

REZUMAT

O nano-bio-interfata de hemina si polyethylenedioxythiophene (PEDOT) a fost utilizata la detectia peroxinitritului. Acest film catalitic polimerizat pe substrat de carbon prezinta nano-structuri fractale-cavernoase cu pori tridimensionali, cum rezulta clar din imaginile de microscopie electronica.

Oxidarea electrocatalitica a peroxinitritului a fost caracterizata prin voltametrie ciclica, cronoamperometrie, si alte metode. Microsenzorii pe microfibra de carbon (Cfe) modificati cu hemina-PEDOT au fost utilizati pentru prima data la detectia peroxinitritului (ONO_2^-) cu timp de raspuns de 2 s, limita de detectie 200 nM si senzitivitatea 13 nA/ μM .

In timp ce rolul peroxinitritului a devenit din ce in ce mai bine inteles in organismele mamiferelor, el este aproape complet necunoscut pentru plante, bacterii, sau plante si bacterii aflate in interactie. Avansam aici ipoteza ca ONO_2^- functioneaza ca mediator si molecula-semnal in interactia dintre plante si bacteriile care le colonizeaza. Pentru investigarea acestor functii a ONO_2^- , se propune pentru prima data folosirea microsenzorilor nano-catalitici de peroxinitrit pentru interogarea acestor interactiunilor complexe.

INTRODUCERE

Peroxinitritul (ONO_2^-), produsul reactiei dintre oxidul de azot si superoxid [$\text{NO} + \text{O}_2^- \rightarrow \text{ONO}_2^-$] constituie un agent major de oxidare si nitrare major, implicat intr-o serie de patologii ca artrita, apoptoza, boala Huntington, Alzheimer, AIDS. Metodele curente de masurare ale ONO_2^- in majoritate de fluorescenta, chemoluminescenta, imunohistochimie.

Raportam aici o metoda noua de masurare electrochimica nano-catalitica ce permite detectia lui in situ si in timp real, care permite investigarea functiei ONO_2^- ca mediator si molecula-semnal in interactia dintre plante si bacteriile care le colonizeaza. Metoda electrochimica este mai rapida, mai simpla si mai convenabila pentru monitorizarea schimbarilor tranzitorii in concentratia acestui analit.

MATERIALE SI METODE

Reactivii chimici au fost de la Aldrich. Sinteza ONO_2^- s-a facut in laborator cu stocare la -80°C , fiind folosit proaspat. Microelectrozii cu $d = 30 \mu\text{m}$ din fibre de carbon (Cfe) au fost folositi ca substrat pentru electro-polimerizarea solutiei hemina-PEDOT, prin scanarea voltajului intre $-1,6 \text{ V}$ si $1,6 \text{ V}$ ca in figura 1.

Prepararea Cfe s-a realizat dupa metode standard. Apa pura a avut o rezistivitate strict controlata. Echipamentul de testare include sistemul electrochimic BAS 100B, cu electrodul de lucru polarizat la 750 mV , Ag/AgCl ca electrod de referinta si Pt ca electrod auxiliar, cu voltametrie ciclica si cronoamperometrie.

Microscopul electronic este Hitachi S-4500, folosit cu magnificatii de pina la 100k si pentru analiza elementara. Filmul depus este vizualizat prin SEM ca in figura 2. Detectia ONO_2^- s-a realizat la 24°C in solutii deoxigenate tampon cu pH 10,5. Experimentele s-au efectuat cel putin in triplicat.

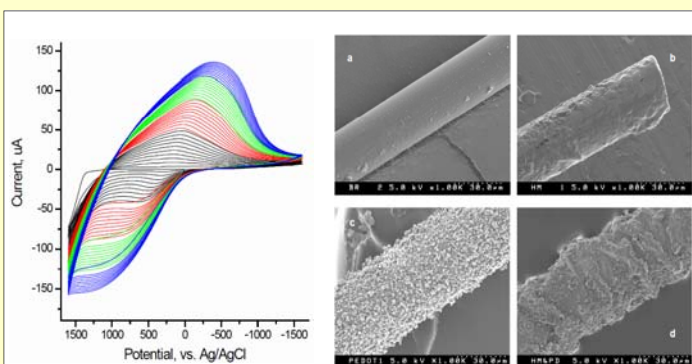
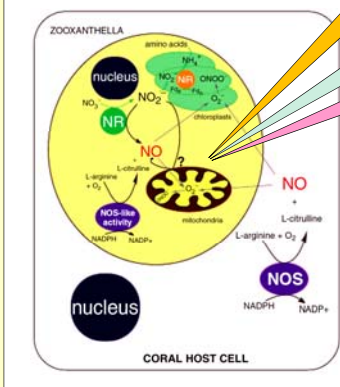


Figura 1. Electro-depunerea de hemina-PEDOT pe CFEs (stinga sus).

Figura 2. Imagini FESEM ale CFEs: (a) simpla; (b) modificata cu hemina; (c) cu PEDOT; (d) cu hemina-PEDOT (dreapta sus).

Figura 3. Masurarea intracelulara a NO, O₂ si ONO₂⁻ cu ultra-microsenzori electrochimici



REZULTATE

Prezenta heminei si a PEDOT-ului in filmul depus s-a stabilit prin analiza elementara [2]. Examinarea cu SEM a suprafetei filmului de hemina-PEDOT dezvaluie nano-structuri cu dimensiuni de 50-200 nm intr-o structura tridimensionala poroasa-cavernoasa, ca in figura 4. Raspunsul amperometric al filmului catalitic de hemina-PEDOT, comparat cu cel de PEDOT si de hemina este aratat in figura 5. Curbele de calibrare pentru Cfe modificat cu Hemina-PEDOT se vede in figura 6, iar curba de raspuns permitind calcularea limitei de detectie este aratata in figura 7.

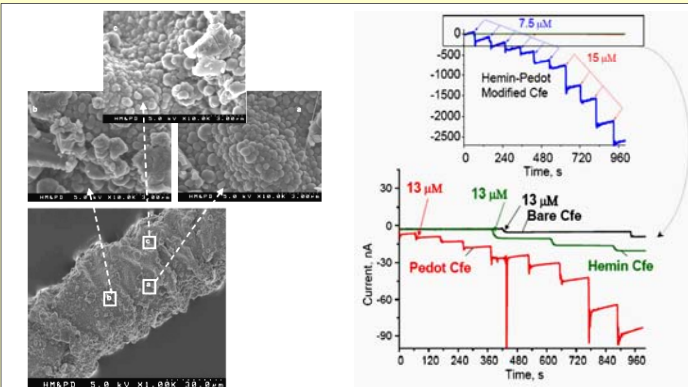


Figura 4. SEM tipic pentru suprafata de hemina-PEDOT cu nano-sferoizi de 50-200 nm

Figura 5. Raspunsul amperometric al filmului catalitic de hemina-PEDOT, comparat cu cel de PEDOT si de hemina.

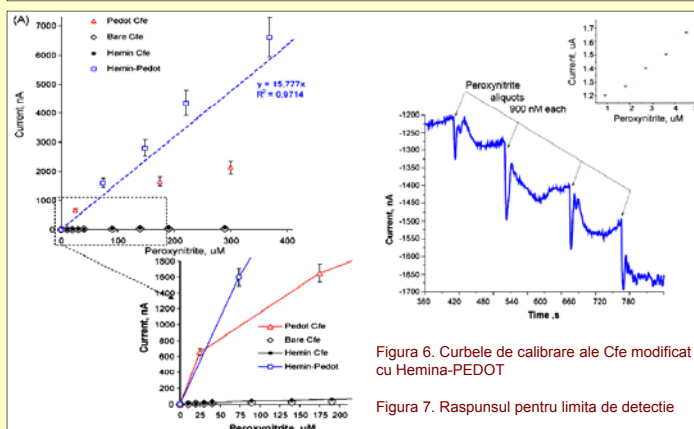


Figura 6. Curbele de calibrare ale Cfe modificat cu Hemina-PEDOT

Figura 7. Raspunsul pentru limita de detectie

Rezultatele suporta ipoteza unei "sinergii" intre matricea conductiva de PEDOT si electro-catalistul hemina. Aceasta nano-matrice tridimensionala extrem de poroasa si cavernoasa obliga molecula de analit sa parcurga o traiectorie foarte lunga prin porii rasuciti, de la suprafata filmului pina la siturile nano-catalitice ale filmului de hemina-PEDOT. Astfel rezulta o suprafata de contact mult marita intre nano-catalist si molecula de analit.

Rezulta deci o crestere a raportului intre curent si concentratia de analit, deci o senzitivitate de 13 pA/nM, efectiv de 50 de ori mai mare decat filmul de hemina si 130 ori mai mare decat Cfe simpli. Limita de detectie este acum de 200 nM cu perspective de imbunatatire odata cu ultra-micro-miniaturizarea electrozilor Cfe.

CONCLUZII

Dupa cum s-a aratat, folosirea nano-bio-interfetei de hemina-PEDOT cu o structura nano-fractala-poroasa-cavernoasa confera performante optime de senzitivitate si limita de detectie. Ultra-miniaturizarea Cfe va permite accesul in situ la nivelul sub-micrometric in plante sau in bacterii

Se presupune ca peroxinitritul poseda atat reactivitatea O_2^- cit si mobilitatea NO necesara functionarii ca molecula semnal. Desi se descrie implicarea ONO_2^- in mecanismul de aparare la plante, detectia lui este foarte dificila in timp real si in situ, datorita concentratiilor scazute de 10-100 nM si al timpului de viata scurt de 1-2 s. In acelasi timp, exista studii care sugereaza implicarea ONO_2^- in omorirea fitopatogenilor, dar in egala masura se raporteaza potentialul sau toxic pentru plante.

Este de asteptat ca folosirea acestei metode de masurare a ONO_2^- in situ si in timp real, impreuna cu detectia separata a O_2 si NO, sa aduca informatii cruciale pentru clarificarea interactiilor plante-bacterii, accelerind astfel progresul durabil in protectia plantelor [1].

BIBLIOGRAFIE

- S.F. Peteu, F. Oancea F (2009). **Biosenzori pentru detectia de peroxinitrit si oxid de azot cu perspective de aplicare la interactia plante-bacterii**, Workshop Bioanaliza vs. Biotehnologie VI, INCD Stiinte Biologice Bucuresti, 18 Decembrie.
- S.F. Peteu et al. (2010). **Nanostructured poly (3,4 ethylene dioxythiophene)-metalloporphyrin films: Improved catalytic detection of peroxynitrite**, *Biosensors & Bioelectronics*, in print.