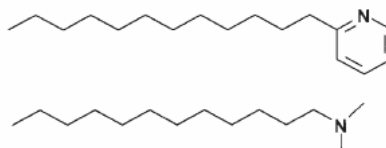
Sensori a finestra di pH



fluoroforo



Quencher pH dipendenti



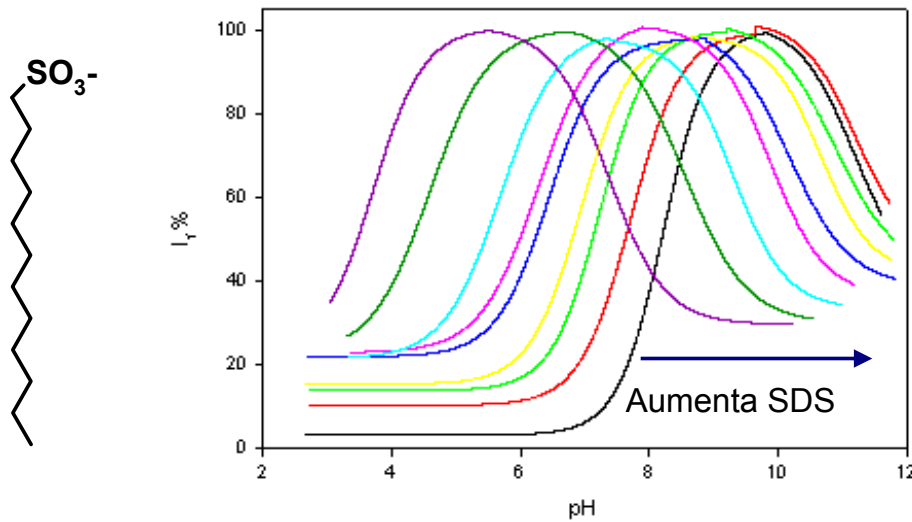
$\log K = 3.90$

$\log K = 7.84$

Spostamento delle finestre

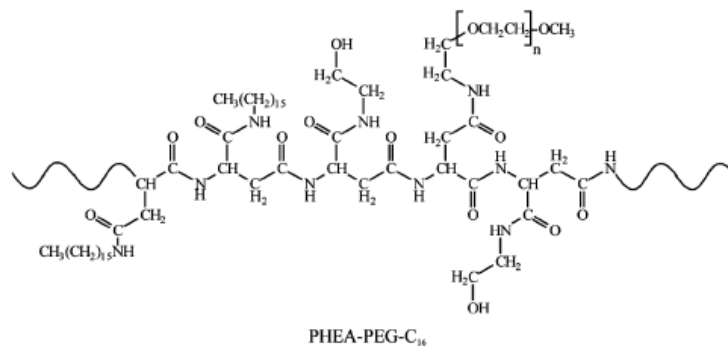
La costanti di protonazione cambiano co-micellizzando un tensioattivo carico negativamente che stabilizza le forme protonate.

X SDS	0	0.1	0.2	0.3	0.5	0.7	0.8	0.9	1
DPirid.	3.90	4.39	4.94	5.43	5.86	6.30	6.70	7.26	7.12
DNMe ₂	7.84	8.51	9.13	9.90	10.42	11.20	11.73	11.88	11.50



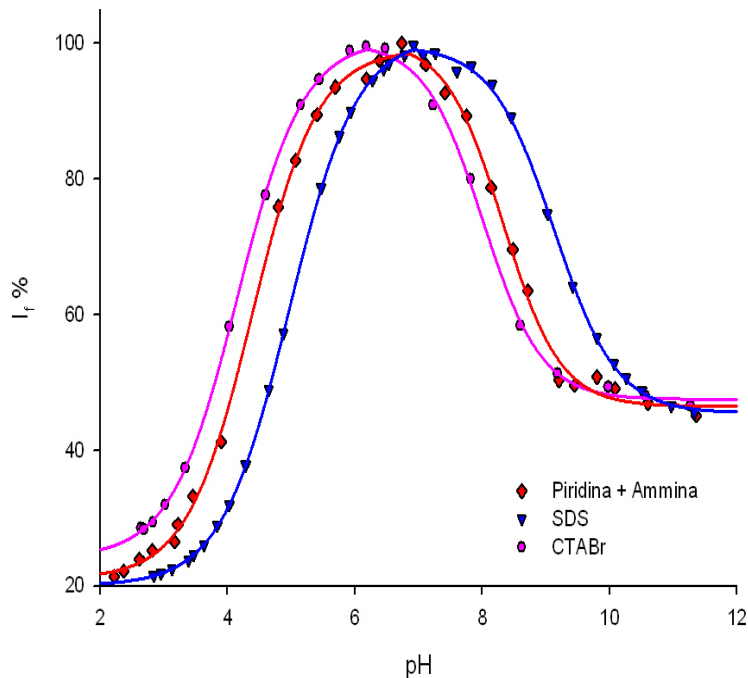
Micelle di Triton X-100 non sono biocompatibili e hanno scarsa stabilità alla diluizione.

Per questo scopo sono, invece, preferibili **micelle polimeriche**.



Poliaspartamide funzionalizzate: bassa CMC, alta stabilità alla diluizione, alta compatibilità biologica.

Controllo delle finestre



La carica negativa di SDS sposta la finestra a pH maggiori.

La carica positiva di CTABr (cetiltrimetilammonio bromuro) destabilizza le specie protonate e sposta la finestra a pH minori.

Misuratore di Lipofilicità

IUPAC - **Lipophilicity** “represents the affinity of a molecule or a moiety for a lipophilic environment”

Questa grandezza è biologicamente rilevante :

È uno dei parametri di cui tenere conto nel design di farmaci perché influenza la farmacocinetica: **solubilità, assorbimento, metabolismo, distribuzione ed escrezione** sono fortemente influenzate dalla lipofilicità.

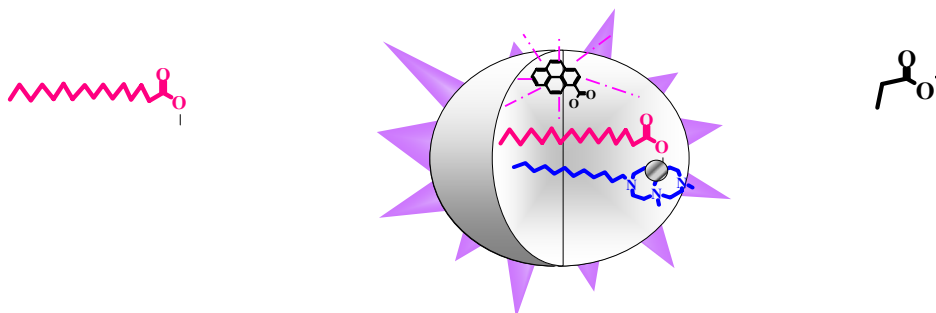
I metodi di valutazione comunemente usati sfruttano la ripartizioni delle **molecole neutre** attraverso sistemi bifasici: **distribuzione liquido-liquido** (ottanolo-acqua, **LogP**), distribuzione **liquido-solido** (cromatografie su colonne a fase inversa)

Con questo metodo sfruttiamo la ripartizione tra le due pseudofasi **micella-acqua**, cercando di mimare l'interfaccia tra acqua e membrana cellulare a pH 7.4 (lavoriamo con **molecole cariche**).

Un sensore per spostamento

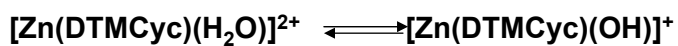
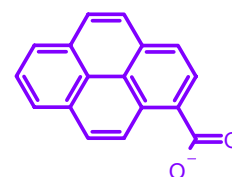
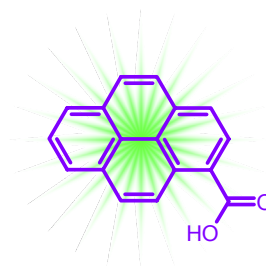
Le micelle non solo promuovono l'interazione tra sensore e substrato, ma intervengono attivamente discriminando le molecole che possono entrare e interagire con il recettore

da quelle che non possono entrare e non provocano cambiamento nel segnale



Misuratore di lipofilicità sistema ON-OFF

LcZn:



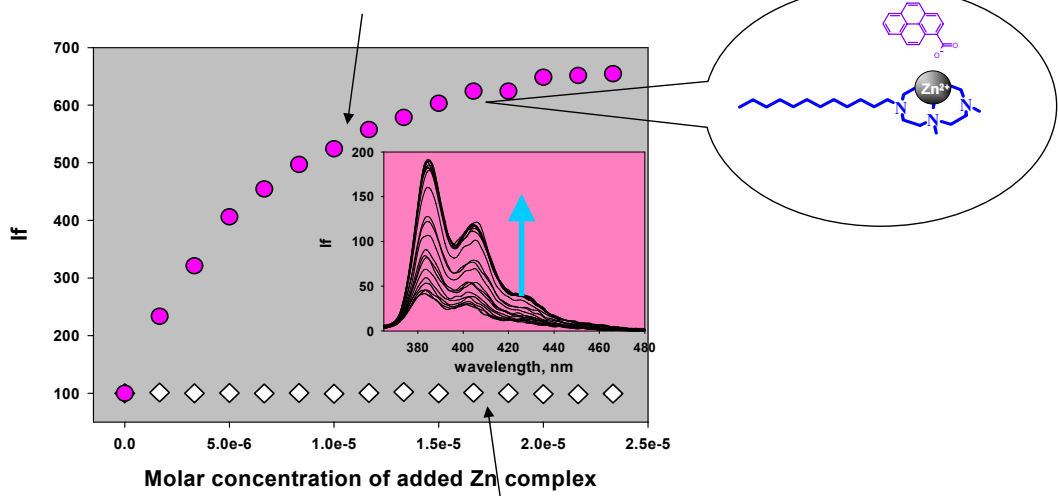
Fluorescente

Scarsamente
fluorescente

A pH 7.4

pH 7.4 Aggiungo LcZn a una soluzione di PyCOO⁻

In acqua e Triton l'interazione è promossa

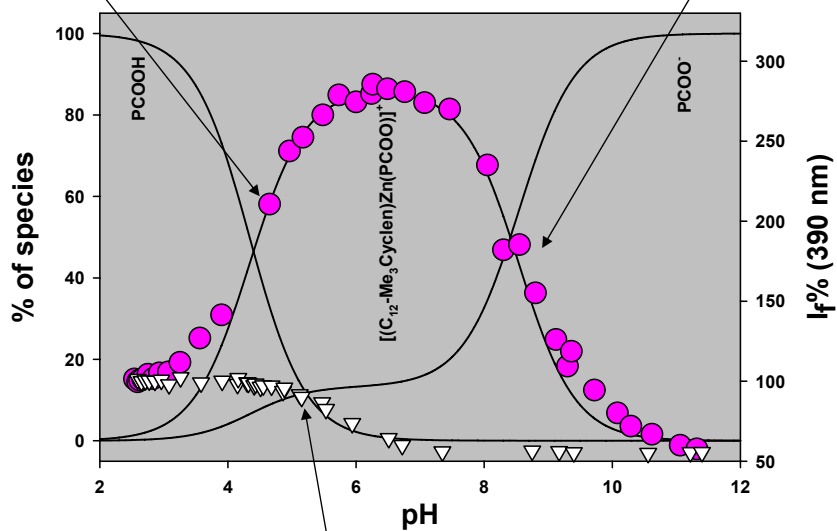


In acqua non c'è interazione, la fluorescenza rimane a livello iniziale

Formazione del complesso LcZn-PyCOO⁻

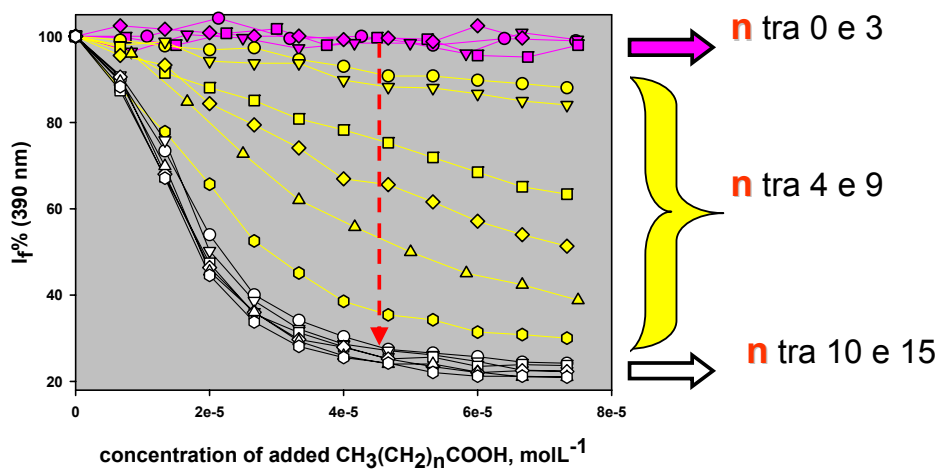
Formazione del complesso LcZn-OH⁻

Scalzando PyCOO⁻ la fluorescenza si spegne



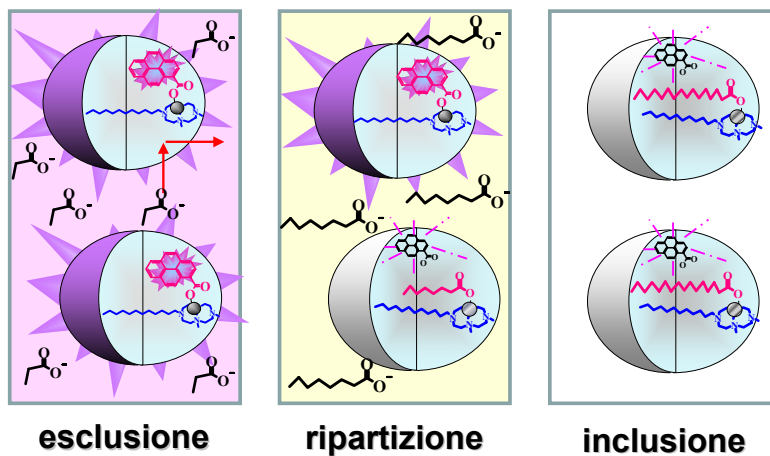
fluorescenza del PyCOO⁻ da solo

Aggiungendo acidi carbossilici lineari $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{COO}^-]$ alla soluzione di sensore si ottiene una variazione del segnale che dipende dalla lunghezza della catena



condizioni: TX-100 10^{-2} M

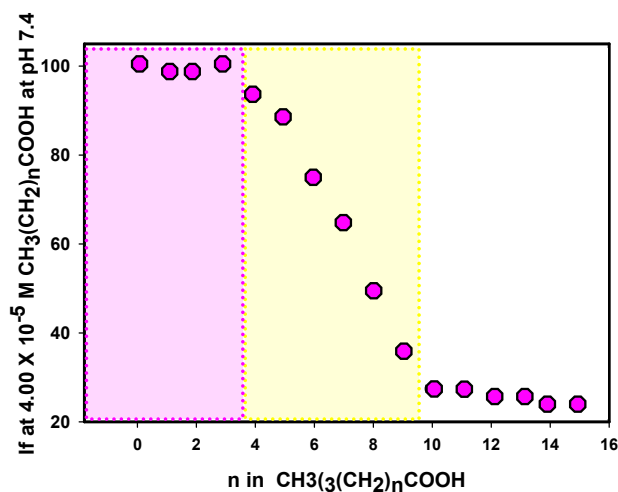
Pyrene-COOH 8×10^{-7} M

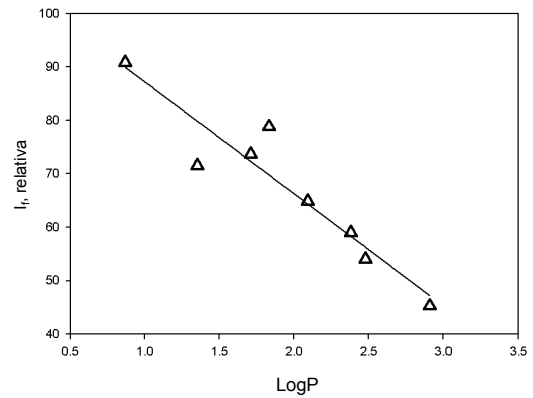
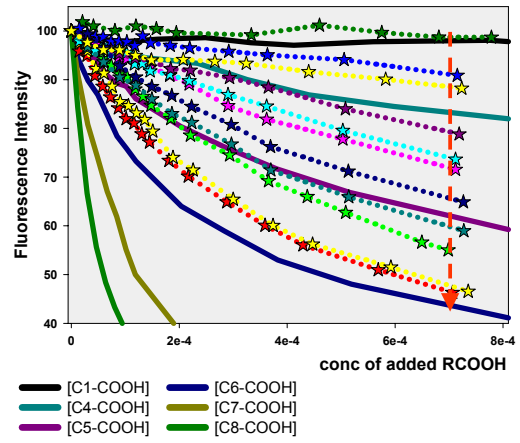
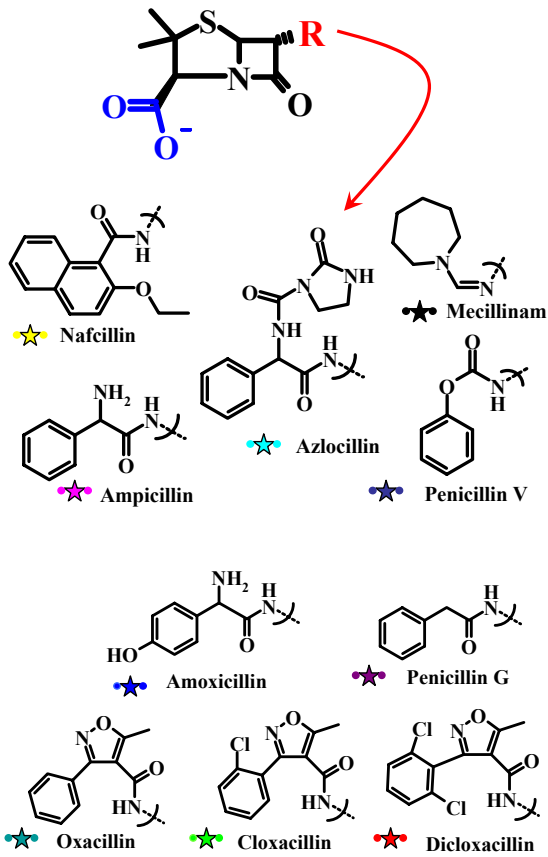


condizioni: TX-100 10^{-2} M

$\text{Zn}(\text{C}_{12}\text{Me}_3\text{Cy})^{2+}$ 1.667×10^{-5} M

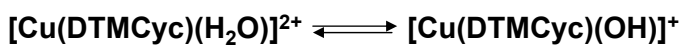
Pyrene-COOH 8×10^{-7} M



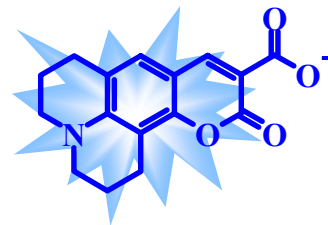


Con lo stesso principio è possibile realizzare anche un sistema OFF-ON

LcCu

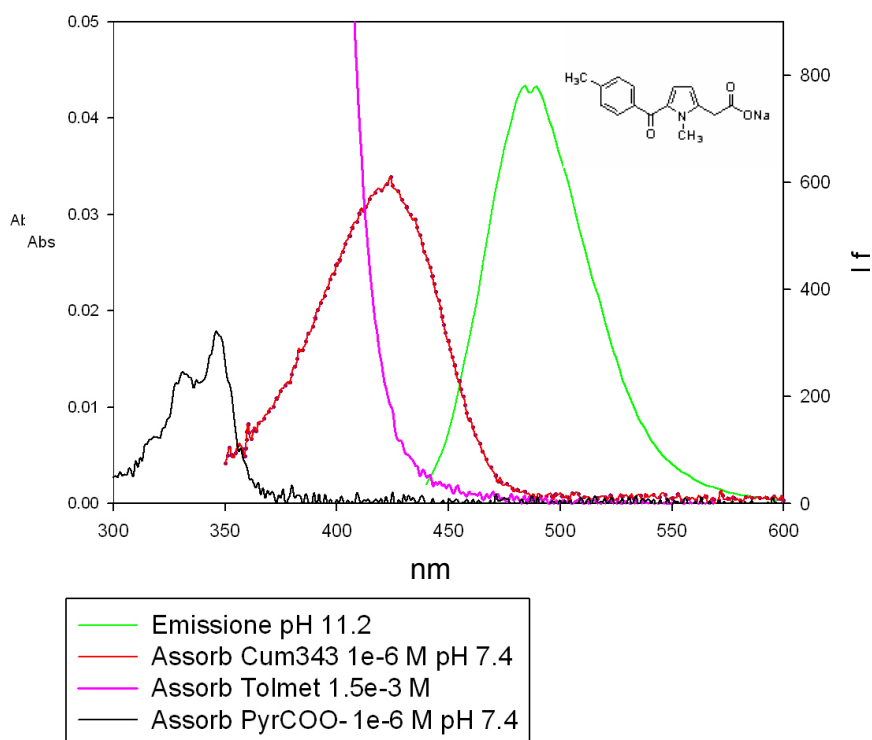


Cumarina 343



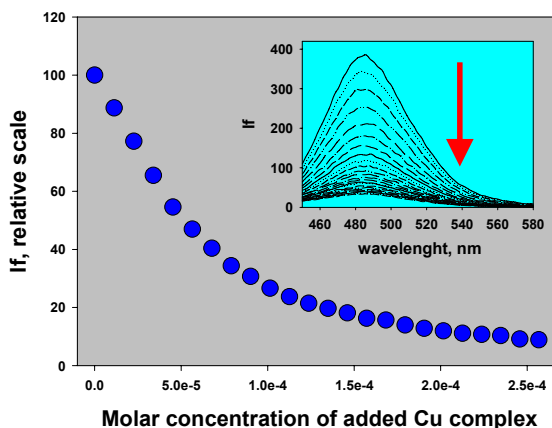
Fluorescente su tutto il range di pH

Abbiamo ottenuto un nuovo sistema funzionante spostato in una diversa regione spettrale (molte molecole biologiche assorbono nell'ultravioletto)

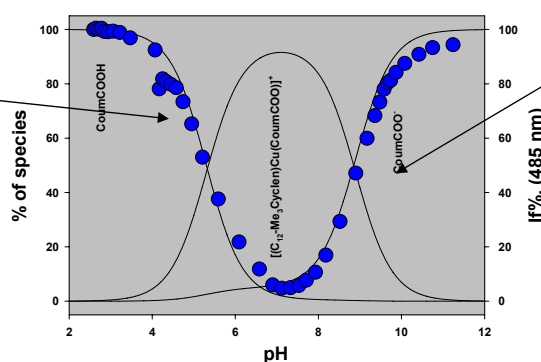


pH 7.4

Aggiungo il complesso a una soluzione 8×10^{-7} M di Cumarina 343



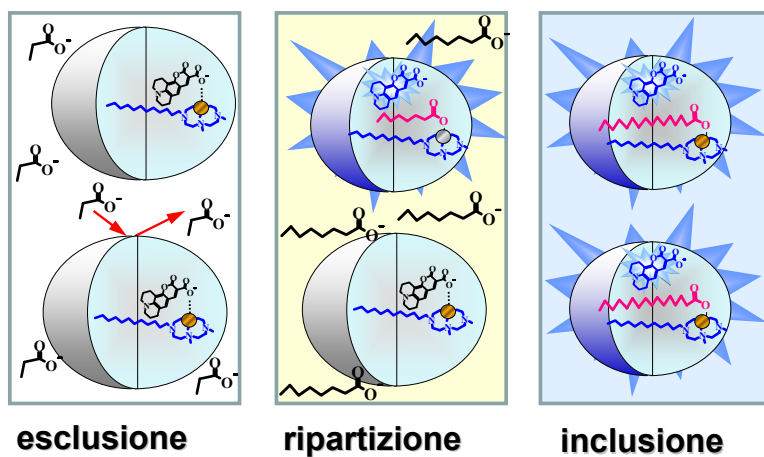
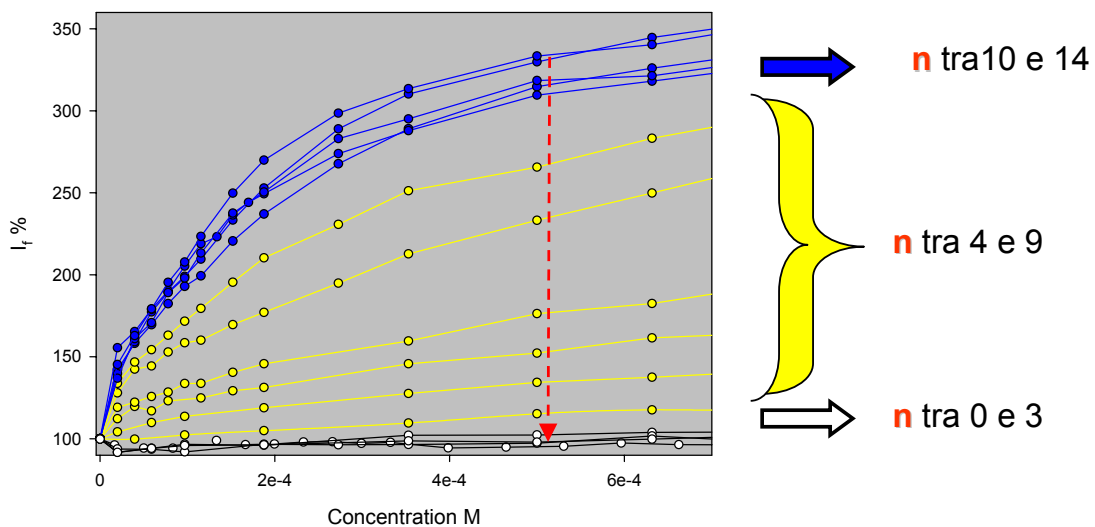
Formazione del complesso
LcCu-Cum



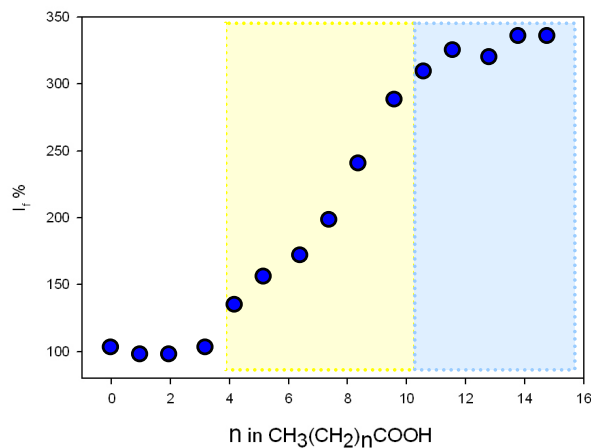
Formazione del complesso
LcCu-OH⁻

Scalzando la cumarina 343 la fluorescenza si accende

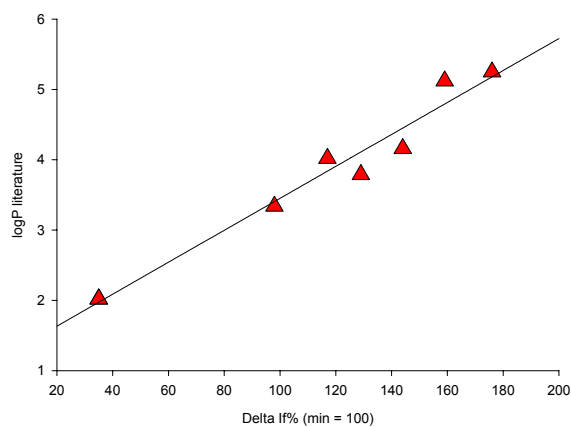
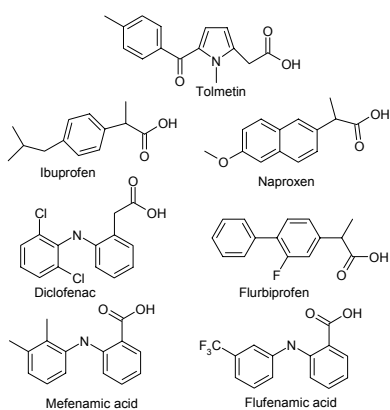
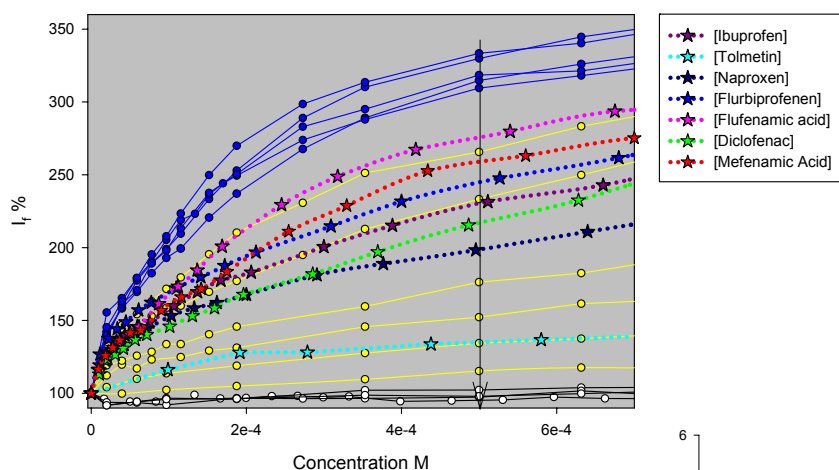
Ora aggiungendo gli acidi carbossilici lineari di varie lunghezze
 $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{COO}^-]$ vedo una riaccensione



condizioni: TX-100 10^{-2}M
 $\text{Cu}(\text{C}_{12}\text{Me}_3\text{Cy})_2^{2+}$ $3.5 \times 10^{-4}\text{M}$
 Cumarina 343 $8 \times 10^{-7}\text{M}$



Antiinfiammatori non steroidei



Concludendo:

Abbiamo realizzato un sensore per pH facilmente controllabile, sfruttando il confinamento e il trasporto da parte delle micelle

Abbiamo realizzato un misuratore per lipofilit  sfruttando la capacit  delle micelle di discriminare le molecole organiche.



Ringraziamenti:

P.Pallavicini

Yuri Diaz Fernandez

il LabFab e il NanoLab Generale

Giuseppe Chirico, Maddalena Collini, Laura D'Alfonso

(Dipartimento di Fisica "G. Occhialini", Università Milano Bicocca, Piazza della Scienza, 3, 20126, Milano)

Franck Denat, Yoann Rousselin, Nicolas Sok (Institut de Chimie

Moléculaire de l'Université de Bourgogne, UMR CNRS 5260, 9 avenue Alain Savary - BP 47870 - 21078 DIJON cedex – France)