

Tesis Doctoral

Espectroscopía de correlación de fluorescencia en la nanoescala

Estrada, Laura Cecilia

2009

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Estrada, Laura Cecilia. (2009). Espectroscopía de correlación de fluorescencia en la nanoescala. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Estrada, Laura Cecilia. "Espectroscopía de correlación de fluorescencia en la nanoescala". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2009.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Física

Espectroscopía de Correlación de Fluorescencia en la nanoescala

Trabajo de Tesis para optar por el título de

Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Ciencias Físicas

Laura Cecilia Estrada

Director de Tesis: Oscar E. Martínez

Co-Director de Tesis: Pedro F. Aramendía

Lugar de trabajo: Laboratorio de Electrónica Cuántica

Agosto de 2009

Índice general

Resumen	I
Abstract	III
1. Introducción	1
2. Espectroscopía de correlación	7
2.1. Descripción general	7
2.2. Caso difusional	12
2.2.1. Relaciones señal-ruido en experimentos de FCS	16
2.2.2. Técnicas alternativas a FCS: FRAP, QELS y FRET	18
2.3. Comentarios finales	19
3. Construcción del microscopio	21
3.1. Descripción general	21
3.2. Configuración experimental	23
3.2.1. Excitación de la muestra	24
3.2.2. Colección de la emisión de fluorescencia	26
3.2.3. Sistema de detección	27
3.2.4. Sistema de adquisición de datos	28
3.2.5. Programa de correlación y ajuste de datos	29
3.2.6. Adquisición de las imágenes	30
3.2.7. Alineación del microscopio	30
3.3. Consideraciones prácticas	31
3.3.1. Potencia sobre la muestra	31
3.3.2. Adsorción de moléculas sobre el cubreobjetos	31
3.3.3. Identificación de agregados de moléculas	32
3.4. Caracterización del microscopio construido	33
3.4.1. Calibración del volumen de observación	33
3.4.2. Pruebas de desempeño	35
3.5. Microscopio confocal comercial	39

4. Modelo simplificado	41
4.1. Descripción general	41
4.2. Dos volúmenes 3D Gaussianos	42
4.3. Simulaciones	43
5. Sistemas híbridos	49
5.1. Descripción general	49
5.2. Propiedades plasmónicas de NPs metálicas	51
5.3. Cálculos de intensificación	56
5.3.1. Descripción general	56
5.3.2. Dependencia de GB con la distancia NP-molécula	58
5.3.3. Dependencia de GB con ϕ^0	61
5.3.4. Dependencia de GB y GP con el radio de la NP	63
5.3.5. Dependencia de GB y GP con λ	65
5.3.6. Dependencia de GB con la geometría de la NP	67
5.4. Experimentos de intensificación	70
5.4.1. Inmovilización de las NPs sobre cubreobjetos	70
5.4.2. Ubicación y caracterización de una única NP de oro	71
5.4.3. Adquisición de imágenes	73
5.4.4. Experimentos de fotoblanqueo de la muestra	76
6. FCS cerca de superficies	79
6.1. Descripción general	79
6.2. Experimentos	80
6.2.1. <i>Caso (i)</i> : dos tiempos de correlación difusionales	84
6.2.2. <i>Caso (ii)</i> : un tiempo de correlación difusional y un tiempo de correlación de adsorción-desorción	88
6.3. Expresión analítica para la función de correlación	91
7. FCS de alta resolución espacial	93
7.1. FCS de alta resolución en solución	93
7.2. Modelo detallado	96
7.3. Análisis y discusión de los resultados	100
7.4. FCS de alta resolución en células vivas	103
7.4.1. Descripción general	103
7.4.2. Cultivo celular	105
7.4.3. Resultados	105
Conclusiones	109
A. Código en MatLab	113
B. Cálculos de la variación de temperatura	117
C. Glosario de términos y símbolos	121

<i>ÍNDICE GENERAL</i>	v
Bibliografía	129
Agradecimientos	143

Resumen

En esta Tesis se propone una nueva técnica que combina las ventajas de las microscopías basadas en la fluorescencia, con la altísima resolución espacial de las microscopías de campo cercano. El principio de funcionamiento de la *Espectroscopía de Correlación de Campo Cercano* que se presenta en este trabajo, se basa en la existencia de campos electromagnéticos fuertemente intensificados y confinados alrededor de nanopartículas metálicas, NPs. Este efecto aparece cuando la NP se ilumina con un haz cuya frecuencia corresponde a alguna de las frecuencias de resonancia de los electrones en el metal. Experimentos utilizando NPs esféricas de oro de 40 nm de radio, y una solución de Rosa de Bengala 150 μM en glicerol 80 % en agua, demuestran una reducción del volumen de observación de alrededor de 4 órdenes de magnitud. Se mostró que es posible extender el uso de la *Espectroscopía de Correlación de Campo Cercano* al estudio de células vivas.

Finalmente, se estudian exhaustivamente las propiedades de emisión de moléculas fluorescentes a distancias nanométricas de NPs metálicas. Se analiza el efecto de la separación NP-molécula; la eficiencia cuántica de fluorescencia, la orientación, las propiedades de absorción y emisión de la molécula; y el tamaño y la geometría de las NPs sobre la emisión de las moléculas.

Palabras claves: Espectroscopía de correlación de la fluorescencia, microscopías de campo cercano, microscopía confocal, nanopartículas, plasmones, nanoantenas, intensificación de campo.

Abstract

In this Thesis we present a new technique which combine the advantages of the fluorescence based spectroscopies with the super resolution of the near field microscopies. This technique is based on the strong electromagnetic field localized in the proximity of metallic nanoparticles, NPs. This effect appears when a NP is irradiated with the resonance frequency of the electrons in the metal. Our experimental results using gold NPs and a 150 μM Rose Bengal solution in glycerol confirm a 4 orders of magnitude reduction in the observation volume. Experiments in cell membranes show that it is possible to use this technique even in living cells.

Finally, we studied intensively the emission properties of fluorescent molecules at nanometric distances from metallic NPs. We analysed carefully the effect of NP-molecule separation, intrinsic molecule quantum yield, and molecule absorption and emission spectra to design new probes based on molecules coupled to MNPs

Keywords: Fluorescence Correlation Spectroscopy, Near Field microscopies, Confocal microscopy, nanoparticles, plasmons, nanoantennas, field enhancement.

Capítulo 1

Introducción

Hoy en día no existen dudas acerca de que las espectroscopías basadas en la fluorescencia se han convertido en una herramienta poderosísima para el estudio de procesos y funciones de biomoléculas en su entorno natural, la célula. El éxito de la fluorescencia como herramienta para estudiar la dinámica y la estructura de sistemas vivos se basa en la posibilidad de marcar selectivamente sitios específicos de la célula, y en la influencia que tienen los parámetros del entorno (como la temperatura, la viscosidad, el pH, la polaridad y el potencial eléctrico) sobre los marcadores [Valeur 2001]. Debido a la fuerte dependencia que el medio tiene sobre la emisión de la fluorescencia, los marcadores son muy utilizados como sondas de prueba para obtener información espacial y temporal tanto del sistema biológico como del entorno.

Los marcadores fluorescentes actualmente más utilizados son las sondas fluorescentes. Estos compuestos tienen la particularidad de hacer una transición a un estado excitado electrónicamente por la absorción de un fotón, y de emitir parte de esa energía como un fotón, ahora de menor energía [Valeur 2001]. Esta propiedad de las sondas fluorescentes permite observar en una longitud de onda distinta a la de excitación, obteniendo con esto una muy buena relación señal-ruido. Esta característica ha permitido la observación y el seguimiento de proteínas motoras, la difusión de moléculas parcialmente inmovilizadas en membranas lipídicas, y la difusión de moléculas en geles y en soluciones [Sase et al. 1995, Schmidt et al. 1995, Dickson et al. 1996, Schutz et al. 1997]. Actualmente se encuentran disponibles comercialmente sondas de distintos tamaños y con diferentes propiedades ópticas [Valeur 2001, Lakowicz 1983]. Desde pequeñas moléculas orgánicas [Zhang et al. 2002] hasta grandes proteínas fluorescentes [Tsien 1998]. Más recientemente se han desarrollado partículas fluorescentes basadas en nanocristales semiconductores [Michalet et al. 2001, Fu et al. 2007, Grecco et al. 2004].

En los últimos años, además de las técnicas de observación más conocidas basadas en fluorescencia, como la microscopía confocal y las técnicas de seguimiento de partículas, se han desarrollado con altísimo impacto técnicas alternativas que

proveen información cuantitativa de propiedades de transporte y de concentraciones a partir de las fluctuaciones de la emisión fluorescente. Estas técnicas incluyen la Espectroscopía de Correlación de la Fluorescencia, FCS, [Magde et al. 1972], FCS de barrido [Ruan et al. 2004], y la Espectroscopía de Correlación de Imágenes [Digman et al. 2005, Hebert et al. 2005]. Como todas las microscopías de campo lejano, estas espectroscopías permiten obtener información con una resolución espacial del orden de la longitud de onda del haz de iluminación ($\sim 250 - 350$ nm en el visible) [Abbe 1873]. Muchas de las interacciones moleculares que determinan la funcionalidad celular ocurren en la escala de los pocos nanómetros [Grakoui et al. 1999, Cambi et al. 2004], escala que no es accesible con las microscopías ópticas convencionales. Por esta razón, para estudiar este tipo de fenómenos, es indispensable aumentar la resolución espacial (reducir el volumen de observación) con respecto a la obtenida con las microscopías de campo lejano. En este contexto, la aparición de técnicas alternativas a las microscopías ópticas de campo lejano no se hizo esperar.

La aparición de los microscopios de campo cercano, en donde la señal proveniente del objeto se colecta por una sonda ubicada a pocos nanómetros, ha logrado una mejora notable en la resolución permitiendo estudiar fenómenos que ocurren a escalas moleculares e incluso atómicas. La respuesta de un objeto iluminado con un campo externo contiene información relacionada con la interacción entre el campo incidente y el objeto. Es decir, cualquiera sea la interacción entre el campo incidente y el objeto, alrededor de éste habrá una distribución de campo electromagnético que lo caracteriza. Es de esperar que la distribución espacial del campo del objeto muy cerca de su superficie reproduzca fielmente la estructura de la superficie. Esta estructura puede variar en distancias mucho más pequeñas que la longitud de onda del campo incidente. Esta característica divide al campo objeto en dos regiones. La región a pocos nanómetros del objeto es la llamada zona de campo cercano. Más allá aparece la zona de campo lejano. La estructura del campo cercano de un objeto no es simple. Contiene componentes propagantes y componentes fuertemente confinadas en las inmediaciones del objeto. Estas últimas son las llamadas ondas evanescentes que existen sólo cerca de los objetos y no se pueden propagar en el espacio libre. El grado de confinamiento de las ondas evanescentes depende del material, de su estructura espacial así como del entorno. Cuanto más pequeños son los detalles de la superficie, tanto más confinados están los campos cerca de ella [Novotny et al. 2007].

El primero de los microscopios en aparecer basado en la medición del campo cercano fue el Microscopio de Efecto Túnel, STM, [Binnig et al. 1982a, Binnig et al. 1982b] que sentó las bases conceptuales y tecnológicas para el desarrollo de otras microscopías que aparecieron algunos años más tarde. Sin embargo, la idea de vencer el límite de difracción detectando el campo objeto en la zona del campo cercano, ya había sido propuesta por Synge 50 años antes [Synge et al. 1928]. La aparición del STM disparó una cantidad de Microscopías de Barrido por Sondas, SPM, variaciones del STM y que sensan diferentes propiedades de las superficies con altísima resolución espacial [Wickramasinghe et al. 1993].

En este sentido, la P en el término SPM (que proviene del inglés Probe) se puede reemplazar por el término Fuerza (SFM), Capacidad (SCM), Conductividad (SICM), o más general por óptica de campo cercano (SNOM) dando lugar a algunos ejemplos de esta familia de microscopías. Dentro de esta familia, una técnica particular que queremos resaltar es el Microscopio Óptico de Barrido por Intensificación de Campo (FESOM), desarrollado en nuestro Laboratorio [Bragas et al. 2000, Scarpettini et al. 2009].

En este contexto, la nanofotónica y la plasmónica han sido permanentes impulsoras de nuevas estrategias para incrementar la resolución espacial de la microscopía óptica. La idea fundamental de todas estas estrategias se basa en utilizar dispositivos que permitan localizar e intensificar la radiación óptica incidente en una región pequeña del espacio, de manera similar a la que utilizan las antenas. Uno de los primeros dispositivos en utilizar la intensificación de un haz de luz, y a los que en general se los llama *antenas ópticas*, apareció en 1984 y fue la punta de un SNOM [Pohl et al. 1984, Durig et al. 1986, Betzig et al. 1986]. El SNOM ha sido utilizado en experimentos de moléculas únicas [Xie et al. 1994, GarciaParajo et al. 1999] y en experimentos sobre membranas celulares con resoluciones del orden de 50 nm [de Lange et al. 2001, Ianoul et al. 2005, de Bakker et al. 2007, de Bakker et al. 2008]. Sin embargo todavía no se ha podido aplicar al estudio de células vivas. Otro acercamiento al problema, ha sido utilizar nanoagujeros en lozas metálicas depositadas sobre sustratos de vidrio como soportes para estudiar interacciones moleculares. Esta configuración dió lugar a un primer trabajo publicado en Science [Levene et al. 2003] por la posibilidad de observar la dinámica de moléculas individuales a concentraciones micromolar de ligando. Estas nanoestructuras permitieron reducir el volumen de análisis que, combinado con el confinamiento local del campo incidente dentro del nanoagujero, dieron lugar a trabajos posteriores para estudiar interacciones que ocurren únicamente a muy altas concentraciones [Wenger et al. 2007, Muhlschlegel et al. 2005, Schuck et al. 2005]. Más recientemente, se ha demostrado la intensificación de la fluorescencia de moléculas en solución sobre cristales fotónicos por acoplamiento de modos resonantes, lo que posibilitaría el estudio de sistemas biológicos con resoluciones similares a la de un microscopio por reflexión total interna [Estrada et al. 2009c]. Sin embargo, la complejidad en la fabricación de estas estructuras hacen de este método una posibilidad, por ahora, difícil de implementar a gran escala.

En este contexto, esta Tesis dió lugar a una nueva técnica que combina las ventajas de las microscopías basadas en la fluorescencia (sensibilidad, especificidad, biocompatibilidad y no-invasividad) con la altísima resolución espacial de las microscopías de campo cercano. Para experimentos de Espectroscopía de Correlación de la Fluorescencia, FCS, el aumento de la resolución espacial ya había sido intentado por varios caminos con resultados marginales [Blom et al. 2006, Leutenegger et al. 2006, Kasttrup et al. 2005, Foquet et al. 2004, Dyba et al. 2002]. O bien la resolución no aumentaba significativamente o el sistema propuesto era demasiado complejo. Para sortear estas

dificultades, en este trabajo se utiliza la siguiente estrategia: se intensifica el campo electromagnético en la proximidad de una nanopartícula metálica excitando de manera resonante el plasmón superficial del metal. De este modo la región en la dirección de polarización del campo incidente cercana a la nanopartícula, queda con valores de intensidad varios órdenes de magnitud mayor. A diferencia de las microscopías de campo cercano tradicionales, este esquema tiene una región excitada y sin intensificar (~ 500 a 700 nm de diámetro) que corresponde a la detección en el campo lejano. Fue parte de esta Tesis demostrar que es posible deconvolucionar estas dos contribuciones de modo de extraer la información de la región intensificada. También se desarrollaron los modelos numéricos y analíticos para la correcta interpretación de los datos y para encontrar las condiciones de trabajo más favorables. Desde el punto de vista experimental, se contruyó un microscopio confocal con sensibilidad para detectar la emisión de, en promedio, una única molécula en el volumen de observación. Se desarrollaron los métodos para depositar las nanopartículas, NPs, sobre sustratos de vidrio y para identificarlas a partir de una imagen óptica. Se probó el sistema para estudiar la dinámica de moléculas en solución [Estrada et al. 2008] y en la membrana de células adherentes. Finalmente, motivados por la proximidad entre las sondas fluorescentes y las NPs metálicas que se da en el esquema propuesto, se estudió como la interacción NP-sonda modifica la emisión fluorescente. Como consecuencia de este último punto, se avanzó en el diseño de nuevas sondas fluorescentes basadas en sistemas híbridos que combinan NPs metálicas con sondas fluorescentes [Estrada et al. 2009].

A continuación se presenta un esquema de la organización de este trabajo.

Capítulo 2: En este capítulo se hace una revisión de los conceptos fundamentales de la Espectroscopía de Correlación de la Fluorescencia y se la compara con otras técnicas alternativas.

Capítulo 3: En este capítulo se presentan las plataformas experimentales para hacer los experimentos de Espectroscopía de Correlación. En particular se describe en detalle el microscopio confocal de fluorescencia construido como parte del trabajo de esta Tesis.

Capítulo 4: Se presenta un modelo para la función de correlación muy simplificado pero que, sin embargo, permite predecir las condiciones más favorables para el diseño de experimentos de espectroscopía de correlación basados en una configuración de campo cercano.

Capítulo 5: En este capítulo se estudian las propiedades de emisión de sistemas híbridos formados por sondas fluorescentes y NPs metálicas. Se analiza el efecto que tienen sobre la emisión del sistema la separación NP-molécula; la eficiencia cuántica de fluorescencia de la molécula, la orientación, las propiedades de absorción y emisión de la molécula; y el tamaño y la geometría de las NPs.

Capítulo 6: Los experimentos de FCS de campo cercano que se presentan en esta Tesis se hacen usando NPs sobre un sustrato de vidrio. Por este motivo en este capítulo se analiza el efecto que tiene sobre las curvas de FCS una superficie cerca del volumen de observación.

Capítulo 7: En este capítulo se presentan los resultados experimentales del esquema de FCS de campo cercano. Los resultados obtenidos en soluciones $150 \mu\text{M}$ de sonda, demuestran una resolución espacial 10^4 veces aumentada con respecto a las espectroscopías de correlación tradicionales. Se presenta el modelo detallado para la función de correlación desarrollado en esta tesis que permite interpretar los resultados.

Conclusiones: Finalmente se hace un resumen de los aportes realizados en esta Tesis y se describen algunas líneas de investigación que se están llevando a cabo como continuación de este trabajo.

Para una mayor claridad se han agregado dos **Apéndices** y un **Glosario de términos y símbolos** que resume todos los términos y símbolos utilizados en este trabajo.

Capítulo 2

Espectroscopía de correlación de la fluorescencia

La Espectroscopía de Correlación de la Fluorescencia, o FCS por sus iniciales en inglés, ha demostrado ser una herramienta muy poderosa para determinar concentraciones locales, coeficientes de difusión y cambios conformacionales de biomoléculas fluorescentes en condiciones fisiológicas [Bacia et al. 2002, Berland et al. 1995, Brock et al. 1998, Politz et al. 1998]. En este capítulo se hace una introducción a los conceptos básicos de esta espectroscopía y se la compara con las técnicas más habituales en laboratorios de biofísica.

2.1. Descripción general

Las técnicas que habitualmente se utilizan para medir procesos dinámicos dentro de una célula pueden separarse en dos grupos. Las basadas en las perturbaciones del sistema como FRAP [Axelrod et al. 1976, Axelrod et al. 1976b, Lippincott-Schwartz et al. 2001] y las basadas en las fluctuaciones propias del sistema como la Espectroscopía de Correlación de la Fluorescencia, FCS [Berland et al. 1995, Lippincott-Schwartz et al. 2001], FCS de barrido [Ruan et al. 2004], y la Espectroscopía de Correlación de Imágenes [Digman et al. 2005, Hebert et al. 2005, Wiseman et al. 1999].

Cuando a un sistema se lo somete a una **perturbación externa** pequeña, este se aparta ligeramente de su posición de equilibrio. Cuando la perturbación cesa, el sistema relaja exponencialmente y con un tiempo característico que depende del proceso físicoquímico responsable del retorno al equilibrio. El apartamiento del equilibrio también puede darse por **fluctuaciones espontáneas** propias del sistema. Estas fluctuaciones disipan en promedio con el mismo tiempo característico que se obtiene al perturbar al sistema externamente, es decir dan la misma información dinámica pero sin someter al sistema a una perturbación, Figura 2.1.

En los métodos perturbativos el tiempo característico, se obtiene como el tiem-

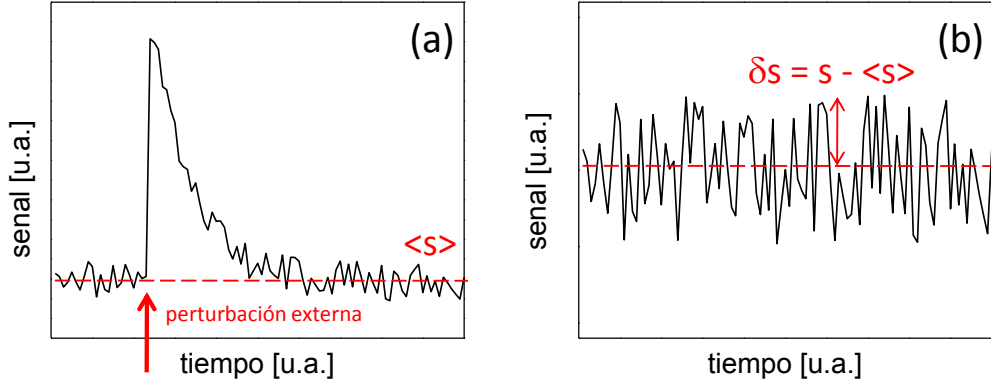


Figura 2.1: (a): Una perturbación externa saca al sistema de su valor de equilibrio, (b): fluctuaciones espontáneas alrededor del valor de equilibrio.

po que necesita el sistema para disminuir su apartamiento del equilibrio a $1/e$ del apartamiento inicial. El instante de la perturbación es fácilmente identificable y, por lo tanto, no se requieren de métodos sofisticados para su determinación. No ocurre lo mismo cuando el observable son las fluctuaciones espontáneas de la señal. En este caso la información está distribuíada a lo largo de toda la señal y, por lo tanto, es necesario un método que sea independiente del intervalo de análisis. Los algoritmos de correlación permiten analizar este tipo de series temporales.

La correlación de las fluctuaciones no es una técnica nueva. En 1911 Svedberg [Svedberg et al. 1911] midió, a partir de la correlación en la cantidad de partículas, ec. 2.1, el coeficiente de difusión de nanopartículas de oro en solución. Además demostró que la variación en la cantidad de partículas dentro de un volumen de observación abierto, sigue una distribución de Poisson cuando las partículas no interactúan entre sí. En este experimento, el observador, mirando a través de un microscopio, contaba “a ojo” la cantidad de partículas que entraban al volumen de observación por segundo, Figura 2.2. La evolución de la cantidad de partículas en función del tiempo se muestra en la Figura 2.2(a). Es claro que esta manera de representar los datos no permite obtener información de la dinámica de las partículas. Sin embargo, un análisis cuidadoso de las fluctuaciones de la señal permite enfatizar aspectos que no son evidentes en la serie temporal de los datos originales.

La función de correlación temporal, $\tilde{G}(\tau)$, permite obtener el tiempo característico de las fluctuaciones. Esto se hace comparando la señal con una copia de la misma señal desfasada un tiempo, τ . En el experimento de Svedberg se usa la correlación en el número de partículas que se define como:

$$\tilde{G}(\tau) = \frac{\langle N(t)N(t+\tau) \rangle}{\langle N(t) \rangle^2} = \frac{\langle \delta N(t)\delta N(t+\tau) \rangle}{\langle N(t) \rangle^2} + 1 = G(\tau) + 1, \quad (2.1)$$

donde $\delta N(t) = N(t) - \langle N(t) \rangle$ es la fluctuación con respecto al valor medio de

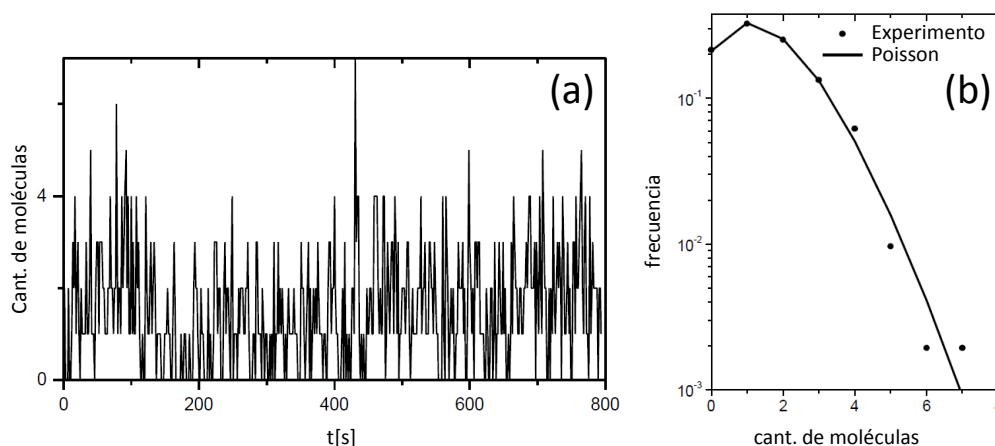


Figura 2.2: Datos del trabajo de Svedberg. (a): Cantidad de partículas detectadas en intervalos de 1.5 s de duración. (b): histograma de los datos. Figura modificada de la referencia [Chen et al. 1999].

la cantidad de partículas detectadas en el instante t , $\langle N(t) \rangle$ es el valor medio temporal de la cantidad de partículas, y donde, en general, $\langle \rangle$ significa promediar sobre todos los valores de t . En la literatura, se suele hablar de la función de correlación, para hacer referencia únicamente a la parte temporal de la ec. 2.1, $G(\tau)$.

La curva de correlación obtenida por Svedberg, Figura 2.3, muestra un tiempo característico de aproximadamente 2 s, que corresponde al tiempo medio de residencia de las nanopartículas en el volumen de observación.

En su trabajo de 1911, Svedberg sugiere el uso de estas técnicas para el estudio de moléculas fluorescentes, sin embargo, pasaron 60 años hasta los primeros experimentos de este tipo. La espectroscopía de correlación de la fluorescencia, o FCS por sus iniciales en inglés, fue introducida originalmente por Elson, Magde y Webb a comienzos de los 70' [Magde et al. 1972, Elson et al. 1974, Magde et al. 1974]. Años más tarde, impulsada por el avance de la microscopía confocal, esta técnica se convierte en una herramienta estándar. FCS usa la función de correlación para caracterizar las fluctuaciones en la intensidad de fluorescencia originada en un volumen de observación. En un sistema en donde las moléculas solo difunden, el análisis de las fluctuaciones permite determinar el coeficiente de difusión y la cantidad de moléculas en el volumen observado [Palmer et al. 1987a, Fahey et al. 1977, Koppel et al. 1976]. Si se conocen la forma y el tamaño del volumen de observación, se puede calcular la concentración local de moléculas. Este método ha sido utilizado para calibrar la concentración de muestras fluorescentes en solución y en membranas [Meyer et al. 1988, Palmer et al. 1989]. Si además se conoce la concentración másica de la muestra, a partir de la cantidad de moléculas se puede derivar la masa molar del soluto. Con este método se estudió el peso

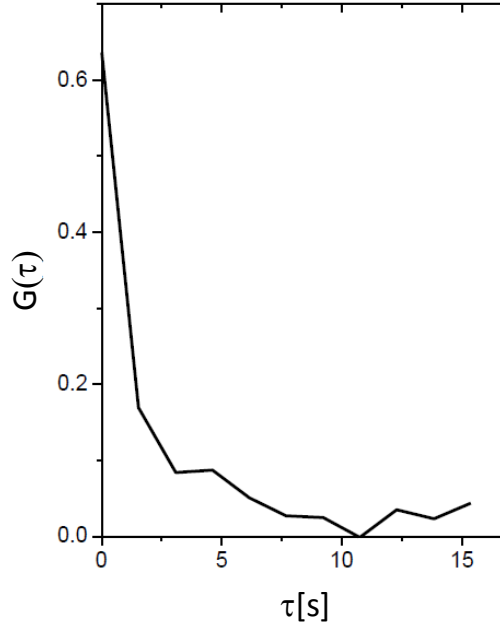


Figura 2.3: Función de correlación para los datos tomados en el experimento de Svedberg, [Svedberg et al. 1911].

molecular de trozos de DNA [Weissman et al. 1976]. También se ha usado FCS para estudiar procesos de asociación y disociación molecular [Sanchez et al. 2001]; reacciones químicas [Haupts et al. 1998, Starr et al. 2001]; y agregaciones moleculares [Palmer et al. 1987b, Qian et al. 1990b] entre otros procesos.

En los experimentos de FCS la señal de interés es la intensidad de fluorescencia, $I(t)$, y la correlación de la intensidad de fluorescencia se define como:

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta I(t) \delta I(t + \tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} \quad (2.2)$$

donde nuevamente esta definición considera únicamente la parte temporal de la función de correlación. En un experimento típico de FCS se mide $I(t)$ como la cantidad de fotones detectados en intervalos de tiempo sucesivos. La Figura 2.4 muestra un esquema de un experimento de FCS donde la fluctuación de la señal es producida por la difusión de moléculas fluorescentes dentro del volumen de observación. Las posibles trayectorias de las moléculas, la serie temporal y la función de correlación también se muestran en la Figura 2.4.

En términos estadísticos, la función de correlación, $G(\tau)$, da la probabilidad de detectar un fotón a $t = \tau$ si se detectó un fotón de la misma molécula a $t = 0$. Cuando los fotones detectados provienen de dos moléculas que no interactúan entre sí, es decir que no hay una correlación entre los fotones, este evento contribuye a una señal de fondo constante en $\tilde{G}(\tau)$. Si, en cambio, los fotones detectados

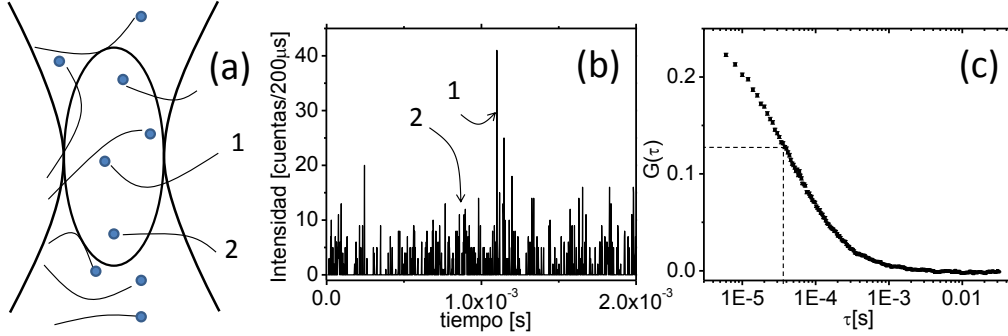


Figura 2.4: Esquema de un experimento típico de FCS realizado durante esta Tesis para moléculas difundiendo en solución. El elipsoide representa el volumen de observación. (a): Posibles trayectorias seguidas por las moléculas al atravesar el volumen de observación. La molécula que sigue la trayectoria 1 se excita y se detecta con mayor eficiencia que la molécula que sigue la trayectoria 2. (b): Serie temporal de la señal medida. Las moléculas son excitadas continuamente durante su residencia en el volumen de observación. Dada una molécula, la trayectoria determina la cantidad de fotones detectados por unidad de tiempo. (c): Función de correlación para la señal medida en (b). El tiempo característico obtenido es de $36 \mu\text{s}$.

proviene de la misma molécula (están correlacionados entre sí) dan lugar a una componente dependiente del tiempo en $\tilde{G}(\tau)$. Vale la pena notar que aún en el caso en que la cantidad de fotones emitidos por una molécula en el intervalo de tiempo ΔT sea perfectamente constante, debido a la naturaleza estocástica del proceso de detección, la cantidad de fotones detectados no será constante. La probabilidad de obtener n fotones en el intervalo de tiempo, ΔT , fluctúa siguiendo una distribución de Poisson, ec. 2.3.

$$\frac{\sqrt{\langle (n - \langle n \rangle)^2 \rangle}}{\langle n \rangle} = \frac{1}{\sqrt{\langle n \rangle}}, \quad (2.3)$$

donde $\langle n \rangle$ es el número medio de fotones detectados en el intervalo de tiempo ΔT . Se puede demostrar que este ruido en la detección, conocido como *shot noise*, tampoco contribuye al comportamiento temporal de la correlación. Es decir, la dependencia temporal de $G(\tau)$, está determinada únicamente por los eventos que están correlacionados entre sí. Un cambio conformacional de las moléculas, la variación en la cantidad de moléculas presentes en el volumen de estudio, $\langle N \rangle$, o cualquier otro proceso fisicoquímico que tenga como consecuencia un cambio en las propiedades de emisión o de difusión de la molécula se pueden estudiar por FCS. Algunos de estos procesos se muestran en la Figura 2.5

Cada uno de estos fenómenos tiene asociado un tiempo de correlación característico que puede ir desde algunas decenas de nanosegundos a varios segundos. En la región de los nanosegundos, aparecen los procesos de *antibunching*. El fenómeno de *antibunching* está vinculado al tiempo necesario para re-excitar a una molécula una vez que emitió un fotón. Esto produce una disminución en $G(\tau)$ a tiempos

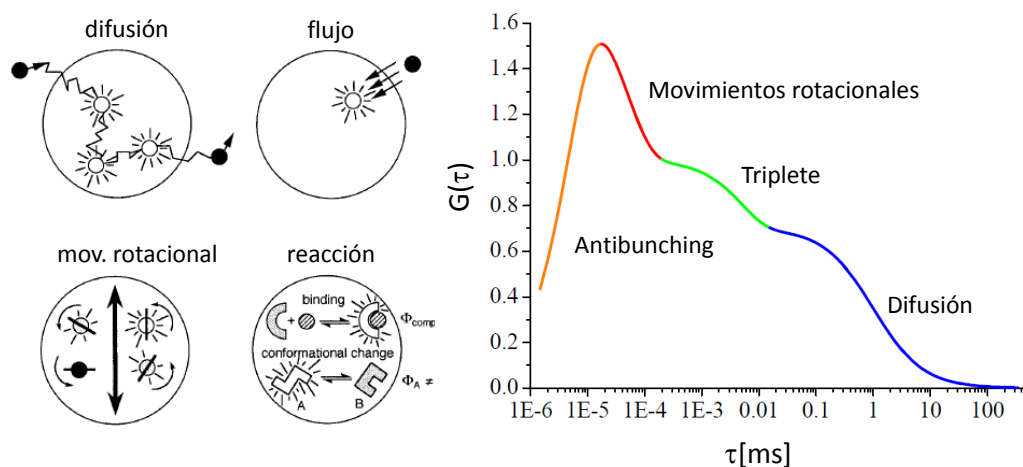


Figura 2.5: Distintos fenómenos que pueden estudiarse por FCS y el intervalo temporal asociado. Figura modificada de: [Valeur 2001] y [Schwille et al. 2004].

más cortos que el tiempo de vida del estado excitado emisor de la molécula. En la región de los ns aparecen los movimientos rotacionales de moléculas pequeñas en solución acuosa y a los μs , aparecen procesos rápidos de isomerización y pasaje al triplete. A partir de algunas decenas de μs y hasta los segundos, los fenómenos de difusión dominan la forma de $G(\tau)$. En general, una molécula en solución está sometida a varios de estos procesos simultáneamente. En ese caso, cada uno aportará un tiempo característico diferente. Si además los tiempos característicos están suficientemente separados cada fenómeno se observará como un “hombro” en la función de correlación.

2.2. Derivación de la función de correlación para el caso difusional

La aplicación más habitual de esta técnica es en la determinación de coeficientes de difusión. Por esta razón, en esta sección se deriva la expresión analítica para la función de correlación en el caso en el que las fluctuaciones de la intensidad están dadas por la difusión de moléculas. Dado que las fluctuaciones relativas aumentan al disminuir la cantidad de moléculas es importante mantener en promedio un número pequeño de moléculas simultáneamente en el volumen de observación. Esto puede hacerse por dilución de la muestra y/o reduciendo el volumen de observación. La mayoría de los experimentos de FCS, usan un microscopio por absorción de 2 fotones o un microscopio confocal que permiten obtener volúmenes $\sim 1 \mu\text{m}^3 = 1$ femtolitro. En esta sección se derivan las ecuaciones para experimentos de FCS basados en una geometría confocal. Si las fluctuaciones de la señal provienen

únicamente de la variación del $\langle N \rangle$ en el volumen de observación, la intensidad de fluorescencia detectada a tiempo t , $I(t)$ se puede escribir como:

$$I(t) = \int_V \eta PSF(\mathbf{r}) I_{exc}(\mathbf{r}) C(\mathbf{r}, t) dV \quad (2.4)$$

donde $\eta = K \sigma_{abs} \phi$, K es la eficiencia de detección, σ_{abs} es la sección eficaz de absorción de la molécula, y ϕ es la eficiencia cuántica de emisión de la fluorescencia. $PSF(\mathbf{r})$, (de las siglas en inglés Point Spread Function) es la función espacial que describe la respuesta óptica del microscopio para un objeto puntual y está determinada por el objetivo de microscopio, la abertura confocal y la longitud de onda del haz de excitación. $I_{exc}(\mathbf{r})$ es la dependencia espacial de la intensidad de excitación cuyo máximo es I_0 y $C(\mathbf{r}, t)$ es la concentración de moléculas en la posición \mathbf{r} a tiempo t . Determinar todos estos parámetros de manera independiente es muy difícil. Para simplificar la ec. 2.4, el producto de las funciones $PSF(\mathbf{r})$ y $I_{exc}(\mathbf{r})/I_0$, se puede escribir como una única función, que describe la distribución espacial de la emisión de la fluorescencia colectada, ec. 2.5. Para el caso de detección confocal se demostró [Qian et al. 1991, Rigler et al. 1993], que una función 3D Gaussiana donde ω_0 y ω_z son las distancias en la dirección lateral y axial, respectivamente, en las cuales la intensidad cae a un valor $1/e^2$ del valor de I_0 , es una buena aproximación para la distribución de fluorescencia colectada.

$$p_{norm}(\mathbf{r}) = PSF(\mathbf{r}) \frac{I_{exc}(\mathbf{r})}{I_0} = e^{-2(x^2+y^2)/\omega_0^2} e^{-2z^2/\omega_z^2} \quad (2.5)$$

El resto de los parámetros, K , σ_{abs} , ϕ e I_0 se pueden combinar para definir un nuevo parámetro, Q , que da el número de fotones detectados por molécula por segundo,

$$Q = \eta I_0 \quad (2.6)$$

Con todas estas simplificaciones, la ec. 2.4 se puede reescribir como:

$$I(t) = Q \int_V p_{norm}(\mathbf{r}) C(\mathbf{r}, t) dV \quad (2.7)$$

Luego, aplicando la expresión 2.7 a la definición de la función de correlación para la intensidad de fluorescencia dada en 2.2, la función de correlación se puede escribir como:

$$\begin{aligned} \tilde{G}(\tau) &= \frac{\langle I(t)I(t+\tau) \rangle}{\langle I \rangle^2} \\ &= Q^2 \frac{\int_V \int_{V'} p_{norm}(\mathbf{r}) p_{norm}(\mathbf{r}') \langle C(\mathbf{r}, t) C(\mathbf{r}', t+\tau) \rangle dV dV'}{\left(Q \int_V p_{norm}(\mathbf{r}) \langle C(\mathbf{r}, t) \rangle dV \right)^2} \end{aligned} \quad (2.8)$$

En la expresión 2.8 se pueden distinguir dos contribuciones. Una contribución, $p_{norm}(\mathbf{r})$, que depende únicamente de la geometría del volumen de observación,

y otra que depende del proceso físicoquímico que origina las fluctuaciones de la intensidad. Esta última, que en el caso general llamaremos $g(\mathbf{r}, \mathbf{r}', \tau)$, está dada para el caso difusional por [Aragón et al. 1976]:

$$g(\mathbf{r}, \mathbf{r}', \tau) = \langle C(\mathbf{r}, t) C(\mathbf{r}', t + \tau) \rangle = \frac{\langle C \rangle}{8(\pi D \tau)^{3/2}} e^{-\frac{(\mathbf{r}-\mathbf{r}')^2}{4D\tau}} \quad (2.9)$$

donde D es el coeficiente de difusión de las moléculas y $\langle C \rangle$ es el valor medio de la concentración. Finalmente se incluye la definición del volumen de observación, V_{obs} , que usando la ec. 2.5 queda

$$V_{obs} = \frac{\left[\int_V p_{norm}(\mathbf{r}) dV \right]^2}{\int_V p_{norm}^2(\mathbf{r}) dV} = \pi^{3/2} \omega_0^2 \omega_z \quad (2.10)$$

Todas estas simplificaciones permiten obtener una expresión analítica para la función de correlación normalizada, que para el caso difusional está dada por la ec. 2.11 [Aragón et al. 1976]

$$\begin{aligned} \tilde{G}_{dif}(\tau) &= \frac{1}{\langle N \rangle} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_c^{\omega_0}} \right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_c^{\omega_z}} \right)^{-1/2} + 1 \\ &= \frac{1}{\langle N \rangle} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_c^{\omega_0}} \right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_c^{\omega_0}} \left[\frac{\omega_0}{\omega_z} \right]^2 \right)^{-1/2} + 1 \\ &= G_{dif}(\tau) + 1 \end{aligned} \quad (2.11)$$

donde $\tau_c^{\omega_0}$ y $\tau_c^{\omega_z}$ son los tiempos de correlación característicos en las direcciones de los semiejes ω_0 y ω_z . Notar que en 2.11, cada uno de los grados de libertad de movimiento aportan a la correlación con un término de la forma $\left(1 + \frac{\tau}{\tau_c} \right)^{-1/2}$. En la práctica, como $\omega_z \gg \omega_0$, [Mayboroda et al. 2003], $\tau_c^{\omega_z} \gg \tau_c^{\omega_0}$ y el decaimiento de las fluctuaciones está determinado por un único tiempo de correlación que corresponde a la difusión de las moléculas a través de la dimensión más corta del volumen de observación (ω_0 en este caso). La Figura 2.6 muestra la dependencia de la ec. 2.11 con la concentración de moléculas y con su coeficiente de difusión.

Una vez determinado el tiempo característico de correlación, el coeficiente de difusión, D , se puede calcular a partir de la expresión,

$$\tau_c = \frac{\omega_0^2}{4D} \quad (2.12)$$

Notar que para $\tau = 0$, la amplitud de la correlación, $G_0 = G(\tau = 0)$ es la inversa del número medio de moléculas en el volumen de observación. Por lo tanto, conocidos los valores de ω_0 y ω_z , se puede determinar la concentración local de moléculas con una resolución espacial del orden del femtolitro. La ec. 2.11 da

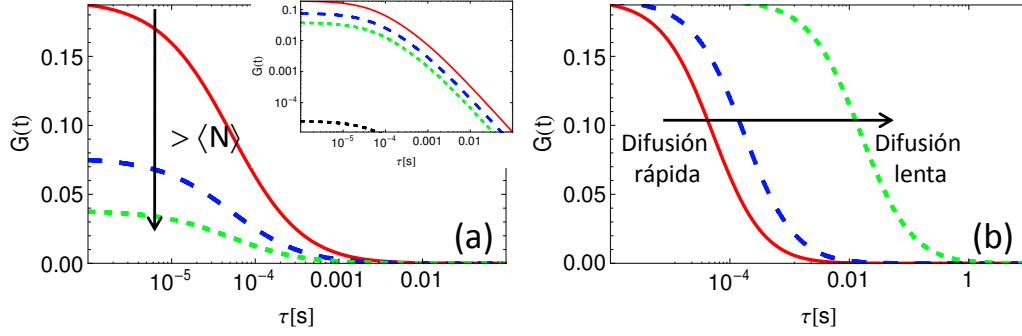
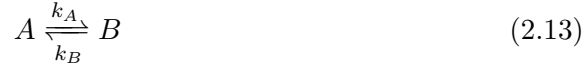


Figura 2.6: Función de correlación para el caso difusional, ec. 2.11, para moléculas difundiendo a través de un volumen de tamaño $\omega_0 = 0.25 \mu\text{m}$ y $\omega_z = 5 \omega_0$ en las direcciones radial y axial respectivamente. (a): Dependencia con la concentración. $D = 300 \mu\text{m}^2/\text{s}$, concentraciones 20 nM (línea llena), 50 nM (línea punteada larga), 100 nM (línea punteada corta). En el recuadro insertado se muestran las curvas en escala doble logarítmica para una mejor visualización de las amplitudes. También se agregó la concentración 150 μM como referencia para los experimentos que se muestran en el capítulo 7. (b): Dependencia con el coeficiente de difusión. $C = 20 \text{ nM}$, $D = 300 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (línea llena), $D = 90 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (línea punteada larga), $D = 1 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (línea punteada corta).

la función de correlación cuando la única causa de fluctuaciones es la difusión de las moléculas a través del volumen de observación. Además se observa un tiempo característico, un “nuevo hombro” de la función de correlación, por cada fenómeno fotofísico que cambie la intensidad de fluorescencia entre dos estados A y B con distintas propiedades de emisión.



Se demostró [Widengren et al. 1995, Widengren et al. 1994], que la función de correlación para estos procesos es una función exponencial definida como:

$$\tilde{G}(\tau)_{reaccion} = G_{0R} \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_R}\right) + 1 \quad (2.14)$$

donde

$$\frac{1}{\tau_R} = k_A + k_B \quad (2.15)$$

con k_i las constantes de reacción y G_{0R} la amplitud dada por

$$G_{0R} = \frac{k_A k_B (\phi_A - \phi_B)^2}{(k_A + k_B)(k_A \phi_A^2 + k_B \phi_B^2)} \quad (2.16)$$

Luego, si la reacción no altera las propiedades de difusión de las moléculas, la solución para la función de correlación total se puede expresar: como el producto de las funciones de correlación de la intensidad debidas a la difusión y a la reacción

[Widengren et al. 1998, Palmer et al. 1987b]; o equivalente, como la suma de las funciones de correlación de las fluctuaciones de la intensidad debidas a la difusión y a la reacción, que en el caso $\tau_c^{reaccion} \ll \tau_c^{dif}$ queda,

$$\begin{aligned}\tilde{G}(\tau)_{total} &= \tilde{G}(\tau)_{dif} \tilde{G}(\tau)_{reaccion} \\ &\sim 2G(\tau)_{reaccion} + G(\tau)_{dif} + 1 \\ &\sim G(\tau)_{total} + 1\end{aligned}\tag{2.17}$$

2.2.1. Relaciones señal-ruido en experimentos de FCS

Como se dijo anteriormente en este capítulo, la dependencia temporal de $G(\tau)$, está determinada únicamente por los eventos que están correlacionados entre sí. Sin embargo, los eventos no correlacionados, aportan con un nivel de señal (al que llamaremos ruido de fondo) que tiene un efecto sobre la función de correlación. La contribución del ruido en experimentos de FCS es un punto muy importante y, sin embargo, pocas veces tenido en cuenta. Tener una estimación del nivel de ruido es un indicador importante para el diseño del experimento. En el trabajo de Koppel [Koppel 1974] se hace una deducción rigurosa de la relación señal-ruido, S/R , en el caso en el que $\langle N \rangle \gg 1$. La relación obtenida por Koppel se puede expresar como:

$$\frac{S}{R} \propto \frac{m^{\frac{1}{2}} Q \Delta T}{\sqrt{1 + 4Q\Delta T + 2(Q\Delta T)^2 \left[\frac{\tau_c}{\Delta T} \right]}}\tag{2.18}$$

donde ΔT es el intervalo de tiempo de conteo de fotones, m es el número total de intervalos medidos durante un experimento, y Q es la cantidad de fotones detectados por molécula por segundo. De este modo, $Q\Delta T$ es la cantidad de fotones detectados por molécula en el intervalo de detección. Se distinguen dos casos límite:

$$Q\Delta T \ll 1 : \quad \frac{S}{R} \propto m^{\frac{1}{2}} Q \Delta T\tag{2.19}$$

$$Q\Delta T \gg 1 : \quad \frac{S}{R} \propto m \left(\frac{\Delta T}{\tau_c} \right)^{\frac{1}{2}}\tag{2.20}$$

Un tiempo característico típico correspondiente a la difusión a través de un volumen de observación confocal para una molécula orgánica en solución acuosa es $\sim 100 \mu\text{s}$. Tomando una medición cada $1 \mu\text{s}$ y suponiendo una velocidad de detección de 30000 fotones por molécula por segundo, $Q\Delta T = 0.03$. Para estos valores de $Q\Delta T$ los resultados de la expresión derivada por Koppel muestran que: **(a)** la S/R no depende del número medio de moléculas en el volumen de observación, **(b)** la dependencia de la S/R con la variable Q es mucho más fuerte que con m , es decir es muy importante optimizar la cantidad de fotones detectados por molécula/s. Una pérdida en la eficiencia de detección de un factor 10, se compensa con un aumento en un factor 100 de la cantidad de intervalos de medición, es decir un factor 100 en la duración total del experimento.

El caso de $\langle N \rangle \ll 1$, fue estudiado más recientemente en los trabajos de Qian y Kask [Qian et al. 1990, Kask et al. 1997],

$$\frac{S}{R} \propto \sqrt{\langle N \rangle} \quad (2.21)$$

El aumento en la concentración de moléculas aumenta la relación señal-ruido, sin embargo como se mencionó anteriormente, la función de correlación disminuye con el incremento de $\langle N \rangle$. Es decir, hay un límite práctico en la determinación de la concentración óptima de moléculas que aumenta la S/R y aún permite obtener una correlación con una amplitud aceptable. Las ec. 2.19, 2.20 y 2.21 son importantes al momento de diseñar un experimento de FCS. Ya se mencionó en esta sección que en un experimento típico de difusión donde tenemos algunas pocas decenas de moléculas en el volumen de observación, la ec. 2.19 es la que determina la S/R . Para un experimento de duración total $m\Delta T$ fija, la S/R se puede mejorar aumentando el ΔT o el Q . El intervalo de integración está mas o menos determinado por la duración del τ_c que se desee estudiar. Una regla general es tomar $\Delta T \sim \frac{\tau_c}{20}$, de ese modo el τ_c estará definido por 20 puntos o más. La manera más sencilla de aumentar Q es aumentando la potencia del láser de excitación. Por supuesto esto también tiene un límite. A potencias de excitación muy elevadas, aparecen efectos de fotoblanqueo de las moléculas. En este regimen, el fenómeno ya no es estacionario, que es condición necesaria para aplicar esta técnica.

Resumiendo, el parámetro importante a optimizar en un microscopio diseñado para experimentos de FCS, es la cantidad de fotones detectados/molécula/s, Q . Esto se hace eligiendo correctamente los componentes ópticos, principalmente el objetivo de microscopio y los filtros, el uso de detectores de alta eficiencia de detección y bajo ruido de oscuridad y otros detalles experimentales que se discuten en el capítulo 3.

Otro punto importante de analizar es cómo el nivel de ruido de fondo afecta la amplitud de la función de correlación. Este efecto puede explicarse en términos de la relación S/R . En el caso en que la S/R esté dada por la ec.2.19 la amplitud de la correlación queda definida por la ecuación:

$$G_0 = \frac{\langle N \rangle Q^2}{(\langle N \rangle Q + I_{fondo})^2} \quad (2.22)$$

donde $G_0 = G(\tau = 0)$ es la amplitud de la función de correlación y $\langle N \rangle Q + I_{fondo}$ es la intensidad media total colectada en presencia de ruido de fondo, I_{fondo} . En muchos experimentos de FCS, $I_{fondo} \ll \langle N \rangle Q$ y, por lo tanto, la amplitud de la correlación es simplemente $1/\langle N \rangle$. Sin embargo vale la pena remarcar que esta relación es válida únicamente en el caso $I_{fondo} \ll \langle N \rangle Q$. Si, en cambio I_{fondo} no es despreciable comparado con $\langle N \rangle Q$, la amplitud de la correlación disminuye con el aumento en I_{fondo} . En los experimentos donde $I_{fondo} \sim \langle N \rangle Q$ la amplitud de la correlación se debe interpretar con más cuidado. Nuevamente, el parámetro a

optimizar es Q . Si el ruido de fondo se origina en una región del espectro corrida respecto a la emisión de la molécula los filtros de emisión son una solución fácil de implementar. Cuando el ruido de fondo está en la misma longitud de onda de la emisión de las moléculas el problema es más complejo. Una posibilidad es usar moléculas que tengan un corrimiento de Stokes grande [Valeur 2001].

2.2.2. Técnicas alternativas a FCS: FRAP, QELS y FRET

FCS no es la única técnica que permite obtener información de la dinámica de procesos dentro de una célula. Fluorescence Recovery After Photobleaching, FRAP, mide la recuperación de la señal de fluorescencia que se da en un volumen previamente blanqueado y que resulta de la renovación de las moléculas fotoblanqueadas por moléculas nuevas. Esta técnica permite obtener coeficientes de difusión de manera directa. La principal ventaja de FRAP sobre FCS radica en lo fácil de la interpretación cualitativa de los datos. En muchos casos, distintas regiones dentro de una célula se pueden caracterizar con una simple inspección de las curvas de FRAP. FCS en cambio, requiere de un procesamiento y una interpretación más cuidadosa de los datos. La desventaja más importante de FRAP se debe a que para lograr un completo blanqueamiento del volumen de observación, es necesario someter a la muestra a altas dosis de radiación, lo que la convierte en una técnica altamente invasiva.

De manera menos invasiva, se usó la técnica de Dispersión de luz cuasi-elástica (QELS de las siglas en inglés Quasi-Elastic Light Scattering) para obtener información a partir de las fluctuaciones en la luz dispersada. Estas fluctuaciones están dadas al igual que en el caso de FCS por el movimiento Browniano al que están sometidas las moléculas en solución [Berne et al. 1976], sin embargo esta técnica no es suficientemente sensible hasta el nivel de moléculas individuales.

Una técnica muy difundida para el estudio de la dinámica en la escala de moléculas individuales es Forster Resonance Energy Transfer, FRET, [Valeur 2001]. Esta técnica mide la separación entre dos puntos que pueden corresponder a la misma molécula o a moléculas distintas a partir de la transferencia de energía entre 2 cromóforos (donante y aceptor), cuyos espectros de emisión (donante) y de excitación (aceptor) se superponen. La eficiencia en la transferencia de energía depende fuertemente de la separación entre el donador y el aceptor, y por lo tanto es muy conveniente para el estudio de fenómenos de asociación y disociación, o para seguir en el tiempo la distancia entre dos sitios de una macromolécula que varía por un cambio conformacional. Por la fuerte dependencia con la distancia entre donador y aceptor, con esta técnica únicamente se pueden estudiar procesos que ocurren en el intervalo de 1 a 10 nm [Hillisch et al. 2001]. En su versión tradicional, FRET no permite obtener coeficientes de difusión.

FCS corrige las falencias de sus precursores ya que mide la evolución de las fluctuaciones alrededor del equilibrio y de manera no invasiva. Para monitorear las fluctuaciones, FCS utiliza la señal provista por marcadores fluorescentes. Actualmente existen marcadores con muchísimas posibilidades de funcionalización, de

manera que se puede estudiar sitios muy específicos y bien determinados. Al igual que en el caso de FRAP para determinar el coeficiente de difusión es necesario conocer características geométricas del volumen de observación. En el caso en el que el ruido de fondo sea despreciable comparado con la señal dada por la difusión de las moléculas, FCS permite obtener la concentración con una resolución espacial del orden del femtolitro.

2.3. Comentarios finales

Actualmente no hay dudas acerca de que FCS es una poderosísima técnica que permite obtener información cuantitativa y de manera no invasiva dentro de una célula. En los últimos años esta técnica ha sido adaptada para abarcar distintas condiciones experimentales. En este capítulo se dio una brevísima introducción a los conceptos más generales de las técnicas de correlación. Hay mucha y muy buena bibliografía acerca de estos temas. A continuación se cita en orden arbitrario bibliografía complementaria a la citada a lo largo de este capítulo.

[Rigler 1995] Fluorescence correlations, single molecule detection and large number screening. Applications in biotechnology. [Schwille et al. 2001] Fluorescence correlation spectroscopy and its potential for intracellular applications. [Hess et al. 2002] Biological and chemical applications of fluorescence correlation spectroscopy: a review. [Medina et al. 2002] Fluorescence correlation spectroscopy for the detection and study of single molecules in biology. [Elson 2004] Quick tour of fluorescence correlation spectroscopy from its inception. [Thompson et al. 2002] Recent advances in fluorescence correlation spectroscopy. [Bulsecu et al. 2007] Fluorescence correlation spectroscopy: molecular complexing in solution and in living cells. [Berland et al. 2004r] Fluorescence correlation spectroscopy: a new tool for quantification of molecular interactions.

Capítulo 3

Diseño y construcción de un microscopio confocal para experimentos de FCS

En este capítulo se presentan los instrumentos utilizados para hacer los experimentos de FCS de esta Tesis. Gran parte de los resultados que se incluyen en este trabajo fueron obtenidos usando un microscopio confocal comercial FV1000 de Olympus Inc. Sin embargo, también fue parte de esta Tesis el diseño y la construcción de un segundo microscopio confocal optimizado para sortear ciertas limitaciones asociadas al equipo comercial. En este capítulo se describe en detalle el principio de funcionamiento y se muestran las calibraciones y los experimentos de control que verifican el buen funcionamiento del instrumento contruido. Finalmente se hace una comparación entre ambos instrumentos.

3.1. Descripción general

Como se mencionó en el capítulo anterior, en experimentos de FCS es necesario que el volumen de observación contenga muy pocas moléculas (del orden de 1 a 100). Si bien en principio esto puede hacerse tanto por dilución de la muestra como por reducción del volumen de observación, muchos procesos biológicos involucran interacciones moleculares en la escala nanométrica y a concentraciones relativamente altas. Este hecho impone la primera condición importante al instrumento que queremos construir. El volumen de observación debe ser “pequeño” como para poder estudiar procesos con alta resolución espacial y a altas concentraciones. Con el objeto de determinar qué otras condiciones debe reunir el instrumento para hacer experimentos de FCS, se hace una estimación de la cantidad de fotones que se espera detectar en el caso de una única molécula presente en el volumen de observación. Una molécula con un tiempo de vida de algunos nanosegundos, excitada continuamente a la mayor velocidad posible, emite del orden de 10^8 fotones/s. En el visible esto equivale a pocas decenas de pW que se emiten en todas

las direcciones. En la práctica, solo se detecta una fracción de la señal total emitida. Si suponemos que la eficiencia de colección del objetivo de microscopio es menor al 50% (limitada principalmente por la apertura numérica) y tenemos en cuenta una eficiencia cuántica máxima de detección de los detectores del 60%, Figura 3.5, se puede contar del orden de 10^7 fotones/s, lo que equivale en el visible a pocos pW que llegan a detectarse. Es decir, solo el 10% de la señal emitida por la molécula. Queda claro entonces, que una de las dificultades que debemos enfrentar para hacer este experimento, esta dada por el bajo nivel de la señal que se necesita detectar y, por lo tanto, separar del ruido de fondo. El ruido de fondo aparece como consecuencia de la fluorescencia debida a impurezas en el solvente, cubreobjetos, y componentes ópticos; filtraciones del haz de excitación en el sistema de detección, así como de la corriente de oscuridad propia del detector y la dispersión Raman del solvente. Este análisis preliminar nos permite concluir que el instrumento que se necesita construir debe permitir: (i) *generar un volumen de observación pequeño* para tener pocas moléculas y reducir el ruido de fondo, (ii) *óptica con alta eficiencia de colección*, y (iii) *detectores de alta eficiencia cuántica y baja corriente de oscuridad*. Uno de los dispositivos experimentales tradicionales que reúne todas estas características es un arreglo de microscopía confocal.

Un esquema básico del funcionamiento de un microscopio confocal se muestra en la Figura 3.1. El haz de excitación es un láser que luego de reflejarse en un espejo dicróico se enfoca en la muestra a través de un objetivo de microscopio, de magnificación y apertura numérica altas. La emisión fluorescente se colecta con el mismo objetivo y se enfoca en una pequeña abertura (abertura confocal). La introducción de una abertura confocal en el sistema óptico actúa como filtro espacial posibilitando que sólo la luz proveniente del foco contribuya a la formación de la imagen. Después de la abertura confocal la luz de la fluorescencia se reenfoca en los detectores.

Para iluminar una zona de la muestra limitada por difracción, se expande el haz de excitación de manera de aprovechar toda la pupila de entrada del objetivo de microscopio. Esto tiene varias ventajas. Por un lado evita irradiar zonas de la muestra que no se están observando. Además, para una concentración fija, disminuir el volumen de observación aumenta la relación señal-ruido. Otra ventaja de un volumen de observación pequeño es que reduce el tiempo característico de difusión de las moléculas. Esto permite el estudio de moléculas mucho más grandes y en entornos muy viscosos. El límite de difracción de un microscopio confocal ha sido intensamente estudiado [Webb et al. 1996]. Cuando la iluminación y la detección se hacen a través del mismo objetivo, un criterio para expresar la resolución lateral en el límite de difracción es usar el ancho a mitad de altura de la PSF(\mathbf{r}) lateral del microscopio,

$$\omega_0 = \frac{0,61\lambda}{\sqrt{2}NA} \quad (3.1)$$

donde ω_0 es la resolución lateral; λ , la longitud de onda de excitación, y NA la apertura numérica del objetivo. Análogamente la resolución axial se puede expre-

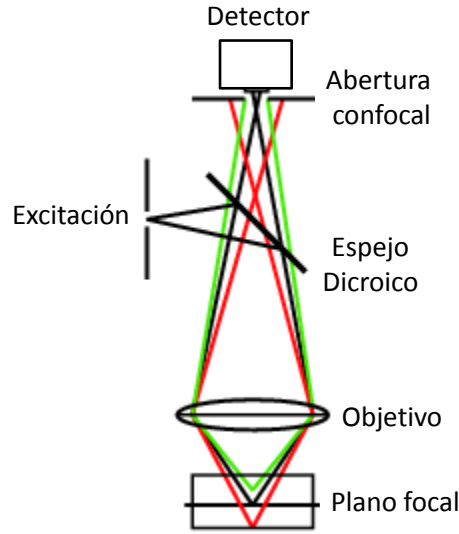


Figura 3.1: Esquema de un arreglo de microscopía confocal. El haz proveniente del plano focal (negro) llega al sistema de detección mientras que los haces provenientes de otros planos (rojo y verde) se enfocan antes o después de la apertura confocal. La apertura ubicada en el plano imagen del sistema remueve la mayor parte de la luz proveniente de regiones fuera del foco.

sar como el ancho a mitad de altura de la PSF(\mathbf{r}) axial del microscopio,

$$\omega_z = \frac{2n\lambda}{\sqrt{2} NA} \quad (3.2)$$

donde n es el índice de refracción del medio. Para un objetivo de $NA = 1.4$, en un medio de índice de refracción 1.5 y una iluminación a 532 nm, la resolución lateral teórica es ~ 170 nm y la resolución axial teórica ~ 820 nm. En la práctica, las aberraciones introducidas por las lentes o los pequeños desajustes de las componentes del microscopio permiten obtener resoluciones ~ 230 nm y $\sim 1 \mu\text{m}$ en las direcciones lateral y axial, respectivamente.

3.2. Configuración experimental

La configuración experimental del microscopio confocal construido se muestra esquemáticamente en la Figura 3.2. El haz de excitación es un láser continuo de Nd:YAG de 532 nm y 10 mW de potencia. Este pasa a través de un polarizador (P1) y una lámina de cuarto de onda (L/4) que permiten rotar la polarización del haz incidente o incluso utilizar luz circularmente polarizada. Un telescopio (T) expande el haz hasta el tamaño de la pupila de entrada del objetivo para enfocar al límite de difracción. Luego de la reflexión sobre un espejo (E1) y una lámina de caras paralelas (L//), la luz se envía a un objetivo de microscopio de apertura

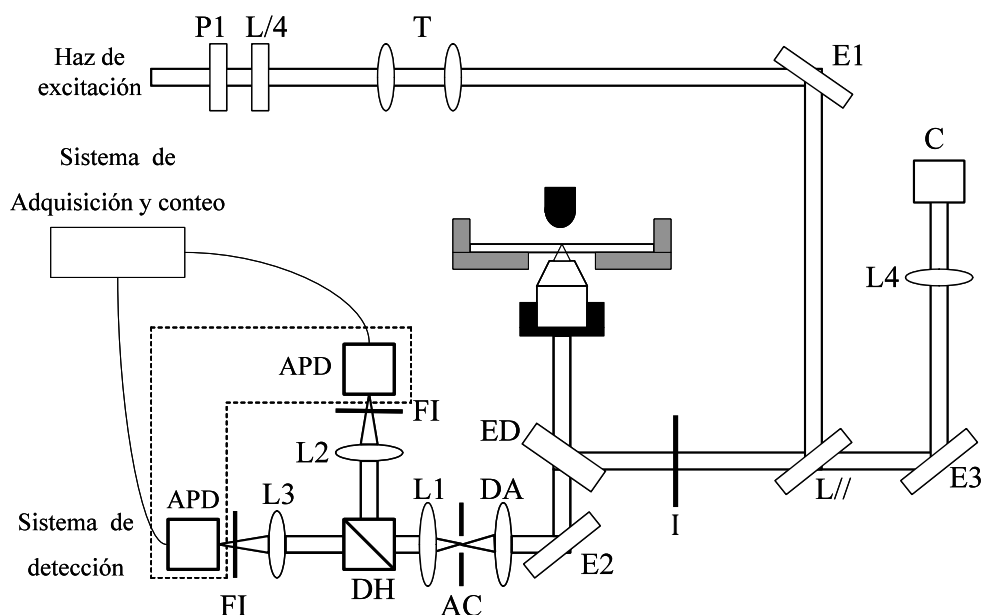


Figura 3.2: Esquema del microscopio confocal construido. P1 polarizador, L/4 lámina de cuarto de onda, T telescopio, E1-E3 espejos, L// lámina de caras paralelas, I iris, ED espejo dicróico, DA doblete acromático, AC apertura confocal, L1-L4 lentes, DH divisor de haz, F filtros, APD fotodiodos de avalancha, C cámara.

numérica grande. Una fracción de la fluorescencia generada por la muestra se colecta por el mismo objetivo y se enfoca por un doblete acromático (DA) sobre la apertura confocal (AC). Luego de la apertura, la luz se colima utilizando una lente (L1) y se dirige a un divisor de haz (DH) luego de lo cual es re-enfocada sobre dos detectores idénticos. En la Figura 3.3(a) se muestra una foto del microscopio construido con una vista de la zona de excitación. En la Figura 3.3(b) se muestra la zona de detección.

Una característica importante es el carácter modular y abierto de este dispositivo. Es muy sencillo introducir modificaciones en cualquier parte del microscopio lo que lo convierte en un instrumento sumamente versátil. Por ejemplo, se puede reemplazar el divisor de haz por un espejo dicróico o por un divisor por polarizaciones y así hacer experimentos de co-localización o de anisotropía, respectivamente. En las secciones siguientes se presenta una descripción más detallada y con los detalles técnicos más importantes de los componentes del microscopio. Finalmente se dan algunas consideraciones prácticas, producto de la experiencia adquirida.

3.2.1. Excitación de la muestra

La elección del láser de excitación se hace en función de la longitud de onda deseada, la estabilidad, y la potencia requeridas. La intensidad debe ser suficientemente baja de manera tal de no fotoblanquear a la molécula durante el tiempo

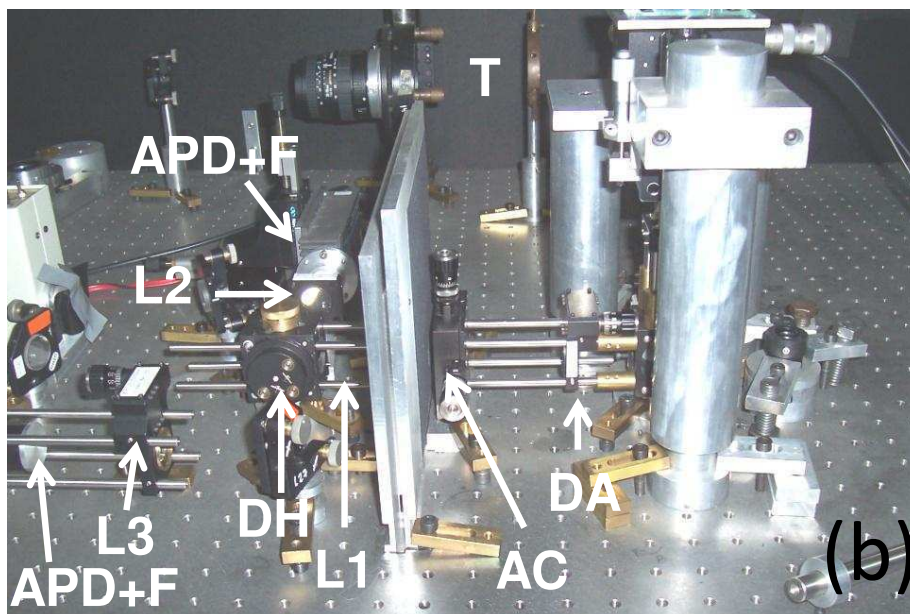
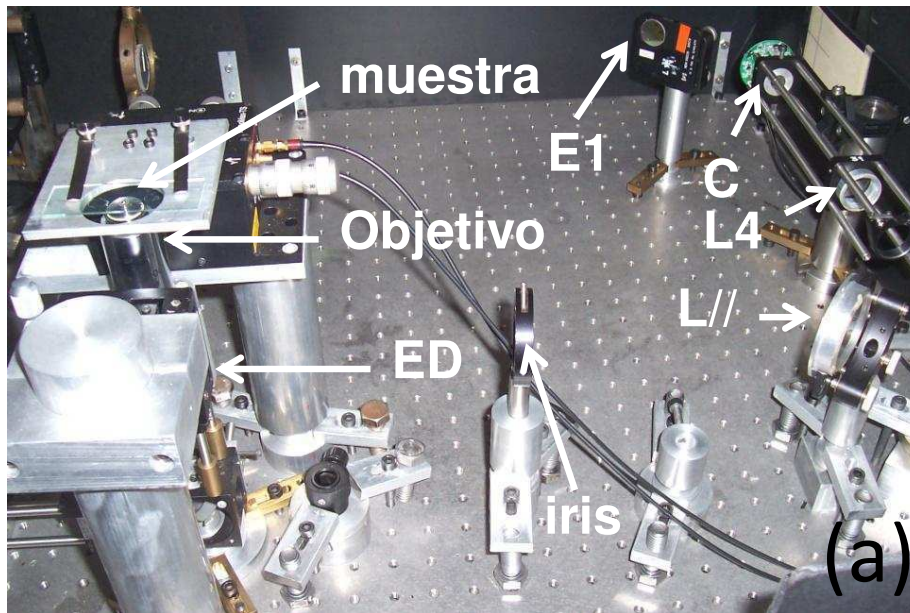


Figura 3.3: (a): Vista de la zona de excitación. Se señalan los componentes principales de esta zona. (b): Vista de la zona de detección.

de residencia en el volumen de observación. Además, es importante para enfocar al límite de difracción que el perfil de intensidad del haz se corresponda con un modo TEM₀₀. En nuestro caso se utilizó un láser de 532 nm continuo, bombeado por diodos, (Uniphase), de 10 mW de potencia de salida, optimizado para obtener $\sim 80 \mu\text{W}$ sobre la muestra. La caracterización del haz revela que el láser a la entrada del telescopio tiene 1.7 mm de diámetro, una divergencia de 1 mrad y que está linealmente polarizado en la dirección perpendicular a la mesa, datos en concordancia con las especificaciones del fabricante. A continuación, la luz del láser pasa a través de un telescopio (T), luego del cual el tamaño medido para el haz es de 7 mm. Luego, el haz se refleja en un espejo (E1) y en una lámina de caras paralelas (L//) para incidir en un espejo dicróico (ED) 560DRLP de Omega Filters. El ED tiene una reflectividad mayor que el 95 % a 532 nm y una transmisión mayor que el 85 % para longitudes de onda por encima de 560 nm y del orden del 50 %, para longitudes de onda por debajo de 500 nm, como puede verse en la Figura 3.4. El haz se enfoca sobre la muestra utilizando un objetivo de microscopio. Debido a que el objetivo se utiliza tanto para iluminar la muestra como para coleccionar la fluorescencia, la calidad del mismo es de crucial importancia para el óptimo funcionamiento del microscopio. Para maximizar la colección de la señal, se usó un objetivo de magnificación y apertura numérica grandes, Nikon Plan-Apo 100X de inmersión en aceite, NA 1.4 y distancia de trabajo 130 μm . El objetivo se montó sobre un tornillo micrométrico que permite movimientos gruesos entre el objetivo y la muestra. Para movimientos más finos la platina se montó sobre un posicionador motorizado de 3 grados de libertad NanoMax, de Thorlabs, que permite hacer barridos en 3 dimensiones controlando el movimiento de la platina con la computadora.

3.2.2. Colección de la emisión de fluorescencia

Parte de la señal emitida por la muestra se colecciona con el mismo objetivo que se usó para excitar. Luego atraviesa el ED, se refleja en E2 y se enfoca sobre la AC. La optimización del tamaño de la AC fue considerada por otros autores [Rigler et al. 1993]. La mayor relación señal-ruido se obtiene para un tamaño de AC que corresponda al tamaño de la imagen de la zona iluminada sobre la AC. Suponiendo que se enfoca al límite de difracción y se usa un objetivo de magnificación 100, el diámetro adecuado de la abertura es de 50 μm . Esto resulta en un volumen típico de detección del orden de 1 fl. Luego, la luz de fluorescencia es colimada por L1 y enviada a un divisor de haz (DH) que lo separa en 2 haces en una relación 50/50. Finalmente, para eliminar eficientemente la componente de luz correspondiente a la longitud de onda de excitación, se usan filtros de corte (Omega Filters). En la Figura 3.4 se muestran los espectros del espejo dicróico y de los filtros de emisión conjuntamente con el espectro de uno de los colorantes usados en las experiencias, tetrametilrodamina, TMR, en solución acuosa a PH 7.

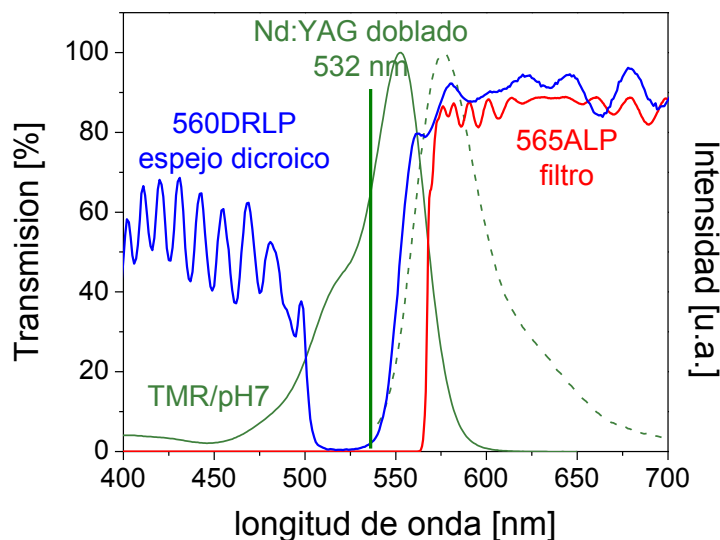


Figura 3.4: En verde, los espectros de absorción (en línea llena) y fluorescencia (en línea punteada) de TMR en solución a pH 7. En azul, el espectro de transmisión del espejo dicróico, ED. En rojo el espectro de transmisión de los filtros, F.

3.2.3. Sistema de detección

Para este tipo de experimentos, se pueden usar detectores operando tanto en modo analógico como en modo digital (modo de conteo de fotones). Sin embargo, si se esperan muy pocas moléculas simultáneamente en el volumen de observación y, por lo tanto muy pocos eventos, el modo de conteo de fotones tiene una mejor relación señal ruido que el modo analógico. Un detector comercial, optimizado para el modo de conteo de fotones, es el fotodiodo de avalancha de la serie SPCM de Perkin-Elmer. Un fotodiodo de avalancha es un fotodiodo sometido a una tensión en inversa de forma que los fotoelectrones generados puedan a su vez generar nuevos pares electrón hueco al acelerarse bajo la influencia de un campo eléctrico fuerte. Este proceso de ionización en la cual el número final de electrones que da lugar a la corriente es mayor que el número de fotoelectrones, es la base de estos dispositivos. En este trabajo se utilizan 2 fotodiodos de avalancha SPCM-AQR13 de Silicio. Estos detectores tienen un área sensible de $180 \mu\text{m}$ de diámetro y una eficiencia cuántica de detección máxima del 65 % a 650 nm. Los detectores están enfriados para mantener la estabilidad ante cambios en la temperatura ambiente y para disminuir el ruido térmico. Los SPCM-AQR son sensibles desde el visible y hasta el infrarrojo cercano y pueden detectar fotones con una frecuencia máxima de conteo de 10 MHz (10 millones de eventos por segundo). La Figura 3.5 compara la eficiencia cuántica de los detectores disponibles en el mercado. Una característica importante de estos detectores es que entre pulsos detectados hay

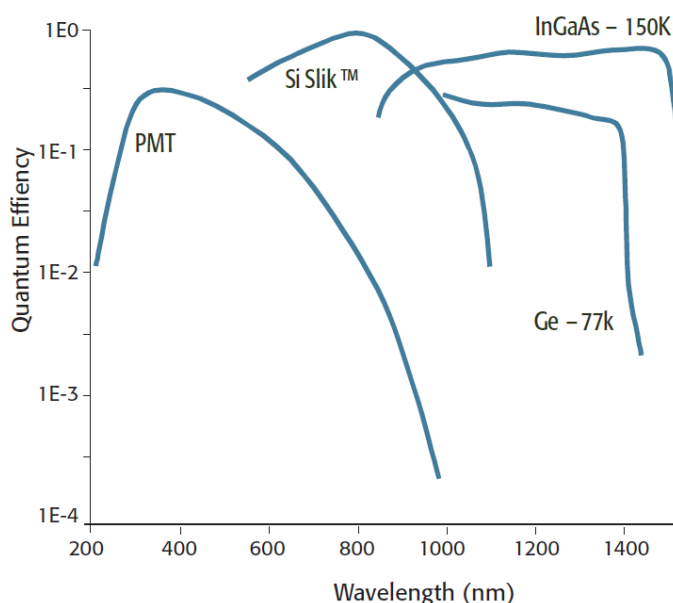


Figura 3.5: Curvas típicas de eficiencia cuántica para los fotocátodos más comunes disponibles en el mercado. El fotocátodo que usan los detectores de la serie SPCM de Perkin Elmer es el Slik.

un “tiempo muerto” de 50 ns, tiempo durante el cual la llegada de un nuevo fotón no producirá ningún fotoelectrón. Este tiempo corresponde al tiempo necesario para resetear a todos los componentes. Una vez en el estado original el detector está preparado para recibir otro fotón. Otra característica de los detectores que trabajan en el modo de conteo de fotones es que tienen una cierta probabilidad de que un único fotón detectado genere 2 pulsos (en vez de 1).

3.2.4. Sistema de adquisición de datos

El objetivo es tener un sistema de adquisición que permita almacenar los eventos registrados por el detector de manera automática. Para esto se desarrolló un programa, en entorno LabView, que permite la interacción del operador del microscopio con el sistema de adquisición de datos. Una placa de adquisición capaz de detectar eventos con las características de los pulsos de salida de los detectores es la placa contadora de National Instrument PCI6602. La serie 6602 ofrece ocho contadores independientes de 32 bits cada uno. Con estos dispositivos pueden realizarse una variedad de tareas, incluyendo conteo de eventos, medidas de ancho de pulsos, generación de pulsos, generación de series de pulsos y medidas de frecuencia. En esta aplicación se van a utilizar tres contadores; uno para determinar el tiempo de conteo de los eventos y uno para registrar la salida de cada detector. El programa desarrollado, Figura 3.6, permite controlar de manera independiente las variables del experimento: el tiempo durante el cual se cuentan los eventos

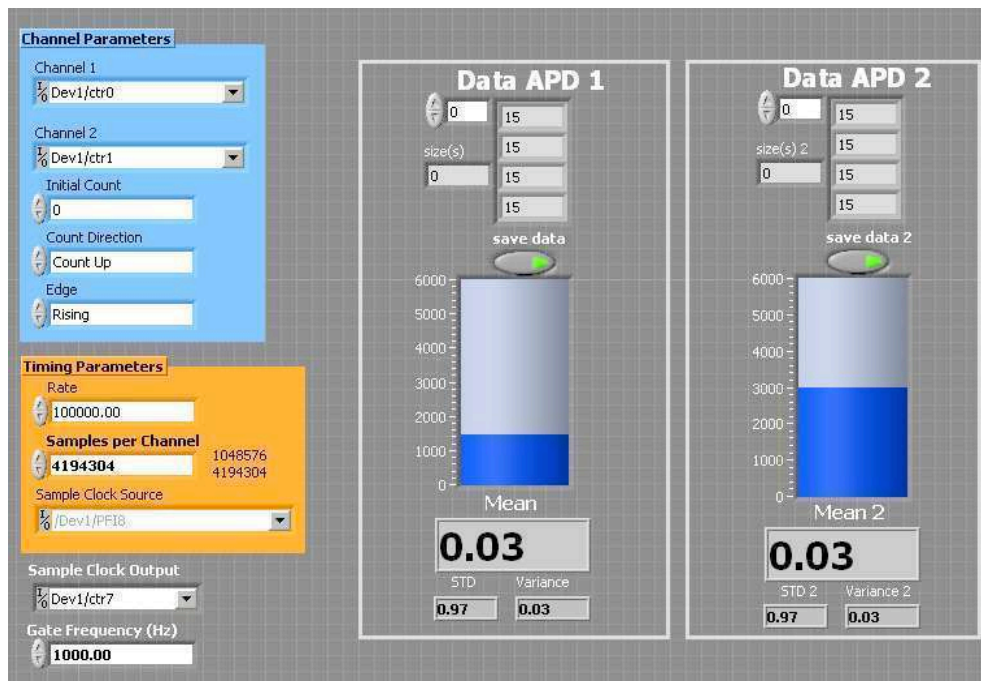


Figura 3.6: Ventana de control del programa. Desde aquí se configuran los parámetros para la adquisición de los datos usando una placa PCI6602 de National Instrument.

y la duración total del experimento. La Figura 3.6 muestra la ventana principal desde la cual se pueden controlar los parámetros de adquisición. Los contadores que se desee utilizar en cada experimento pueden ser especificados en los recuadros correspondientes. Los indicadores que aparecen en la ventana principal permiten ver el número medio de fotones detectados por segundo. Esto puede usarse para maximizar la señal durante el proceso de alineación y como una medida de control durante el transcurso del experimento. La barra indicadora completa señala que los detectores están cerca de su umbral de saturación.

3.2.5. Programa de correlación y ajuste de datos

Una vez adquiridos los datos de cantidad de fotones detectados en intervalos de conteo sucesivos, hay que calcular la función de correlación, ec. 2.2. Si bien existen tarjetas de adquisición y correlación comerciales, estas tienen una serie de desventajas. En general, son “programas cerrados” que solo dan la función de correlación y en muchos casos no se tiene acceso a los datos originales. En cuanto a los algoritmos de ajuste, los programas comerciales vienen programados con los modelos más habituales. En nuestro caso será necesario ajustar los datos con un modelo nuevo. Por estos motivos se optó por desarrollar un programa en Matlab. El programa permite cargar los datos de hasta dos detectores para calcular la función de auto-correlación (correlación de un único detector consigo mismo) o la

función de correlación cruzada (correlación entre los dos detectores). En una etapa posterior, el programa desarrollado en esta Tesis se contrastó con un programa de correlación comercial, SimFCS (LFD, Urbana).

3.2.6. Adquisición de las imágenes

Para la mayoría de las aplicaciones resulta conveniente tener una imagen de la muestra por transmisión. Esto se implementó iluminando la muestra desde arriba con una lámpara dicróica. La luz blanca pasa a través de la muestra y parte de la señal se refleja en el ED. Luego de atravesar la lámina de caras paralelas (L//) se enfoca sobre una cámara. Por esta razón, y dado que se dispone de potencia de excitación en exceso, utilizamos una lámina de caras paralelas en vez de un espejo en este punto. Una lente de 200 mm de distancia focal (L4) provee sobre la cámara una imagen de 50 μm cuando se observa una zona iluminada al límite de difracción. Esta imagen corresponde a 15 píxeles de la cámara.

3.2.7. Alineación del microscopio

La alineación del sistema implica alinear el haz de excitación, el láser, y el haz de emisión, la luz de fluorescencia. Como primer paso se alinea el **láser de excitación** de manera que pase centrado con respecto al objetivo. Esto se hace utilizando un espejo y una lámina de caras paralelas (E1 y L//) montados sobre posicionadores de dos grados de libertad que se encuentran a la entrada del microscopio. La alineación fina del **haz de emisión** tiene dos etapas. Primero se centra la AC de manera que la imagen de la zona iluminada en la muestra quede sobre la AC; luego se hace una imagen de la AC sobre los detectores. Para ubicar la AC, se colecta la emisión de una muestra fluorescente muy concentrada, por ejemplo Rodamina ~ 1 mM, y se mueve la AC de manera de maximizar la luz de fluorescencia que la atraviesa. La ventaja de usar una muestra muy concentrada es que esta etapa se puede hacer a ojo mirando a través de la AC la imagen del volumen iluminado proyectada sobre una pantalla. Una vez que la AC está ubicada, se montan dos iris que permiten recuperar la dirección del haz que hace imagen sobre la posición determinada para la AC. La Figura 3.7 muestra el efecto del cambio en la dirección del haz sobre la posición de la AC. Con la AC alineada, y los iris ubicados, se montan los detectores en la posición de la imagen de la AC. Para la alineación gruesa se pueden usar los detectores tapados y la muestra fluorescente concentrada, de manera de ubicar a los detectores centrados con respecto a la luz de fluorescencia. Finalmente, se maximiza la señal colectada de una muestra en concentración nM, iterando el movimiento en los tres ejes de los detectores.

Diariamente se deben corregir pequeñas desviaciones del láser de excitación con respecto a la dirección fijada por los iris en el momento de la alineación principal. Para esto se utilizan el espejo y la lámina de caras paralelas (E1 y L//) que se encuentran a la entrada del microscopio.

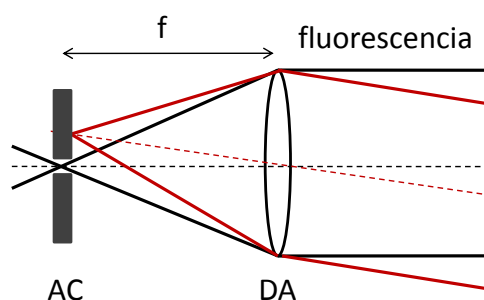


Figura 3.7: Efecto de un cambio en la dirección del haz de excitación sobre la alineación del microscopio. Fijada la posición de la AC se deben corregir diariamente las pequeñas desviaciones del láser de excitación.

3.3. Consideraciones prácticas

3.3.1. Potencia sobre la muestra

Habitualmente cuando se exponen moléculas a altas dosis de radiación, estas pueden reaccionar por diferentes caminos (ej. fotodisociación, adición a una doble ligadura, transferencia de protón, etc.). Estos procesos conducen muchas veces a la destrucción del cromóforo en un proceso que se llama en general fotoblanqueo. Para una molécula muy estable la probabilidad de fotoblanqueo es de 10^{-8} . Como se mencionó anteriormente en este capítulo, una molécula puede ser excitada hasta 10^8 veces por segundo, es decir que su vida media es del orden de un segundo en condiciones de excitación saturada. En estas condiciones, el fotoblanqueo es la causa por la cual se produce la disminución en el número de moléculas en el volumen irradiado. Esta disminución en el número de moléculas, seguido por la consecuente disminución en la intensidad de la señal emitida, es un efecto a tener en cuenta principalmente durante el proceso de alineación del microscopio y optimización del desempeño del sistema.

3.3.2. Adsorción de moléculas sobre el cubreobjetos

Las concentraciones típicas para experimentos de FCS van desde algunas centenas de nM (10^{-9} M) hasta unos pocos pM (10^{-12} M). Esto permite tener unas pocas moléculas en un volumen de observación del orden del femtolitro. Al trabajar con soluciones tan diluidas existen algunos efectos que se deben tener en cuenta. Habitualmente cuando se pone una gota de solución sobre un cubreobjetos, se produce la adsorción de una fracción de las moléculas sobre la superficie del vidrio. Este efecto, que generalmente es ignorado en soluciones más concentradas, en el caso de soluciones utradiluidas resulta en un cambio dramático de la concentración volumétrica. Para solucionar esto se pone una gota sobre un cubreobjetos limpio, se la deja algunos segundos y luego se renueva la muestra, usando siempre la misma punta de pipeta (para evitar el efecto de la adsorción en la punta). Co-

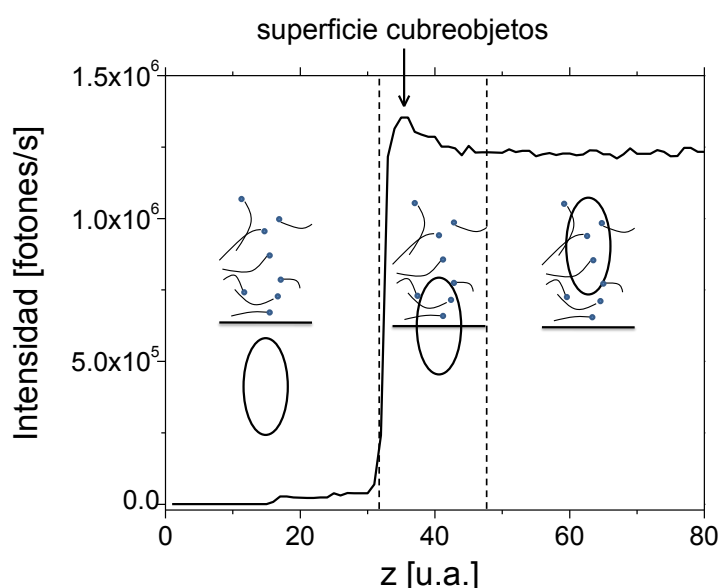


Figura 3.8: Intensidad colectada a medida que se acerca el objetivo al cubreobjetos. Se distingue claramente una zona de mayor intensidad luego de la cual la intensidad permanece constante mostrando que el volumen de observación está completamente dentro de la muestra.

mo ahora la superficie del cubreobjetos llegó al equilibrio de adsorción, una simple inspección barriendo el eje z durante el enfoque, permite determinar muy fácilmente la posición de la superficie del vidrio. La Figura 3.8 muestra la intensidad colectada mientras se hace un barrido en el eje z con el objetivo. Se distinguen claramente tres zonas. Cuando el volumen de observación está fuera de la muestra, la intensidad media colectada es igual al ruido de fondo del microscopio. A medida que el volumen de observación ingresa a la muestra, las moléculas que están difundiendo y las moléculas que están adsorbidas sobre la superficie contribuyen a la señal colectada. Debido a las moléculas adsorbidas el máximo de la señal colectada se corresponde con el volumen de observación centrado con respecto al cubreobjetos. A medida que el volumen de observación sigue entrando en la muestra, las moléculas adsorbidas son excitadas y detectadas con menor eficiencia contribuyendo proporcionalmente menos a la señal total colectada. Finalmente, cuando el volumen de observación está completamente dentro de la muestra, la intensidad colectada adquiere un valor constante.

3.3.3. Identificación de agregados de moléculas

Uno de los fenómenos más habituales que distorsionan la curva de correlación es la aparición de eventos muy brillantes ocasionados por grandes agregados de moléculas fluorescentes atravesando el volumen de observación. El brillo de estos

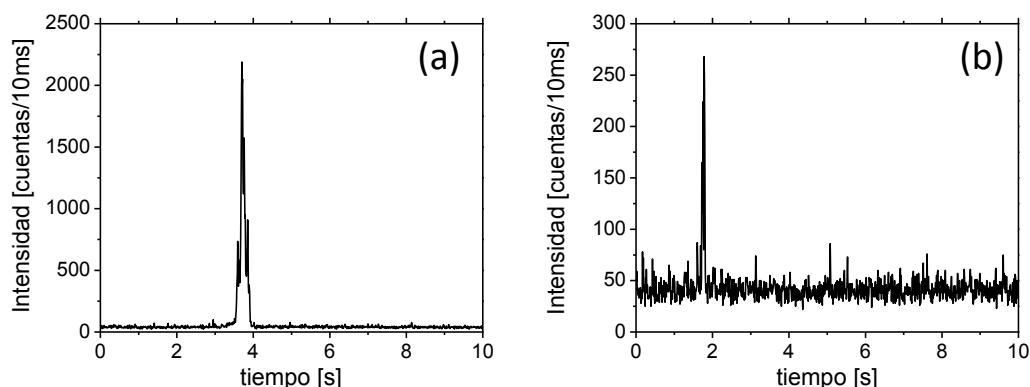


Figura 3.9: Detección de agregados a partir de la inspección de las trazas temporales de intensidad de fluorescencia colectada. (a): Después de tres segundos un agregado de moléculas difunde por el volumen de observación aumentando 50 veces el valor medio de la señal. En (b): un agregado más pequeño difunde a través del volumen de observación. El tamaño del agregado se puede estimar tanto a partir del valor máximo de la intensidad como de su duración.

agregados se debe a dos factores. Por un lado estas estructuras están formadas por muchas moléculas fluorescentes. Además, debido al aumento en la masa, estas estructuras permanecen más tiempo en el volumen de observación. La Figura 3.9 muestra dos mediciones de la intensidad en función del tiempo para una solución de α -sinucleína 250 pM en agua. La α -sinucleína fue modificada en la posición 90 con una molécula de Cy3. El tiempo de conteo es 10 ms y el tiempo total de adquisición es de 10 s. La Figura 3.9(a) muestra que después de 3 segundos la intensidad aumenta dramáticamente en un factor 50 lo que representa un comportamiento inusual, algo similar ocurre luego de 2 segundos en la Figura 3.9(b), esta vez en un factor 7. Notar que el aumento en el máximo de intensidad aparece acompañado de un aumento en la duración del pico lo cual es consistente con un aumento de la masa del agregado y, por lo tanto, un mayor tiempo de residencia en el volumen de observación. Nuestra experiencia nos permite concluir que es preferible adquirir los datos en muchas series temporales cortas en vez de en una única serie más larga. De este modo, cada serie se puede analizar individualmente y esto permite descartar las mediciones donde se obtengan picos inusuales. Además, acumular muchas series temporales permite calcular las curvas de correlación y después promediarlas dando una estimación del error estadístico en cada punto de la correlación.

3.4. Caracterización del microscopio construido

3.4.1. Calibración del volumen de observación

Para convertir el tiempo característico recuperado de la función de correlación en un coeficiente de difusión, o la amplitud de la correlación en una concentración

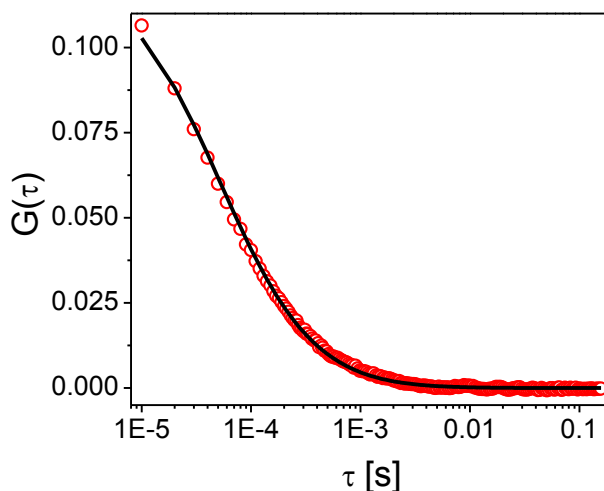


Figura 3.10: Curva de correlación medida para una muestra 18 nM de Tetrametil-Rodamina en agua. El tiempo de conteo es de $10 \mu\text{s}$. La curva se obtuvo promediando 250 mediciones de 200 ms de duración cada una. Los parámetros del ajuste son: $\omega_0 = 0.24 \mu\text{m}$, $G_0 = 0.12$. Las desviaciones estandar en cada punto son más chicas que el tamaño del punto.

se deben conocer los parámetros geométricos del volumen de observación. En principio el volumen de observación depende de la longitud de onda del láser utilizado y la NA del objetivo de microscopio. En la práctica, pequeñas desalineaciones de los componentes ópticos o imperfecciones en el modo del haz tienen una influencia notoria en el volumen de observación. Por esta razón, se optó por realizar un experimento de calibración antes de cada serie de mediciones.

La calibración consiste en medir una muestra de coeficiente de difusión conocido. Luego, para una relación de aspecto fija, se mide τ_c y usando las expresiones 2.12 y 2.10 se determina el volumen de observación. Típicamente para un láser de 532 nm, un objetivo de $NA = 1.4$ y una relación de aspecto $\omega_z/\omega_0 = 5$ se obtienen valores de $(\omega_0 = 0.25 \pm 0.05) \mu\text{m}$. La Figura 3.10 muestra la curva de correlación de una solución 18 nM de Tetrametil-Rodamina en agua y el ajuste por un modelo puramente difusivo, 2.11.

Todas las calibraciones realizadas en este trabajo se hicieron usando soluciones de concentración conocida de rodaminas en agua. Un tipo de rodamina de particular interés para aplicaciones intracelulares es la Tetrametil-Rodamina (TMR). Esta molécula es muy aplicada en experimentos de FCS por absorción de 1 fotón. Su coeficiente de difusión es bien conocido: $D = 280 \mu\text{m}^2/\text{s}$, posee alta eficiencia de emisión de fluorescencia $\phi = 0.90$ y variadas posibilidades de funcionalización. La TMR es considerada un estándar para todo tipo de experimentos de fluorescencia [Haugland et al. 1996]. Otras moléculas utilizadas fueron: Rodamina 6G (Rod6G), Rodamina B (RodB), y en los casos donde fue necesario excitar usando

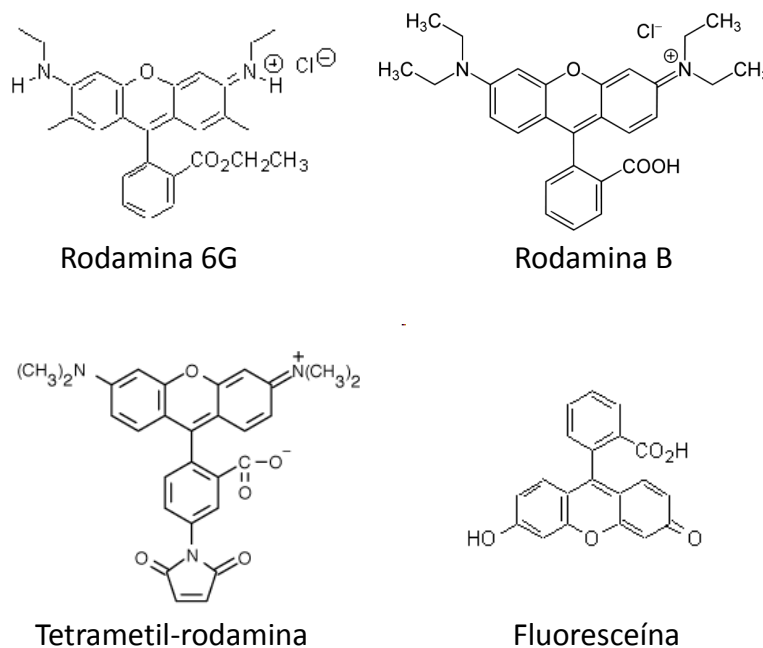


Figura 3.11: Estructura química de las moléculas más utilizadas en este trabajo.

molécula	D [$\mu\text{m}^2/\text{s}$]	λ_{abs}^{max} [nm]	referencia
Rod6G	280	527	[Magde et al. 1974]
	300	527	[Berland et al. 2004]
RodB	280	560	[Fujii et al. 1995]
TMR	280	550	[Haugland et al. 1996]
FITC	300	490	[Guiot et al. 2000]

Tabla 3.1: Coeficientes de difusión y máximos de absorción para las moléculas más utilizadas en este trabajo. Los valores de coeficientes de difusión corresponden a las moléculas en agua y a temperatura ambiente.

un láser azul se usó Fluoresceína (FITC), en buffer a $\text{pH} = 10$. La Figura 3.11 muestra la estructura química de las moléculas más utilizadas en este trabajo, mientras que en la Tabla 3.1 se resumen sus principales características.

3.4.2. Pruebas de desempeño

Sensibilidad del sistema construido

Una característica importante del sistema construido es cuan diferentes deben ser dos tiempos de correlación para que se puedan resolver. En la Figura 3.12 se muestran las curvas de correlación para dos muestras diferentes. En círculos negros

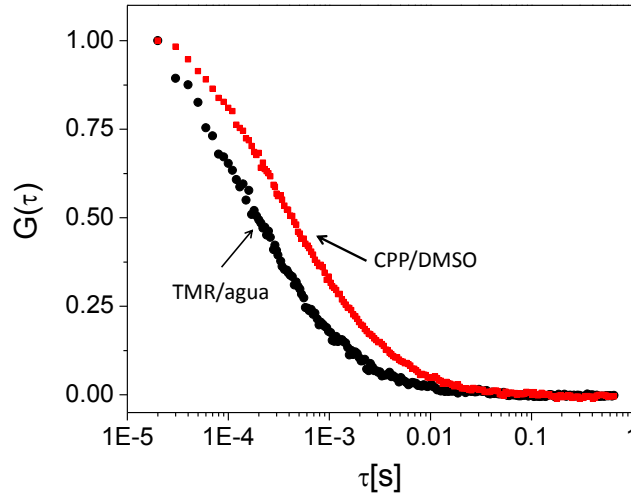


Figura 3.12: Curvas de correlación para dos muestras diferentes. En círculos negros TMR/agua, y en cuadrados rojos CPP/DMSO de coeficientes de difusión $D_{TMR/agua} = 280 \mu\text{m}^2/\text{s}$ y $D_{CPP/DMSO} = 130 \mu\text{m}^2/\text{s}$ respectivamente. Cada curva de correlación es el promedio de 200 mediciones. La incerteza de cada punto tomada como la desviación estandar de las 200 mediciones es más chica que el tamaño del punto.

TMR/agua, y en cuadrados rojos CPP/DMSO¹. La Figura 3.12 muestra que la sensibilidad del sistema construido permite discriminar fácilmente un factor dos en D , que usando la expresión de Stokes-Einstein, ec. 3.3, implica un factor dos en la viscosidad de la solución η_s , o en el radio hidrodinámico de la molécula R_h .

La ecuación de Stokes-Einstein permite estimar el coeficiente de difusión en términos del tamaño de la molécula,

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta_s R_h} \quad (3.3)$$

donde k es la constante de Boltzman, y T la temperatura del medio. En el caso particular de las proteínas globulares², el peso molecular de una proteína, P , se

¹Los CPP son péptidos de alrededor de 10 a 30 aminoácidos [Fischer et al. 2005] pero que a diferencia de la mayoría de los péptidos, se incorporan eficientemente a las células mamíferas. Además, cuando están conjugados a una molécula cargo, los CPPs le confieren esta capacidad al cargo. Se obtuvo la incorporación celular eficiente utilizando como moléculas cargo: péptidos, proteínas grandes (120 kDa), plásmidos, liposomas y nanopartículas. Por esta razón, los CPPs se han convertido en moléculas de interés en áreas como la biología y la biomedicina.

²Las proteínas globulares, o esferoproteínas tienen una estructura básicamente esférica y son una de los tres tipos principales en la clasificación de las proteínas según su forma (las otras son las fibrosas y las mixtas). Entre las proteínas globulares más conocidas tenemos la hemoglobina, un miembro de la familia de las globulinas. Otras proteínas globulares son las inmunoglobulinas (IgA, IgD, IgE, IgG e IgM), y las α , β y γ globulinas. Casi todas las enzimas con papeles importantes en el metabolismo son de forma globular, así como las proteínas implicadas en la transducción de señales en la célula.

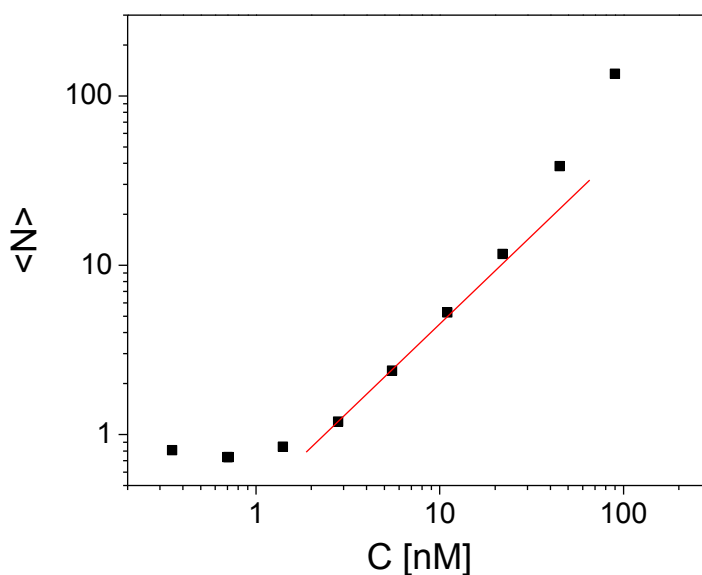


Figura 3.13: Relación entre el número de moléculas obtenido de la amplitud de la función de correlación y la concentración de la solución. El intervalo de concentraciones entre 2 nM y 30 nM muestra una relación inversamente proporcional entre la concentración y la cantidad de moléculas en el volumen de observación.

puede expresar en términos de la densidad molecular ρ como:

$$P = \frac{4}{3}\pi R_h^3 \rho \quad (3.4)$$

Como la densidad de las proteínas globulares no varía demasiado y es del orden de 0.7 g ml^{-1} [Jackson 2006], la ec. 3.3 sugiere que D es proporcional a $1/P^{1/3}$. Con esto, dos proteínas globulares sumergidas en el mismo medio, difieren un factor dos en D si difieren un factor ocho en su P . Es decir, para que el instrumento construido resuelva dos especies moleculares a partir de la medición del coeficiente de difusión, sus pesos moleculares, deben diferir un orden de magnitud aproximadamente [Krichevsky et al. 2002].

Intervalo de concentraciones

Para determinar el intervalo de concentraciones accesibles con el sistema construido se realizaron experimentos de correlación variando la concentración dos órdenes de magnitud. La Figura 3.13 muestra la cantidad de moléculas calculadas a partir de la amplitud de la correlación como función de la concentración de sonda utilizada.

Se analizaron muestras de TMR/agua entre 0.35 nM y 90 nM. La Figura 3.13 muestra que el intervalo de concentraciones adecuado para hacer experimentos de FCS está entre pocos nM y 100 nM. Por encima de estas concentraciones la

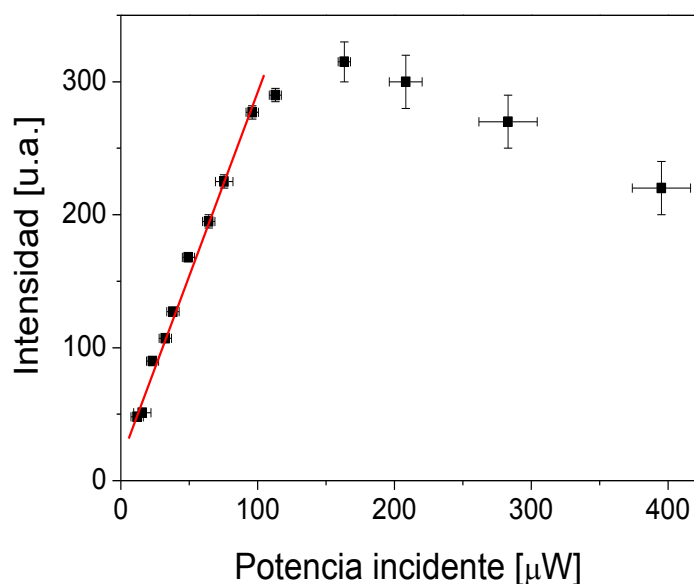


Figura 3.14: Relación entre la potencia de entrada y la intensidad colectada para una muestra de TMR/agua 120 nM. Hasta $\sim 100 \mu\text{W}$ el comportamiento es lineal, luego aparecen efectos de fotoblanqueo de la sonda.

cantidad de moléculas en el volumen de observación disminuye las fluctuaciones relativas. Por debajo del nM la cantidad de fotones con la que contribuye el ruido de fondo del microscopio es del mismo orden que la cantidad de fotones que provienen de la fluorescencia y, por lo tanto, la técnica se vuelve poco sensible a las fluctuaciones de la intensidad.

Potencia incidente

Se estudió el efecto de la potencia incidente sobre la emisión de una muestra fluorescente. En la Figura 3.14 se observa un comportamiento lineal hasta $100 \mu\text{W}$ aproximadamente medidos sobre la muestra. Luego, aparece una disminución de la intensidad colectada probablemente debida a efectos de fotoblanqueo de la sonda. Fotoblanqueo es un término genérico para todos los procesos que causan que la señal de fluorescencia desaparezca permanentemente. Aunque en principio una molécula puede excitarse y desexcitarse un número indefinido de veces, existe una probabilidad de que la molécula sufra una reacción fotoquímica que da lugar a un producto no fluorescente. Se estiman entre 10000 y 40000 ciclos como el límite para que en una molécula fotoquímicamente estable ocurra un fotoblanqueo permanente [Valeur 2001]. Para verificar que el apartamiento de la linealidad en la Figura 3.14 se debe a efectos de fotoblanqueo, se interrumpió la excitación por unos segundos y se observó la recuperación inmediata de la intensidad.

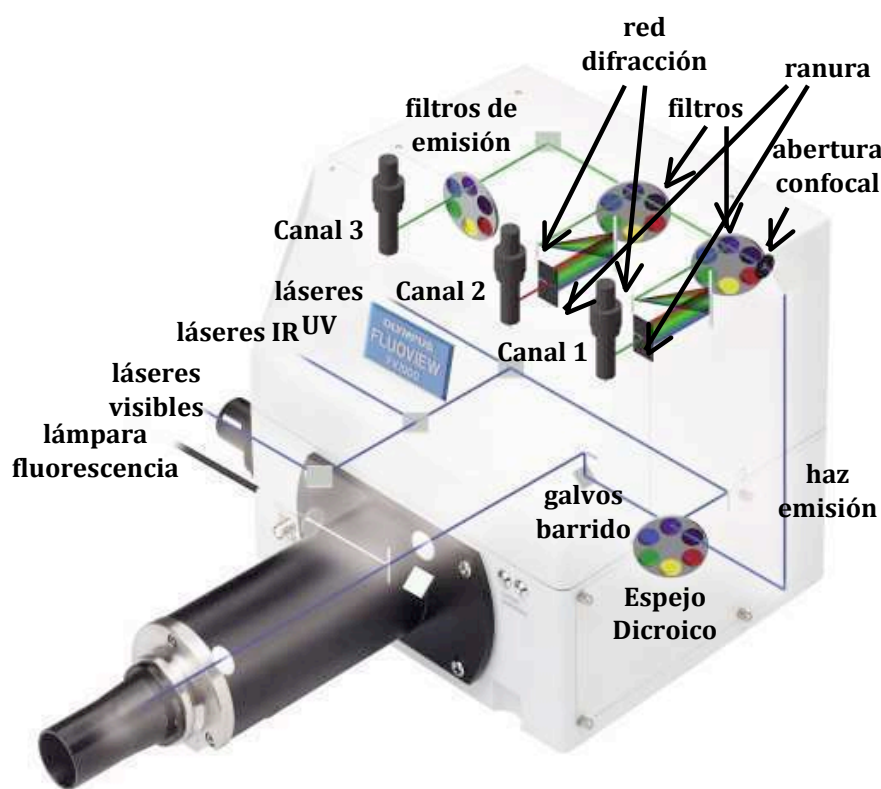


Figura 3.15: Esquema del microscopio confocal, Modelo FV1000 de Olympus.

3.5. Microscopio confocal comercial

El Laboratorio de Microscopías y Microespectroscopías del Departamento de Física de esta Facultad, adquirió hace dos años un microscopio confocal comercial FV1000 de Olympus. Un diagrama de este microscopio puede verse en la Figura 3.15. El microscopio tiene tres láseres que proveen de cinco longitudes de onda de excitación: 458 nm, 488 nm, 514 nm (líneas de un láser de Argón), 543 nm (He-Ne verde) y 635 nm (diodo). Tiene además tres canales de detección (uno de los cuales es espectral).

Las ventajas de este equipo con respecto al construido en esta tesis son: que se puede adquirir una imagen de fluorescencia, y la posibilidad de excitar con diferentes longitudes de onda, incluso simultáneamente. Esto último es una comodidad importante al momento de evaluar la composición de una región muy pequeña de la muestra, tema que se discute en el capítulo 5. Sin embargo, tiene dos limitaciones importantes. La primera es respecto al sistema de detección. El mínimo intervalo de tiempo de conteo de fotones, ΔT , es de $2 \mu\text{s}$. Para una molécula de TMR en agua a temperatura ambiente cuyo $D = 280 \mu\text{m}^2/\text{s}$ difundiéndose libre-

parámetro	Microscopio construido	Microscopio comercial
precio [U\$D]	~ 20 mil	~ 200 mil
ΔT [μs]	continuo: desde 0.1 a $\sim 10^6$	discreto: 2, 4, 8, 10, 12.5, 20, 40, 100, 200
λ_{exc} [nm]	532	458, 488, 514, 543, 635
P_{exc} [mW]	< 10	< 1
Detectores	SPCM AQR13	PMT R6357 Hamamatsu
Observaciones	se pueden medir dos colores(*) se pueden medir dos polarizaciones(**)	se pueden medir dos colores

Tabla 3.2: Tabla comparativa de los dos sistemas actualmente disponibles para hacer experimentos de FCS. (*) : se refiere a medir con dos detectores sintonizados para detectar diferentes regiones del espectro simultaneamente. Si dos especies de macromoléculas se marcan con sondas que emiten a distinta longitud de onda, este experimento permite recuperar la señal de las biomoléculas que se asociaron entre sí, es decir las que están marcadas con las dos sondas. (**) : se refiere a medir con dos detectores sintonizados para detectar diferentes polarizaciones simultaneamente. Este experimento se usa para estudiar movimientos rotaciones de moléculas.

mente en un volumen de observación de sección $\omega_0 = 220$ nm, el tiempo medio de residencia en el volumen de observación es de ~ 40 μs . En este caso, tomar datos en intervalos de tiempo de $\Delta T = 2$ μs no es un problema ya que el τ_c va a estar determinado por 40/2 datos experimentales. Sin embargo, para estudiar procesos más rápidos o en volúmenes mas pequeños es imprescindible adquirir datos en intervalos más cortos. La otra desventaja es que como todo equipamiento comercial, éste es un instrumento de muy difícil acceso para introducir modificaciones. En conclusión, ambos instrumentos son complementarios. Dependiendo de las necesidades específicas del experimento es más conveniente la utilización de un instrumento o el otro. En la Figura 3.2 se presentan las principales características de cada instrumento.

Capítulo 4

Modelo simplificado para la función de correlación

El esquema que se propone en esta Tesis para aumentar la resolución espacial de las técnicas de correlación, se basa en la existencia de campos electromagnéticos fuertemente intensificados y confinados alrededor de nanoestructuras metálicas. Estos campos que se originan cuando los electrones del metal entran en resonancia con el campo eléctrico incidente, generan dentro del volumen determinado por la detección confocal una región con propiedades ópticas diferentes. En esta situación, el volumen de observación tiene dos contribuciones: una que corresponde al volumen determinado por la detección confocal y otra que proviene del volumen intensificado en las inmediaciones de la nanoestructura. En este capítulo se presenta un modelo simplificado que permite obtener una solución analítica para la función de correlación en el caso de un volumen de observación formado por dos volúmenes cuyas distribuciones espaciales de intensidad son gaussianas en las tres dimensiones. Este modelo simplificado permite estudiar la factibilidad de una configuración de FCS de campo cercano y extraer criterios importantes para el diseño del experimento.

4.1. Descripción general

Como dijimos anteriormente, en este trabajo se utiliza la intensificación del campo electromagnético en la proximidad de una NP metálica para aumentar la resolución espacial de las espectroscopías de correlación. La intensidad de fluorescencia colectada en un esquema con estas características tiene dos contribuciones. Una proviene del volumen excitado y sin intensificar que corresponde a la detección confocal, cuya distribución espacial de la intensidad está dada en ec. 2.10, y la llamaremos volumen limitado por difracción, V_{dif} . La otra proviene del volumen intensificado en las inmediaciones de la nanoestructura y la llamaremos volumen reducido, V_{red} . Este volumen se puede modelar con mucho detalle, y una descripción rigurosa será utilizada para la deducción del modelo completo que se describe

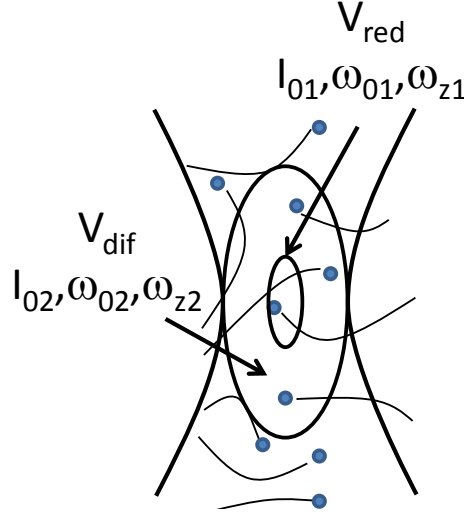


Figura 4.1: Esquema simplificado de las diferentes regiones presentes en un experimento como el que se propone para aumentar la resolución espacial de las técnicas de correlación. El volumen limitado por difracción, V_{dif} , (de parámetros $I_{02}, \omega_{02}, \omega_{z2}$), contiene al volumen reducido, V_{red} , (de parámetros $I_{01}, \omega_{01}, \omega_{z1}$) que aparece como consecuencia de la interacción resonante de la radiación incidente con la nanoestructura metálica.

en el capítulo 7. Por el momento, se quiere evaluar la factibilidad de un esquema de FCS basado en efectos de campo cercano. Para esto, el volumen reducido se modela como una región con distribución espacial de la intensidad gaussiana en los tres ejes. En trabajos anteriores [Qian et al. 1991, Rigler et al. 1993], se mostró que esta suposición aproxima muy bien el volumen de observación de un microscopio confocal. Por esta razón, es muy habitual encontrar en la literatura referirse al volumen de observación como un volumen 3D Gaussiano. La situación que queremos modelar es la esquematizada en la Figura 4.1, donde las dos regiones que contribuyen a la intensidad colectada corresponden a volúmenes 3D Gaussianos. Esta simplificación permite obtener una solución analítica para la función de correlación.

4.2. Derivación de la función de correlación para el caso de dos volúmenes 3D Gaussianos concéntricos

La derivación de la función de correlación para la situación donde a la intensidad de fluorescencia colectada contribuyen fotones de dos regiones diferenciadas y que pueden aproximarse por volúmenes 3D Gaussianos, se puede hacer siguiendo los pasos desarrollados en el capítulo 2. Donde la distribución espacial de la fluorescencia colectada está dada por:

$$p_{norm}(\mathbf{r}) = \alpha \underbrace{e^{-2(x^2+y^2)/\omega_{01}^2} e^{-2z^2/\omega_{z1}^2}}_{V_{red}} + \underbrace{e^{-2(x^2+y^2)/\omega_{02}^2} e^{-2z^2/\omega_{z2}^2}}_{V_{dif}} \quad (4.1)$$

El primer término de la ec. 4.1 corresponde a V_{red} , el segundo término a V_{dif} y $\alpha = I_{01}/I_{02}$ es el factor de intensificación en la intensidad entre los volúmenes. Reemplazando la ec. 4.1 en la ec. 2.2, y resolviendo analíticamente las integrales se obtiene la siguiente solución:

$$G(\tau) = \frac{1}{\langle C \rangle \pi^{3/2} (\alpha \omega_{01}^2 \omega_{z1} + \omega_{02}^2 \omega_{z2})^2} \left[\omega_{02}^2 \omega_{z2} g_2 + \right. \\ \left. + 2\sqrt{8}\alpha g_{12} \frac{\omega_{01}^2 \omega_{z1} \omega_{02}^2 \omega_{z2}}{(\omega_{01}^2 + \omega_{02}^2) \sqrt{\omega_{z1}^2 + \omega_{z2}^2}} + \alpha^2 \omega_{01}^2 \omega_{z1} g_1 \right] \quad (4.2)$$

donde

$$g_i = \left(1 + \frac{4D\tau}{\omega_{0i}^2} \right)^{-1} \left(1 + \frac{4D\tau}{\omega_{zi}^2} \right)^{-1/2} \quad (4.3)$$

$$g_{12} = \left(1 + \frac{8D\tau}{\omega_{01}^2 + \omega_{02}^2} \right)^{-1} \left(1 + \frac{8D\tau}{\omega_{z1}^2 + \omega_{z2}^2} \right)^{-1/2} \quad (4.4)$$

La expresión 4.2 tiene tres términos. El primer término, independiente de α , describe la correlación entre las moléculas contenidas en V_{dif} . Representa la probabilidad de hallar a una molécula en V_{dif} a $t = \tau$ si se encontraba en V_{dif} a $t = 0$ y es el único término que aparece si no hay intensificación. El segundo término, proporcional a α , describe la correlación cruzada entre las moléculas contenidas en V_{dif} y en V_{red} . Representa la probabilidad de hallar a una molécula en V_{red} a $t = \tau$ si se encontraba en V_{dif} a $t = 0$ o viceversa. El tercer término, proporcional a α^2 , describe la correlación entre las moléculas de V_{red} . Representa la probabilidad de hallar a una molécula en V_{red} a $t = \tau$ si se encontraba en V_{red} a $t = 0$. La posibilidad de obtener una solución analítica de la función de correlación en el caso de dos volúmenes concéntricos, permite hacer un análisis aproximado de las condiciones experimentales necesarias para obtener un aumento apreciable en la resolución espacial de experimentos de correlación. Con el objeto de obtener parámetros que permitan diseñar el experimento de FCS de campo cercano, en la siguiente sección se estudia la expresión analítica obtenida en la ec. 4.2 para distintos conjuntos de parámetros.

4.3. Análisis de la función de correlación para el caso de dos volúmenes 3D Gaussianos concéntricos

Un posible inconveniente de la técnica propuesta en este trabajo, consiste en que la señal proveniente del volumen de colección confocal, V_{dif} , enmascara la señal de la zona intensificada, V_{red} . Para demostrar que se pueden deconvolucionar las contribuciones de las dos regiones, y para tener una idea previa de los parámetros de diseño del experimento más importantes, se estudió la función de correlación resultante con respecto a dos aspectos fundamentales: el factor de intensificación y el tamaño de V_{red} en relación a V_{dif} .

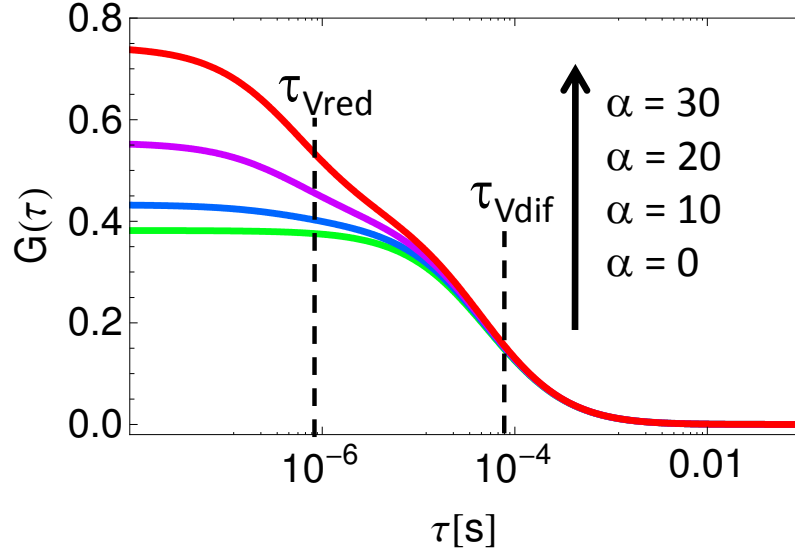


Figura 4.2: Función de correlación obtenida con la ec. 4.2 para la difusión de moléculas a través de un volumen de observación formado por dos volúmenes 3D-Gaussianos concéntricos en función del factor de intensificación, α . Los parámetros utilizados son: $\omega_{01} = 25$ nm, $\omega_{z1} = 5\omega_{01}$, para el volumen reducido; y $\omega_{02} = 250$ nm, $\omega_{z2} = 5\omega_{02}$ para el volumen limitado por difracción. $\langle C \rangle = 10$ nM, $D = 300 \mu\text{m}^2/\text{s}$.

En la Figura 4.2 se muestran las funciones de correlación que se obtienen si hay una región del espacio reducida con alta intensidad, superpuesta con una región más extendida y de menor intensidad, y que se dedujo en la ec. 4.2. La relación de intensidades media entre los volúmenes está determinada por el factor de intensificación, α . Para $\alpha = 0$, es decir cuando no hay intensificación, la función de correlación obtenida presenta un único tiempo de correlación que corresponde a la difusión de las moléculas a través de V_{dif} (curva verde). En este caso, la función de correlación resultante es la misma que se obtendría en un experimento de FCS de campo lejano. Sin embargo, para valores de α no muy altos, se ve que es posible obtener un tiempo de correlación adicional, más pequeño, que corresponde a la difusión de las moléculas a través de V_{red} . Por ejemplo, para $\alpha = 30$, que significa un factor de intensificación en el campo menor que 6, la función de correlación permite visualizar claramente los dos tiempos de correlación difusionales. Estos resultados son muy alentadores dados los bajos factores de intensificación necesarios para observar el tiempo de correlación correspondiente al volumen reducido.

Dado que con el esquema propuesto es posible distinguir el volumen reducido del volumen limitado por difracción, es razonable pensar en experimentos a concentraciones mayores a las permitidas por la técnica de FCS de campo lejano. En la Figura 4.3 se muestra el resultado para un caso realista de una intensificación de 80 en la intensidad, y una reducción del orden de 1000 en el volumen de observación. La función de correlación para el experimento de FCS convencional

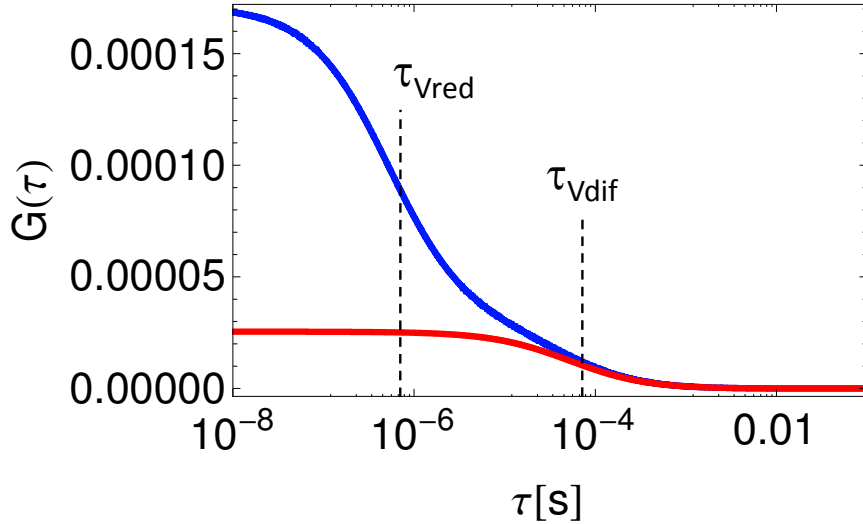


Figura 4.3: Funciones de correlación para: en rojo, el esquema de FCS de campo lejano (un único volumen, ec. 2.11) y, en azul, el esquema de FCS de campo cercano (dos volúmenes de observación, ec. 4.2). Los parámetros utilizados son: $\omega_{01} = 25$ nm, $\omega_{z1} = 5\omega_{01}$, para el volumen reducido; y $\omega_{02} = 250$ nm, $\omega_{z2} = 5\omega_{02}$ para el volumen limitado por difracción. $\langle C \rangle = 150$ μM , $D = 300$ $\mu\text{m}^2/\text{s}$ y $\alpha = 80$.

(un único volumen) muestra un tiempo de correlación difusional que corresponde al tránsito de las moléculas a través del volumen limitado por difracción (curva roja). Sin embargo, debido a las relaciones señal-ruido y a la estabilidad del sistema experimental (que limita la duración del experimento), es imposible separar tan pequeña amplitud de correlación de la señal de fondo. En la Figura 2.6(a) se mostró la dependencia de la función de correlación, con la concentración de la muestra. En el recuadro insertado se pueden ver las amplitudes de la función de correlación que van del orden de 0.1 para concentraciones alrededor del nM, a $\sim 2 \cdot 10^{-5}$ para una concentración 150 μM . Una vez más, concentraciones $\sim \mu\text{M}$ no son concentraciones accesibles con el esquema tradicional de FCS. Sin embargo, notar la función de correlación a $C = 150$ μM , en el esquema de FCS de campo cercano, ec. 4.2, que se muestra en azul en la Figura 4.3. En este caso, como consecuencia de la reducción del volumen de observación, además del tiempo difusional correspondiente al tránsito por V_{dif} es posible obtener el tiempo difusional asociado a la difusión a través de V_{red} . La amplitud de la función de correlación es casi un factor 10 más grande que en el caso tradicional. Esto demuestra que controlando el factor de intensificación y la relación de tamaños entre los volúmenes, es posible recuperar procesos que ocurren a concentraciones varios órdenes de magnitud mayores a las permitidas por la técnica de campo lejano.

En las simulaciones mostradas en las Figuras 4.2 y 4.3, se supuso un V_{red} mil veces menor que V_{dif} . En la Figura 4.4 se estudia cómo cambian las funciones de

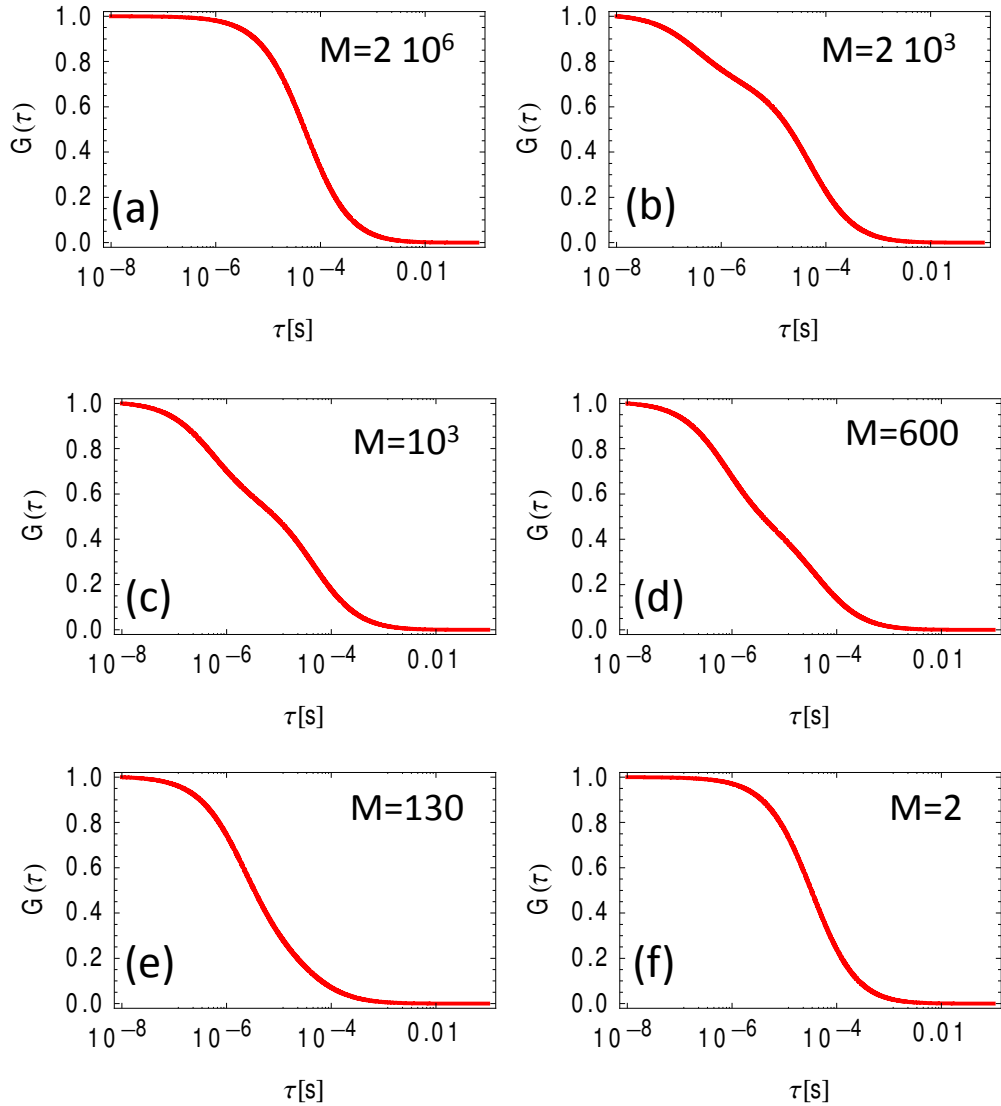


Figura 4.4: Función de correlación obtenida con la ec. 4.2 para la difusión de moléculas a través de un volumen de observación formado por la superposición de dos volúmenes 3D-Gaussianos concéntricos en función de la relación de tamaño entre los volúmenes, $M = V_{dif}/V_{red}$, que se indica en cada caso. Los parámetros utilizados son: $\alpha = 30$, $\omega_{z1} = 5\omega_{01}$, $\omega_{02} = 250$ nm, $\omega_{z2} = 5\omega_{02}$, $\langle C \rangle = 10$ nM, $D = 300 \mu\text{m}^2/\text{s}$, (a): $\omega_{01} = 2$ nm, (b): $\omega_{01} = 20$ nm, (c): $\omega_{01} = 25$ nm, (d): $\omega_{01} = 30$ nm, (e): $\omega_{01} = 50$ nm, (f): $\omega_{01} = 200$ nm.

correlación para volúmenes con diferentes relaciones de tamaño, $M = V_{dif}/V_{red}$. Cuando V_{red} es tan pequeño que durante el tiempo medio de residencia de una molécula en V_{red} la probabilidad de emitir un fotón es baja, la función de correlación está determinada por un único tiempo de correlación que corresponde al tiempo de residencia medio de las moléculas en V_{dif} , Figura 4.4(a). A medida que se aumenta V_{red} , hay una zona en la que los fotones provenientes de los dos volúmenes contribuyen a la correlación. En esa zona se pueden observar dos tiempos característicos bien diferentes: uno que corresponde al tiempo de residencia medio en V_{dif} (el más largo), y uno más corto que corresponde al tiempo de residencia medio de las moléculas en V_{red} , Figura 4.4(b) - (d). Si se sigue aumentando V_{red} , las fluctuaciones en este volumen son las que dominan y la correlación presenta nuevamente un único tiempo de correlación que, en este caso, corresponde al tiempo de residencia media de las moléculas en V_{red} , Figura 4.4(e). Finalmente, cuando V_{red} tiene un tamaño comparable a V_{dif} el tiempo característico obtenido corresponde al tiempo de residencia por V_{dif} , Figura 4.4(f).

En la expresión obtenida para la función de correlación en dos volúmenes, ec. 4.2, se puede ver que el término independiente de α es proporcional a V_{dif} , mientras que el proporcional a α^2 es proporcional a V_{red} . Para los casos graficados en la Figura 4.4, la relación de tamaños varía entre $M = 2 \cdot 10^6$ ($V_{dif} \gg V_{red}$) y $M = 2$ ($V_{dif} \sim V_{red}$). La posibilidad de ver simultáneamente los dos tiempos de correlación depende únicamente de la relación entre M y α^2 (y no de la concentración de moléculas). Si M y α^2 son del mismo orden de magnitud, el contraste entre las amplitudes de las correlaciones en cada volumen de observación permiten ver los dos procesos simultáneamente. Si $M \gg \alpha^2$ el único tiempo que aparece es el que corresponde a la difusión a través de V_{dif} , mientras que si $M \ll \alpha^2$ el único tiempo que aparece es el que corresponde a la difusión a través de V_{red} . Cambiar la concentración, modifica la cantidad de moléculas en ambos volúmenes y, por lo tanto, no modifica el contraste de los procesos de difusión en cada volumen.

Capítulo 5

Intensificación de la fluorescencia en sistemas híbridos con propiedades plasmónicas

Los experimentos de FCS de campo cercano que se muestran en este trabajo utilizan NPs metálicas para confinar el campo electromagnético incidente y conseguir con esto un aumento significativo en la resolución espacial. Trabajos previos sugieren que las moléculas que contribuyen mayoritariamente a la señal de fluorescencia colectada, son aquellas a pocos nanómetros de la superficie de las NPs [Anger et al. 2006, Bharadwaj et al. 2007, Bharadwaj et al. 2007b]. A distancias tan pequeñas entre las moléculas y las NPs la interacción entre ambas empieza a ser importante. Por esta razón, en este capítulo se estudian las propiedades de emisión de sistemas híbridos formados por moléculas fluorescentes a distancias nanométricas de NPs metálicas. Se analiza el efecto que tienen sobre la emisión del sistema híbrido la separación NP-molécula; la eficiencia cuántica de fluorescencia de la molécula, la orientación, las propiedades de absorción y emisión de la molécula; y el tamaño y la geometría de las NPs.

5.1. Descripción general

La utilización de nanoestructuras metálicas está teniendo cada vez más impacto en áreas como la biología y la nanotecnología. Se usan como nanobiosensores [Riboh et al. 2004, Yonzon et al. 2004], como sondas para microscopía óptica de alta resolución [Kalkbrenner et al. 2001], como intensificadores para la detección de moléculas únicas [Kneipp et al. 1997], y como nanocalentadores locales [Urban et al. 2009, Urban et al. 2009b, Zharov et al. 2006, Pitsillides et al. 2003]. Las vastas aplicaciones de estas estructuras metálicas se deben principalmente al

fuerte confinamiento e intensificación del campo electromagnético incidente en la proximidad de la nanoestructura [Kreibig et al. 1995, Ghosh et al. 2009].

En 1960 el trabajo de Drexhage [Drexhage 1960], y los trabajos de Chance, algunos años después [Chance et al. 1974, Chance et al. 1975] mostraron por primera vez que una estructura metálica modifica la emisión de las moléculas fluorescentes cercanas a la estructura. Observaron que el tiempo de vida de las moléculas podía aumentar o disminuir en función de la distancia entre la molécula y la nanoestructura. A partir de estos descubrimientos muchos grupos se han concentrado en su síntesis y caracterización [Brust et al. 1995, Liz-Marzán et al. 1996, Srisombat et al. 2008]. Un caso particular de estas nanoestructuras son las nanopartículas metálicas, NPs. Las NPs modifican la emisión de moléculas fluorescentes a través de dos mecanismos: por un aumento en la velocidad de excitación, y/o por modificación de la eficiencia cuántica de fluorescencia de la molécula, ϕ^0 . Estos dos mecanismos se pueden controlar a partir del tamaño [Stranik et al. 2007, Kelly et al. 2003, Link et al. 1999] la forma [Kelly et al. 2003, Tam et al. 2007, Agio et al. 2007] y el material de la NP; ϕ^0 [Lakowicz et al. 2002, Lakowicz et al. 2002], la orientación y las propiedades de absorción y emisión de la molécula [Bharadwaj et al. 2007b, Thomas et al. 2004]; la distancia NP-molécula [Anger et al. 2006, Bharadwaj et al. 2007, Bharadwaj et al. 2007b, Agio et al. 2007, Cheng et al. 2007, Schneider et al. 2006]; y la constante dieléctrica del medio circundante [Kelly et al. 2003].

Estos descubrimientos motivaron que en los últimos años, se invirtiera mucho esfuerzo en el diseño y la caracterización de sistemas híbridos formados por moléculas fluorescentes acopladas a NPs metálicas [Lakowicz et al. 2002, Lakowicz et al. 2002, Stranik et al. 2007, Tam et al. 2007, Thomas et al. 2000]. Se mostró teórica y experimentalmente que, como consecuencia de la disipación de energía por parte de la estructura metálica, a distancias pequeñas entre la molécula y la NP la fluorescencia se inhibe completamente [Anger et al. 2006, Estrada et al. 2009]. Sin embargo, controlando la separación NP-molécula, la fluorescencia se intensifica [Lakowicz et al. 2002, Schneider et al. 2006, Kuhn et al. 2006, Cheng et al. 2007, Estrada et al. 2009]. En trabajos previos de Lakowicz y colaboradores [Lakowicz et al. 2002, Lakowicz et al. 2002], se estudió el efecto de objetos nanométricos desordenados de plata, a los que llamaron *Silver Island Films*, SIFs, sobre las propiedades ópticas de moléculas fluorescentes. En esos trabajos se midieron los espectros de emisión para moléculas con diferentes eficiencias cuánticas de fluorescencia en presencia y en ausencia de SIFs. Los resultados obtenidos sugieren una intensificación relativa más alta para las moléculas menos eficientes. Sin embargo, tanto los trabajos experimentales como teóricos reportados en la literatura describen mayormente el estudio cualitativo de la dependencia de la intensificación de la fluorescencia.

Nuestro propósito en este capítulo es obtener información cuantitativa que permita el diseño de un sistema híbrido NP-molécula con características específicas. Por ejemplo, ¿A qué distancia de la NP se debe ubicar una molécula para obtener una intensificación máxima de la fluorescencia?, ¿A qué distancia de la NP se

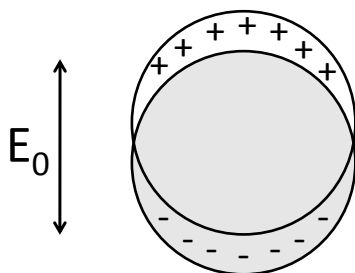


Figura 5.1: Esquema simplificado de la polarización inducida en una esfera metálica como consecuencia de la interacción con un campo eléctrico aplicado.

debe ubicar una molécula para maximizar la cantidad de fotones emitidos por la molécula antes de fotoblanquearse?, ¿En este caso, cuál es la intensificación esperada?, ¿Cuál es el ϕ^0 óptimo que mejora el contraste entre la región intensificada y la no intensificada?, ¿Cuál es el tamaño de NP óptimo para experimentos de FCS que dan un volumen intensificado pequeño, y simultáneamente una señal aceptable?. Con este objetivo, en las próximas secciones se analizan la dependencia de la intensificación de la fluorescencia o *ganancia en el brillo*, GB, y la *ganancia en el número de fotones*, GP, con la distancia NP-molécula, ϕ^0 , y las longitudes de onda en el máximo de absorción y emisión de moléculas fluorescentes acopladas a NPs de oro.

5.2. Propiedades plasmónicas de NPs metálicas

Cuando se irradia una NP metálica, el campo eléctrico incidente produce una excitación colectiva de los electrones de conducción que oscilan coherentemente con el campo, Figura 5.1. Estos modos de oscilación se llaman plasmones de Mie, en honor a Gustav Mie quien en 1908 resolvió las ecuaciones de Maxwell para el problema de una partícula esférica de tamaño arbitrario en presencia de un campo incidente monocromático [Mie 1908, Kreibig et al. 1995]. Para partículas de forma arbitraria la resolución de las ecuaciones de Maxwell es muy compleja [Mishchenko et al. 2000]. Salvo para partículas esféricas y elipsoides de revolución [Asano et al. 1975] no se han obtenido soluciones analíticas de las ecuaciones de Maxwell. La frecuencia característica de oscilación de los electrones en el metal depende del material, de la forma y del tamaño de la NP [Kelly et al. 2003]. La Figura 5.2 muestra cómo se genera una polarización de los electrones de conducción en la dirección de polarización del haz incidente, si la frecuencia de la radiación incidente coincide con alguna frecuencia de resonancia de la NP. Estas oscilaciones de los electrones dan lugar a un campo inducido fuertemente intensificado y confinado cerca de la superficie metálica. Como consecuencia de esto, el campo local en las vecindades de la estructura tiene una contribución adicional que lo hace varios órdenes de magnitud mayor que el campo incidente.

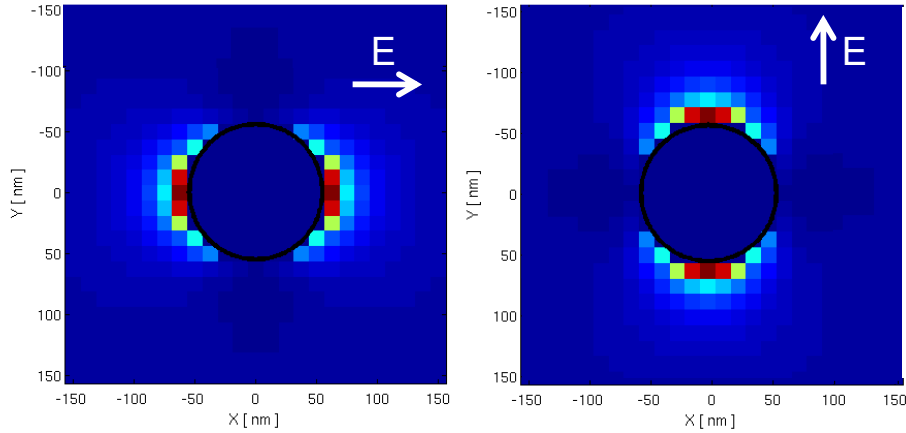


Figura 5.2: Cálculos de la intensificación del campo en las inmediaciones de una NP esférica de 90 nm de diámetro excitada con una onda monocromática de 540 nm. Figura tomada de [Masip 2006]

Las propiedades ópticas de las NPs metálicas están caracterizadas por la función dieléctrica compleja, $\epsilon(\omega, \zeta)$, que se obtiene de resolver las ecuaciones de Maxwell y que se puede escribir como:

$$\epsilon(\omega, \zeta) = \epsilon_{real}(\omega, \zeta) + i \epsilon_{im}(\omega, \zeta) \quad (5.1)$$

donde ζ es un parámetro que tiene en cuenta la dependencia con el tamaño de la estructura. En trabajos recientes se mostró que para partículas esféricas de radio, a , por debajo de ~ 5 nm los efectos de tamaño son importantes, [Scaffardi et al. 2005, Scaffardi et al. 2006]. Sin embargo, para partículas más grandes, la función dieléctrica compleja se aproxima a la constante dieléctrica del material en volumen $\epsilon(\omega)$.

La teoría de Mie [Mie 1908] está basada en la expansión en modos esféricos. La importancia relativa de los multipolos de orden superior crece con el tamaño de la partícula. Sin embargo, el modo dipolar es el que domina aún cuando el tamaño de la partícula sea grande y otros multipolos se hayan excitado. En la Figura 5.3 se muestra, en azul, la sección eficaz de extinción calculada con la expansión de modos completa de la teoría de Mie y, en rojo, la calculada usando unicamente el término dipolar. De la Figura 5.3 se ve que la aproximación dipolar es válida para NPs de tamaño mucho menor que la longitud de onda incidente (régimen cuasi-estacionario). Para NPs de más de 40 nm de radio es necesario incluir en la expansión de modos multipolos de orden superior. Por estas razones, para poder utilizar la aproximación dipolar de la teoría de Mie y la constante dieléctrica del material en volumen en vez de la función dieléctrica compleja $\epsilon(\omega) \sim \epsilon(\omega, \zeta)$, en este trabajo se utilizan NPs entre 10 y 40 nm de radio.

Para NPs pequeñas comparadas con la longitud de onda incidente, el campo eléctrico aplicado se puede considerar constante, y la interacción está gobernada

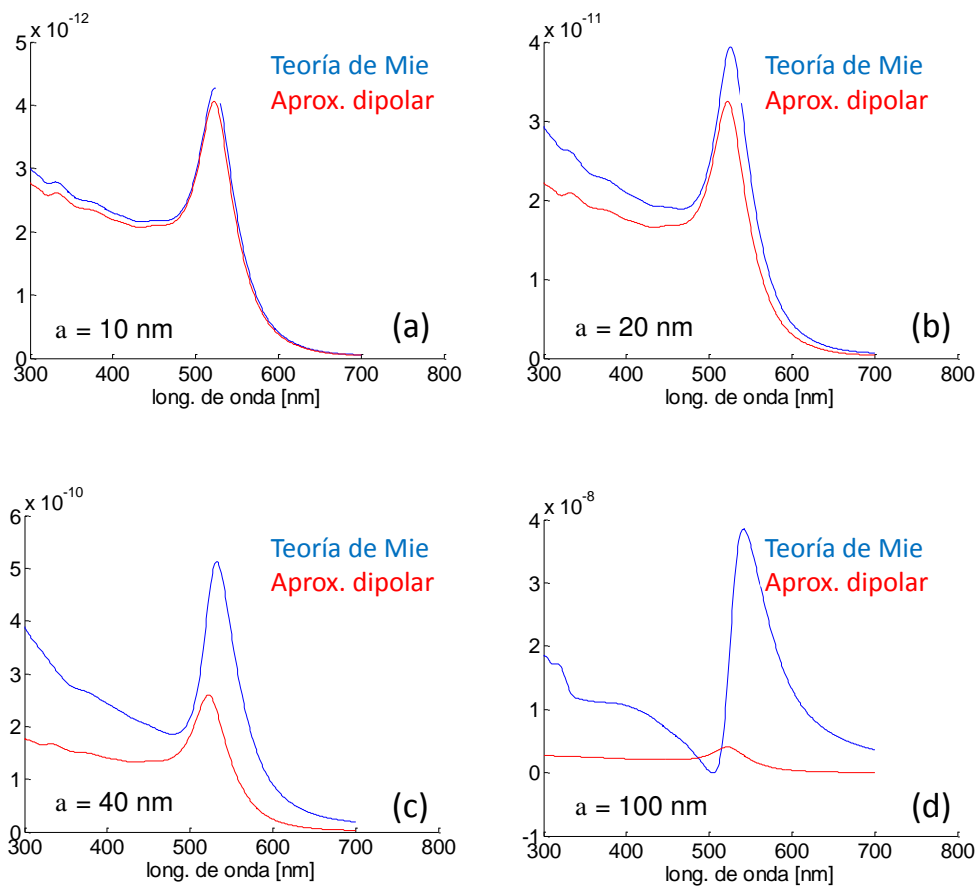


Figura 5.3: Sección eficaz de extinción calculada para NPs esféricas de oro. Para NPs de hasta 40 nm de radio la aproximación dipolar describe razonablemente bien las propiedades de extinción. Para NPs más grandes es necesario incluir multipolos de orden superior en la expansión de modos.

por las ecuaciones de la electrostática. Para obtener el campo alrededor de la partícula se debe resolver la ecuación de Laplace $\nabla^2\varphi = 0$, donde φ es el potencial eléctrico y la relación entre el campo y el potencial está dada por $\mathbf{E} = -\nabla\varphi$. En el caso de un campo incidente en la dirección x , aplicando condiciones apropiadas de borde las ecuaciones quedan:

$$\varphi = \begin{cases} A r \sin\theta \cos\phi & r < a \\ \left(-E_0 r + \frac{B}{r^2}\right) \sin\theta \cos\phi & r > a \end{cases} \quad (5.2)$$

donde a es el radio de la partícula y A y B son constantes a determinar. Aplicando condiciones de borde el campo eléctrico afuera de la esfera, E_{afuera} , queda

$$E_{afuera} = E_0\hat{x} - \alpha E_0 \left[\frac{\hat{x}}{r^3} - \frac{3x}{r^5}(x\hat{x} + y\hat{y} + z\hat{z}) \right] \quad (5.3)$$

donde α es la polarizabilidad de la esfera y \hat{x} , \hat{y} , \hat{z} son los versores cartesianos que denotan posición. El primer término de la ec. 5.3 es el campo eléctrico incidente mientras que el segundo término es el campo eléctrico que aparece como consecuencia de la polarización de los electrones de conducción. Para una esfera de constante dieléctrica $\varepsilon(\omega)$, la solución a la ecuación de Laplace da:

$$\alpha(\omega) = a^3 \frac{\varepsilon(\omega) - \varepsilon_m}{\varepsilon(\omega) + 2\varepsilon_m} \quad (5.4)$$

que coincide con el primer término de la expansión multipolar de Mie [Born et al. 1975] y que corresponde a la conocida fórmula de la electrostática para la polarizabilidad de la esfera sumergida en un medio de constante dieléctrica ε_m , [Lifshitz et al. 1984]. La expresión 5.4 muestra que la polarizabilidad entra en resonancia cuando $\varepsilon(\omega) = -2\varepsilon_m$.

Para metales, y en particular para oro y plata, la parte real de la constante dieléctrica toma valores negativos para frecuencias en el visible. Esto hace que la polarizabilidad tenga un denominador resonante, que no se hace cero porque la constante dieléctrica tiene una parte imaginaria. Esto se puede ver en los gráficos para oro y plata de la Figura 5.4, reproducidos de la referencia [Johnson et al. 1972].

Como se mencionó anteriormente, otra geometría que tiene solución analítica y es de fabricación relativamente sencilla son los elipsoides de revolución [Perez Juste et al. 2005, Murphy et al. 2005, Wang et al. 2006]. Los elipsoides de revolución tienen tres resonancias plasmónicas que corresponden a la oscilación de los electrones a lo largo de los tres ejes de la NP. Se pueden sintonizar de manera más o menos controlada las frecuencias de resonancia cambiando la longitud de los ejes del elipsoide. La posibilidad que ofrecen los elipsoides de poder sintonizar las resonancias generó una gran variedad de nuevos métodos de síntesis para fabricar partículas elongadas [Al-Sayed et al. 2007, Brioude et al. 2005, Gou et al. 2005, Jiang et al. 2006, Lee et al. 2005, Murphy et al. 2002, Perez Juste et al. 2004]. En

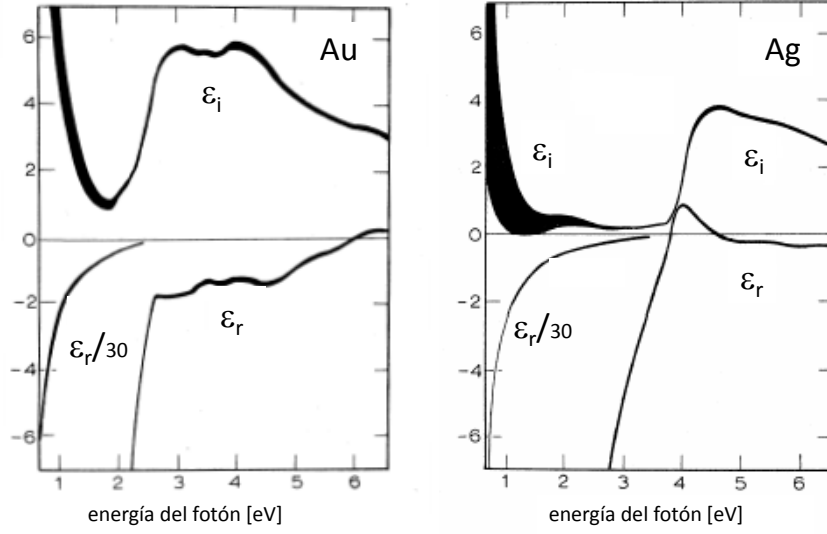


Figura 5.4: Constante dieléctrica para el oro y la plata en función de la energía del fotón. El ancho de las curvas es representativo del error instrumental. Datos extraídos de [Johnson et al. 1972].

el régimen cuasi-estacionario, el problema del elipsoide de semiejes r_x , r_y , r_z , está resuelto en los libros de texto, y la polarizabilidad en el semieje i está dada por:

$$\alpha_i(\omega) = r_x r_y r_z \frac{\varepsilon(\omega) - \varepsilon_m}{\varepsilon_m + [\varepsilon(\omega) - \varepsilon_m] l_i} \quad (5.5)$$

donde el parámetro importante es el factor de depolarización, l_i , que es un factor geométrico, que no depende del material y que vale $1/3$ en todos los ejes para el caso de una esfera. Consideremos por simplicidad elipsoides de revolución generados a partir de la rotación de una elipse alrededor del eje mayor (esferoides prolato) o menor (esferoides oblatos). Como los esferoides tienen un eje de simetría, solo tienen dos modos de oscilación (el tercero está degenerado). En el caso de un esferoide prolato $r_z > r_x = r_y$ el factor l_i está dado por [Lifshitz et al. 1984]:

$$l_x = \frac{1 - e^2}{2e^3} \ln \left(\frac{1 + e}{1 - e} - 2e \right) \quad (5.6)$$

$$l_y = l_z = \frac{1 - l_x}{2} \quad (5.7)$$

Mientras que para un esferoide oblatos $r_z = r_x > r_y$ está dado por [Lifshitz et al. 1984]:

$$l_z = \frac{1 + e^2}{e^3} (e - \tan^{-1} e) \quad (5.8)$$

$$l_x = l_y = \frac{1 - l_z}{2} \quad (5.9)$$

en ambos casos, el factor de depolarización solo depende de la excentricidad, e tomada como $e = \sqrt{1 - r_x^2/r_z^2}$ para los esferoides prolatos y $e = \sqrt{r_z^2/r_y^2 - 1}$ para los esferoides oblatos.

Es sabido que las intensificaciones que se obtienen usando esferoides es mayor que las que se obtienen a partir de partículas esféricas [Novotny et al. 2007]. Sin embargo, como consecuencia de la simetría, la utilización de esferoides tiene una complicación adicional. Las frecuencias de resonancia de los esferoides dependen de la orientación del campo eléctrico incidente con respecto a la partícula. Es decir los esferoides se deben orientar (o al menos conocer su orientación) para determinar las frecuencias de resonancia. En este sentido, las partículas esféricas tienen la ventaja de ser isótropas. Además se consiguen comercialmente en distintos tamaños y con diferentes propiedades de funcionalización [Ted Pella Inc.]. Por estas razones, en este trabajo se utilizan NPs esféricas.

5.3. Cálculos de intensificación de la fluorescencia

5.3.1. Descripción general

Existen diversos mecanismos por los cuales las moléculas excitadas retornan a su estado fundamental. Algunos de ellos, los no-radiativos, no involucran la emisión de luz. Dentro de estos mecanismos se encuentran la conversión interna, el cruce intersistemas, las relajaciones vibracionales y el intercambio de energía con otras moléculas [Valeur 2001]. En algunas moléculas, existe una probabilidad de retornar al estado fundamental por la emisión de un fotón, desexcitación radiativa. La energía del fotón emitido corresponde a la diferencia entre el estado vibracional más bajo de S_1 y alguno de los estados vibracionales de S_0 . Este mecanismo se llama emisión de fluorescencia. A los efectos de las microscopías basadas en la fluorescencia, es conveniente generar condiciones que favorezcan la desexcitación radiativa de la molécula. Una manera de cuantificar las desexcitaciones radiativas con respecto a las no radiativas es usando la eficiencia cuántica de fluorescencia, que se escribe como:

$$\phi^0 = \frac{\gamma_{rad}^0}{\gamma_{rad}^0 + \gamma_{nr}^0 + \gamma_{fb}^0} \quad (5.10)$$

donde el superíndice “0” indica en ausencia de NPs, γ_{rad}^0 y γ_{nr}^0 son las constantes de velocidad de los procesos de desexcitación radiativos y no radiativos intrínsecos de la molécula y γ_{fb}^0 es la constante de velocidad del proceso de fotoblanqueo de la molécula.

Habitualmente, la mayoría de los experimentos de fluorescencia se realizan en entornos en donde las distancias características son mucho mayores que los tamaños típicos de un cromóforo (0.5 - 3 nm). En estos casos se puede considerar que las moléculas están aisladas y la ec. 5.10 es la que describe la probabilidad de emisión. La situación cambia cuando la molécula está cerca de una NP metálica. La oscilación de los electrones en el metal que se describió en la sección 5.2, intensifica el

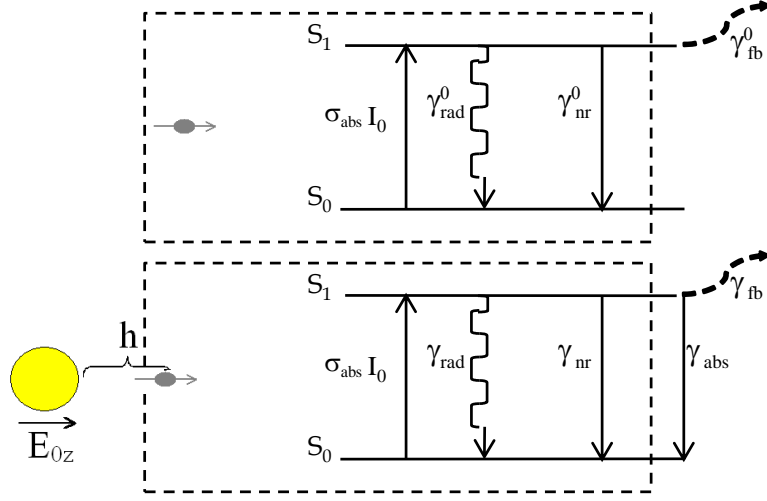


Figura 5.5: Esquema de los caminos posibles de desexcitación para una molécula excitada en ausencia (arriba), y en presencia (abajo) de una NP metálica.

campo electromagnético en regiones de dimensiones comparables con el tamaño de la NP lo cual produce un incremento de la velocidad de excitación de las moléculas próximas a la NP. Además, en las inmediaciones de la NP se introduce un canal de desexcitación no radiativo adicional, γ_{abs} , como consecuencia de la disipación a través de la NP. Este hecho modifica la eficiencia cuántica de fluorescencia de la molécula que, en presencia de una NP se escribe como:

$$\phi = \frac{\gamma_{rad}}{\gamma_{rad} + \gamma_{nr} + \gamma_{fb} + \gamma_{abs}} \quad (5.11)$$

que usando la definición de ϕ^0 dada en la ec. 5.10 se puede reescribir como:

$$\phi = \frac{\gamma_{rad}/\gamma_{rad}^0}{\gamma_{rad}/\gamma_{rad}^0 + \gamma_{abs}/\gamma_{rad}^0 + \frac{1-\phi^0}{\phi^0}} \quad (5.12)$$

donde ahora todas las magnitudes sin superíndice "0" indican en presencia de una NP y donde se supone que la NP no modifica los canales de decaimientos no radiativos intrínsecos de la molécula ni los procesos de fotoblanqueo, es decir $\gamma_{nr} = \gamma_{nr}^0$ y $\gamma_{fb} = \gamma_{fb}^0$. En la Figura 5.5 se muestran esquemáticamente los mecanismos de desexcitación de una molécula en ausencia y en presencia de una NP metálica.

La expresión dada en la ec. 5.12 permite analizar dos casos límite:

(i) Molécula muy fluorescente; $\phi^0 \rightarrow 1$

En este caso la expresión 5.12 se reduce a $\phi = \gamma_{rad}/(\gamma_{rad} + \gamma_{abs})$, es decir el único canal de desexcitación no radiativo es la interacción con la NP. Con esto,

la probabilidad de emisión de la molécula disminuye a medida que la interacción con la NP crece.

(ii) Molécula muy lejos de la superficie de la NP; $\mathbf{r} \gg a$

En este caso $\gamma_{abs} \sim 0$ y $\gamma_{rad} \sim \gamma_{rad}^0$ lo que reduce la expresión 5.12 a $\phi \rightarrow \phi^0$, es decir la eficiencia cuántica de fluorescencia de una molécula muy alejada de una NP, tiende al valor de la eficiencia cuántica en ausencia de NP.

5.3.2. Ganancia en el brillo de las moléculas: dependencia con la distancia NP-molécula

La velocidad de emisión de una molécula fluorescente, γ_{em} , depende de la velocidad de excitación, γ_{exc} , y de la probabilidad de emisión de la molécula:

$$\gamma_{em} = \gamma_{exc} \phi \quad (5.13)$$

De este modo, la ganancia en el brillo, GB, relativa a la molécula aislada; se puede expresar como el producto de la ganancia en la excitación, $\gamma_{exc}/\gamma_{exc}^0$, y la ganancia en la eficiencia cuántica de fluorescencia, ϕ/ϕ^0 ,

$$GB = \frac{\gamma_{em}}{\gamma_{em}^0} = \frac{\gamma_{exc}}{\gamma_{exc}^0} \frac{\phi}{\phi^0} \quad (5.14)$$

donde GB es función de las frecuencias de excitación y de emisión, ω_{exc} , ω_{em} . En el caso más general la ganancia en la excitación depende de ω_{exc} mientras que la eficiencia cuántica de fluorescencia depende de la frecuencia en el máximo de emisión de la molécula ω_{em} . Sin embargo, para moléculas con un corrimiento de Stokes pequeño se puede considerar $\omega_{exc} \sim \omega_{em}$ [Valeur 2001], simplificando el cálculo de GB.

De la expresión 5.14 es fácil ver que se puede obtener una ganancia en el brillo ya sea aumentando $\gamma_{exc}/\gamma_{exc}^0$, como aumentando ϕ/ϕ^0 . Muchos trabajos en la literatura demuestran que la fluorescencia de una molécula adsorbida sobre la superficie de una NP se inhibe completamente, mecanismo que se conoce como *quenching de la fluorescencia*, mientras que a algunos nanómetros de la NP la fluorescencia se intensifica apreciablemente [Estrada et al. 2009, Aslan et al. 2005, Tam et al. 2007, Stranik et al. 2007]. Este comportamiento contradictorio aparece como consecuencia de la competencia entre la intensificación del campo local (que aumenta la emisión fluorescente) y la transferencia de energía a la NP (que disminuye la emisión fluorescente). Estos mecanismos se han estudiado recientemente por el grupo de Lukas Novotny en la Universidad de Rochester [Anger et al. 2006, Bharadwaj et al. 2007]. P. Bharadwaj derivó expresiones analíticas para la emisión de una molécula fluorescente en función de la distancia a la superficie de una partícula metálica, y demostró que estas expresiones coinciden con resultados más rigurosos basados en cálculos de MMP, *Multiple MultiPole*

Method. La contribución de estos trabajos fue de gran importancia en el área, porque permitió entender las diferencias que hasta el momento parecían presentarse entre trabajos que informaban intensificación y trabajos que informaban inhibición de la fluorescencia, como consecuencia de la interacción con la NP.

En este capítulo, se utilizan las expresiones del modelo analítico presentado en [Bharadwaj et al. 2007] para estudiar y optimizar la emisión de moléculas fluorescentes en las cercanías de una NP metálica. A su vez, este estudio permitió avanzar en el diseño racional de nuevas sondas fluorescentes que combinan las ventajas de las sondas preexistentes (pequeñez y biocompatibilidad) con las posibilidades que agrega la interacción con la NP (ganancia en el brillo y en el número total de fotones emitidos por la molécula).

Cuando una molécula está a pocos nanómetros de una NP, el campo incidente que actúa sobre el momento dipolar de la molécula, $\boldsymbol{\mu}$, es $\mathbf{E}_0(\mathbf{r}_0, \omega_{exc}) + \mathbf{E}_{ind}(\mathbf{r}_0, \omega_{exc})$ donde \mathbf{r}_0 es la posición de la molécula, \mathbf{E}_0 es el campo incidente y \mathbf{E}_{ind} , el campo inducido. Para una molécula con su momento dipolar alineado en la dirección de polarización del campo, la ganancia en la excitación se puede expresar como [Bharadwaj et al. 2007]:

$$\frac{\gamma_{exc}}{\gamma_{exc}^0} = \left| 1 + 2 \frac{1}{\left(1 + \frac{h}{a}\right)^3} \frac{\varepsilon(\omega_{exc}) - \varepsilon_m}{\varepsilon(\omega_{exc}) + 2\varepsilon_m} \right|^2 \quad (5.15)$$

donde h es la separación NP-molécula medida desde la superficie de la NP; $\varepsilon(\omega_{exc})$, la constante dieléctrica de la partícula a ω_{exc} ; y ε_m , la constante dieléctrica del medio circundante.

El término de interacción entre la molécula y la NP, que referido a la emisión fluorescente constituye un término de pérdidas, L , domina a distancias pequeñas entre la molécula y la NP, ec. 5.16. En ese caso la superficie de la NP se puede considerar como una interfase plana y, usando teoría de imágenes, la tasa de transferencia de energía a la NP queda [Bharadwaj et al. 2007]:

$$L = \frac{\gamma_{abs}}{\gamma_{rad}^0} = \frac{3}{16} \text{Im} \left(\frac{\varepsilon(\omega_{em}) - \varepsilon_m}{\varepsilon(\omega_{em}) + \varepsilon_m} \right) \frac{1}{k_{em}^3 h^3} \frac{\mu_x^2 + \mu_y^2 + 2\mu_z^2}{|\boldsymbol{\mu}|^2} \quad (5.16)$$

donde la coordenada z se define como la dirección donde el campo incidente está polarizado, $\varepsilon(\omega_{em})$ es la constante dieléctrica de la partícula en el máximo de emisión de la molécula y k_{em} es el vector de onda en el medio.

Finalmente, la derivación de la tasa de decaimiento radiativo considera el hecho de que, en presencia de la NP, el momento dipolar de la molécula cambia de $\boldsymbol{\mu}$ a $\boldsymbol{\mu} + \boldsymbol{\mu}_{inducido}$. Entonces para una molécula con su momento dipolar alineado en la dirección de polarización del campo incidente [Bharadwaj et al. 2007]:

$$\frac{\gamma_{rad}}{\gamma_{rad}^0} = \left| 1 + 2 \frac{1}{\left(1 + \frac{h}{a}\right)^3} \frac{\varepsilon(\omega_{em}) - \varepsilon_m}{\varepsilon(\omega_{em}) + 2\varepsilon_m} \right|^2 \quad (5.17)$$

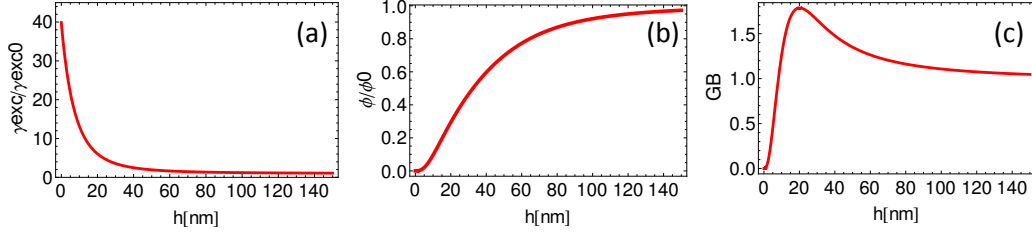


Figura 5.6: Ganancia en el brillo para una molécula cerca de una NP de oro de 40 nm de radio excitada a 540 nm. (a): ganancia en la excitación, y (b): ganancia en la eficiencia cuántica de fluorescencia, en función de la distancia entre la molécula y la superficie de la NP, h . (c): GB calculada como el producto de las Figuras en (a) y (b). Se consideró una molécula alineada en la dirección de polarización del campo incidente.

Mientras que si la molécula está orientada con su momento dipolar alineado en la dirección de propagación del campo incidente, la tasa de decaimiento radiativo queda:

$$\frac{\gamma_{rad}}{\gamma_{rad}^0} = \left| 1 - \frac{1}{\left(1 + \frac{h}{a}\right)^3} \frac{\varepsilon(\omega_{em}) - \varepsilon_m}{\varepsilon(\omega_{em}) + 2\varepsilon_m} \right|^2 \quad (5.18)$$

La Figura 5.6 muestra las contribuciones a GB de la ganancia en la excitación, Figura 5.6(a), y de la ganancia en la eficiencia cuántica de fluorescencia, Figura 5.6(b), para una molécula con su momento dipolar alineado en la dirección de polarización del campo incidente y $\phi^0 = 1$ en función de la distancia a la superficie de una NP de oro de 40 nm de radio, irradiada a 540 nm.

Es importante notar que la ganancia en la excitación, ec. 5.15, es máxima para $h = 0$, es decir la molécula adsorbida sobre la superficie de la NP. Sin embargo las pérdidas en el sistema NP-molécula, ec. 5.16, tienden a infinito para $h = 0$ inhibiendo completamente la ganancia en la eficiencia cuántica de fluorescencia y, por lo tanto, inhibiendo completamente la emisión de la fluorescencia. Como resultado de la competencia entre estos dos efectos, se puede observar la inhibición o la intensificación de la fluorescencia simplemente cambiando la distancia NP-molécula.

Las expresiones dadas en la ec. 5.15 y ec. 5.17 son idénticas. Esta propiedad ha sido descrita anteriormente [Carminati et al. 1998] y no es una característica general sino que depende de la orientación de la molécula. Para otra orientación del momento dipolar de la molécula, las dos expresiones son diferentes como se muestra en la ec. 5.18. En la Figura 5.6 se supuso una orientación de la molécula en particular. Sin embargo, experimentalmente es muy complicado construir sistemas híbridos donde la orientación de la molécula se pueda controlar perfectamente. Por esa razón, en la Figura 5.7 se compara GB para dos orientaciones diferentes con respecto al campo incidente. En línea punteada se muestra el caso para el cual la molécula está orientada en la dirección de polarización del campo incidente, y en línea continua, el caso de una molécula orientada en la dirección de propagación del haz. Para una orientación arbitraria de la molécula se espera un

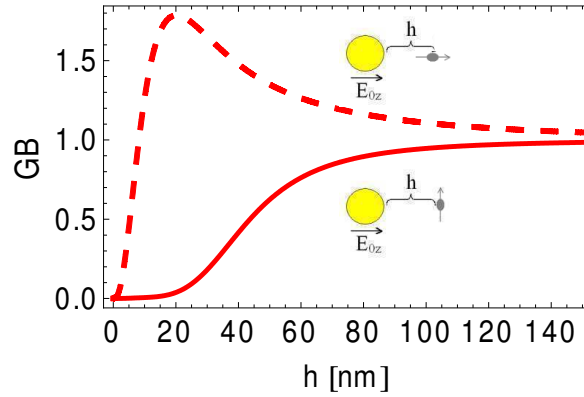


Figura 5.7: GB para una molécula cerca de una NP de oro de 40 nm de radio excitada a 540 nm. En línea punteada se muestra el caso $\mu//E_0$ y en línea continua $\mu//k$.

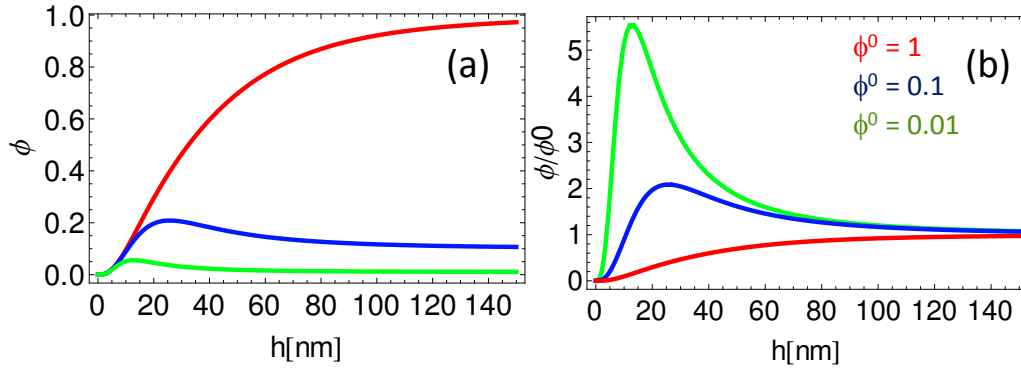


Figura 5.8: Eficiencia cuántica de fluorescencia de la molécula en las cercanías de una NP, en función de la distancia de separación.

comportamiento acotado por las curvas presentadas en la Figura 5.7. En todos los casos analizados en este capítulo, salvo que se indique lo contrario, se supone a la **molécula alineada en la dirección de polarización del campo incidente**.

5.3.3. Dependencia de GB con ϕ^0

Como se mencionó anteriormente, GB depende de la ganancia en la excitación de la molécula así como de la ganancia en la eficiencia cuántica, ec. 5.14. Una vez fijada la forma, el material y el tamaño de la NP, la ganancia en la excitación queda determinada. En ese caso, GB se puede optimizar eligiendo la molécula con las propiedades adecuadas, es decir la molécula que maximice el término ϕ/ϕ^0 . En la Figura 5.8 se muestra la dependencia de la eficiencia cuántica de fluorescencia del sistema NP-molécula para tres valores de ϕ^0 diferentes.

Para una molécula muy fluorescente, $\phi^0 = 1$, la aparición de un canal de

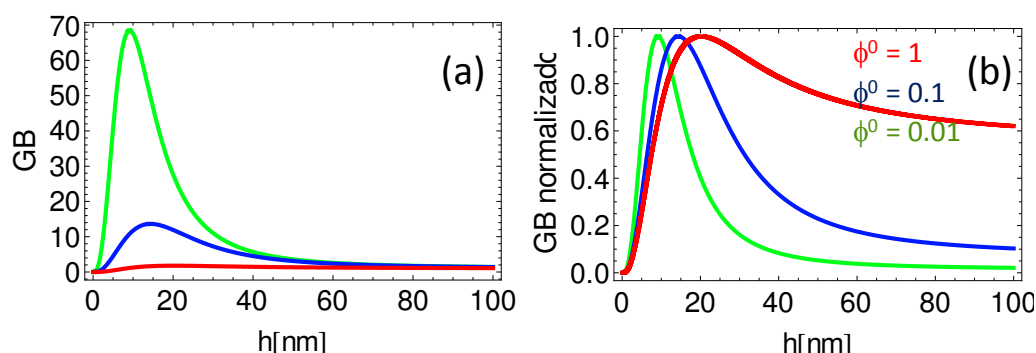


Figura 5.9: GB para moléculas con diferentes eficiencias cuánticas de fluorescencia en función de la distancia h . (a): El valor máximo para la ganancia en el brillo aumenta dramáticamente para moléculas débilmente fluorescentes. (b): GB normalizado. Para moléculas débilmente fluorescentes el máximo de intensificación se obtiene más cerca de la superficie de la NP y la zona intensificada está más restringida.

desexcitación no radiativo, produce una disminución de la eficiencia cuántica de fluorescencia que es más grande a medida que la transferencia de energía de la molécula a la NP se hace más eficiente, Figura 5.8 (a) curva roja. Sin embargo, para moléculas menos fluorescentes, $\phi^0 = 0.1$ en azul, y $\phi^0 = 0.01$ en verde, la aparición de un canal de desexcitación no radiativo adicional y que compite con los canales de fotoblanqueo, genera una ganancia en la eficiencia de fluorescencia que es relativamente más grande a medida que ϕ^0 disminuye, Figura 5.8 (b). Este incremento en el término ϕ/ϕ^0 es el responsable de la mayor ganancia en el brillo que tienen las moléculas débilmente fluorescentes con respecto a las altamente fluorescentes, Figura 5.9 (a).

La Figura 5.9 muestra GB, ec. 5.14 en función de la distancia h y de la eficiencia cuántica de fluorescencia de la molécula aislada, ϕ^0 , calculada para una partícula esférica de oro de 40 nm de radio sumergida en agua y excitada a 540 nm. Las constantes dieléctricas para el oro se extrajeron de [Johnson et al. 1972]. Para distancias de separación pequeñas, se obtiene el efecto de inhibición de la fluorescencia observado en trabajos previos. Para distancias mayores, hay una región intensificada cuyo máximo y extensión dependen fuertemente del valor de ϕ^0 . Para $\phi^0 = 1$ (línea roja), la señal aumenta con la distancia hasta una distancia de 20 nm aproximadamente donde la señal comienza a disminuir. Para $\phi^0 = 0.01$ (línea verde), la ganancia alcanza su valor máximo a 9 nm de la superficie de la NP y éste es 40 veces mayor que en el caso de $\phi^0 = 1$. Estos resultados permiten predecir cuál es la distancia que maximiza GB a partir del ϕ^0 de la molécula. En un trabajo reciente, [Cheng et al. 2007], los autores muestran la fluorescencia de moléculas de fluoresceína adheridas a NPs esféricas de Ag recubiertas con una capa de silicio de espesor controlado. Para maximizar la fluorescencia los autores describen un proceso de recubrimiento de las NPs y posterior análisis de la fluo-

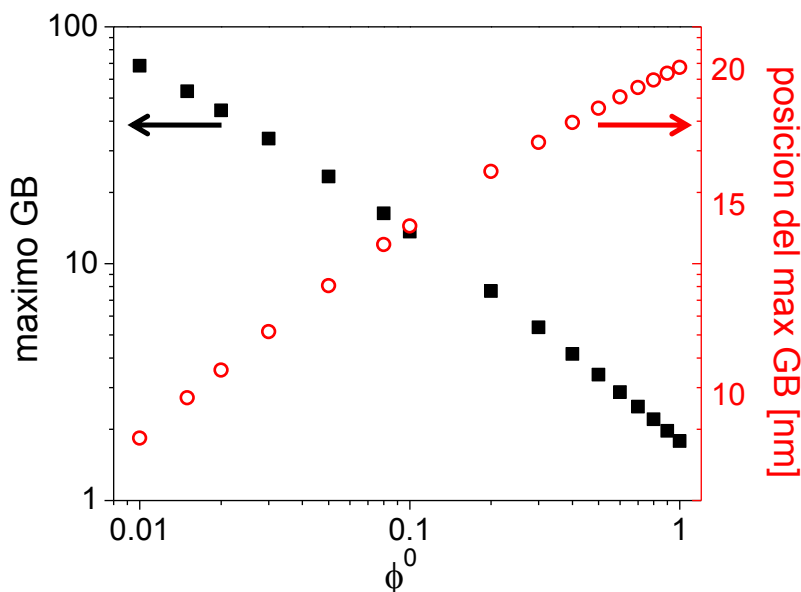


Figura 5.10: Valor máximo para la ganancia en el brillo (cuadrados llenos) y su posición desde la superficie de la NP (círculos vacíos) en función de la eficiencia cuántica de fluorescencia de las moléculas aisladas, ϕ^0 , calculados para una NP esférica de oro de 40 nm de radio.

rescencia. Los resultados presentados en la Figura 5.9 son la vía para explicar el espesor del separador que optimiza la emisión de la molécula. La Figura 5.9(b) muestra que no solo el valor del máximo GB, sino también la posición y el tamaño de la región intensificada dependen del valor de ϕ^0 de la molécula. En la Figura 5.10 se muestra el valor máximo para GB y su posición a partir de la superficie de la NP en función de ϕ^0 . Puede verse en la Figura 5.10, que el valor del máximo GB es con buena aproximación, inversamente proporcional a ϕ^0 .

5.3.4. Dependencia de GB y GP con el radio de la NP

Otro parámetro importante de controlar, por ejemplo en experimentos de seguimiento de moléculas, es el número total de fotones que se puede extraer de una molécula antes de su destrucción fotoquímica (fotoblanqueo) [Enderlein 2002]. La presencia de la NP en las inmediaciones de la molécula fluorescente no solo permite intensificar la fluorescencia de la molécula (aumentar la cantidad de fotones emitidos por unidad de tiempo), sino también aumentar la cantidad de fotones totales emitidos antes de que la molécula se destruya y a esto último es a lo que llamaremos *ganancia en el número de fotones*, GP. La ganancia en el número de fotones emitidos por una sola molécula, se puede expresar como el cociente entre el número total de fotones emitidos en presencia, $n = \phi/\phi_{fb}$, y en la ausencia, $n^0 = \phi^0/\phi_{fb}^0$, de una NP antes de fotoblanquearse, donde,

$$\phi^0 = \frac{\gamma_{rad}^0}{\gamma_{rad}^0 + \gamma_{nr}^0 + \gamma_{fb}^0} \quad (5.19)$$

$$\phi = \frac{\gamma_{rad}}{\gamma_{rad} + \gamma_{abs} + \gamma_{nr} + \gamma_{fb}} \quad (5.20)$$

$$\phi_{fb}^0 = \frac{\gamma_{fb}^0}{\gamma_{rad}^0 + \gamma_{nr}^0 + \gamma_{fb}^0} \quad (5.21)$$

$$\phi_{fb} = \frac{\gamma_{fb}}{\gamma_{rad} + \gamma_{abs} + \gamma_{nr} + \gamma_{fb}} \quad (5.22)$$

Usando las expresiones 5.19 a 5.22 se puede mostrar que $n = \phi/\phi_{fb} = \gamma_{rad}/\gamma_{fb}$ y $n^0 = \phi^0/\phi_{fb}^0 = \gamma_{rad}^0/\gamma_{fb}^0$. Luego, suponiendo que la NP no modifica la velocidad de fotoblanqueo, es decir $\gamma_{fb} = \gamma_{fb}^0$, se obtiene:

$$GP = \frac{\gamma_{rad}}{\gamma_{rad}^0} \quad (5.23)$$

La Figura 5.11 muestra la dependencia de GP con la variable adimensional h/a para una molécula orientada en la dirección de polarización del campo incidente. A distancias NP-molécula menores que el radio de la NP, aparece una ganancia en la cantidad total de fotones emitidos por la molécula. Una molécula separada de una partícula de oro esférica una distancia $h = a/100$, emite en total 30 veces más fotones que los que emite la molécula aislada. Si bien para valores de $h \rightarrow 0$ el decaimiento no radiativo aumenta via una transferencia de energía a la NP, ec. 5.16, este mecanismo no destruye a la molécula con lo que no afecta el término GP. Luego, para valores de $h \rightarrow 0$, GP alcanza su valor máximo, que para una molécula orientada en la dirección de polarización del campo es:

$$GP \rightarrow \left| \frac{3\varepsilon(\omega_{em})}{\varepsilon(\omega_{em}) + 2\varepsilon_m} \right|^2 \quad (5.24)$$

mientras que para una molécula orientada en la dirección de propagación del haz es:

$$GP \rightarrow \left| \frac{3\varepsilon_m}{\varepsilon(\omega_{em}) + 2\varepsilon_m} \right|^2 \quad (5.25)$$

La Figura 5.12 muestra la variación del máximo GB (en cuadrados) y su posición con respecto a la superficie (en círculos), con el tamaño de la NP para dos valores de ϕ^0 . Se puede ver que variaciones en el tamaño de las NPs dentro del 10%, que es la dispersión típica de tamaños en una muestra comercial de partículas esféricas [Ted Pella Inc.], no involucran grandes variaciones en la posición del máximo. No ocurre lo mismo con el valor del máximo GB donde para moléculas de $\phi^0 = 0.01$, Figura 5.12(b) un cambio en el radio de las NPs de un factor 10

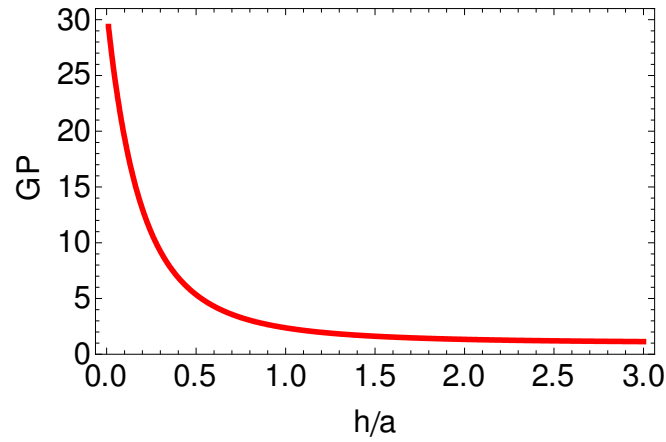


Figura 5.11: GP en función de la distancia a la superficie de la NP normalizada al valor del radio.

produce un cambio en el valor del máximo GB de un factor 100. Por último, vale notar que a medida que aumenta ϕ^0 , es necesario usar NPs más grandes para tener una ganancia en el brillo. Mientras que para moléculas de $\phi^0 = 0.01$ (Figura 5.12(b)) no hay intensificación de la emisión para NP de $a < 6$ nm, en el caso de moléculas con $\phi^0 = 0.1$ (Figura 5.12(a)) la intensificación de la emisión aparece para NP de $a > 13$ nm.

El caso de moléculas muy fluorescentes es un poco diferente. Ya se discutió en la sección 5.3.3 que estas moléculas son menos eficientes en términos de intensificación. En la Figura 5.13 se ve además que con estas moléculas es imposible obtener $GB > 1$ para NPs de radio $a < 35$ nm.

5.3.5. Dependencia de GB y GP con λ

En la Figura 5.14 se muestran los cálculos para la ganancia en brillo, GB, ec. 5.14 en azul; en negro las pérdidas en el sistema, L, debidas al camino no radiativo adicional introducido por la presencia de la NP, ec. 5.16; y en rojo la ganancia en el número de fotones, GP, ec. 5.23; para una molécula débilmente fluorescente, $\phi^0 = 0.01$, inmersa en agua a 1 y 10 nm de la superficie de la NP.

En la Figura 5.14(a) se puede observar que el valor máximo para GB y el valor máximo para GP están bien separados. Este es el caso en el que las pérdidas dominan ampliamente la desexcitación de la molécula. Para NPs esféricas, mientras que el máximo para GB (~ 2) está en 650 nm, el máximo para GP (~ 30) ocurre en 525 nm. Este resultado muestra que, dependiendo de la aplicación, se puede elegir la molécula cuya longitud de onda en el máximo de emisión optimice la característica deseable del sistema. No obstante, es importante notar que incluso para las moléculas que maximizan GB, se obtiene una ganancia de alrededor de 15 en GP. Es decir que debido a la presencia de la NP, la molécula va a emitir

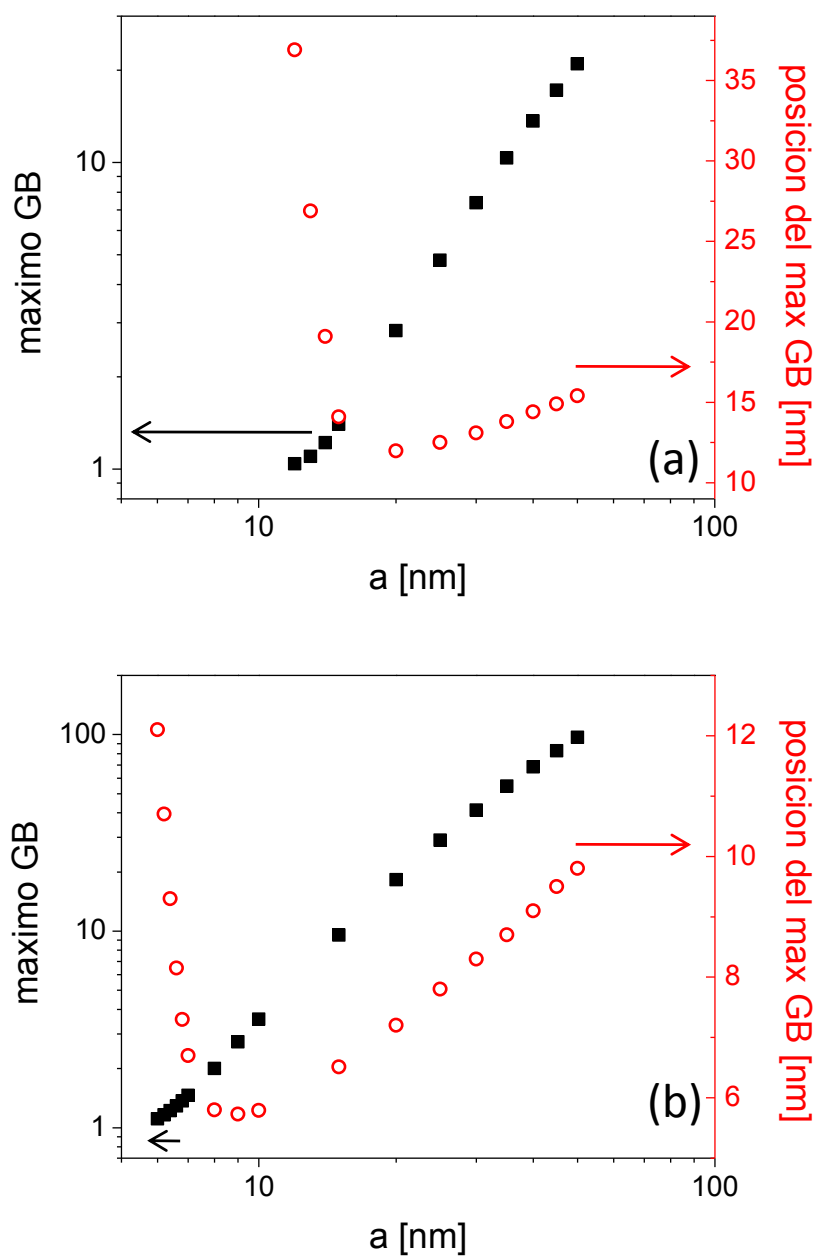


Figura 5.12: Valor máximo para la ganancia en el brillo (cuadrados) y su posición desde la superficie de la NP (círculos) en función del radio de la NP. (a): Para moléculas de $\phi^0 = 0.1$, (b): Para moléculas de $\phi^0 = 0.01$

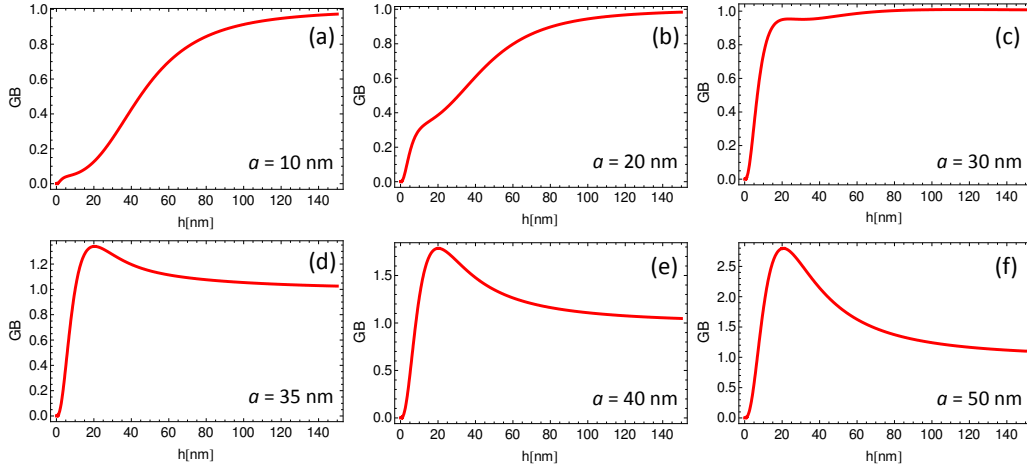


Figura 5.13: GB para una molécula de $\phi^0 = 1$ para distintos valores de radio de NP.

15 veces más fotones que en el caso de la molécula aislada. En la Figura 5.14(b) se muestra el caso donde la desexcitación de la molécula está más o menos balanceada entre procesos radiativos y procesos de transferencia de energía a la NP. En este caso, una molécula que emite con su máximo alrededor de 530 nm maximiza simultáneamente GB y GP. Se obtienen GB más altos (~ 80 en el máximo) y GP más pequeños (~ 12 en el máximo).

Como GP depende de la forma y del material de la NP (depende de la polarizabilidad y de la constante dieléctrica del material) mientras que el término de pérdidas depende únicamente del material, es posible separar el término radiativo del término disipativo cambiando la geometría de la NP y, como consecuencia de esto, aumentar GB aún más. Esto es lo que se estudia en la próxima sección.

5.3.6. Dependencia de GB con la geometría de la NP

La Figura 5.15 muestra el término radiativo y el de transferencia a la NP para dos partículas de diferente geometría. En el caso de una NP esférica, Figura 5.15(a), el término de pérdidas domina sobre el radiativo hasta una separación entre la molécula y la NP de 30 nm. En cambio para una NP elipsoidal, Figura 5.15(b), el término de pérdidas y el radiativo son comparables a una separación de 7 nm. En este caso, notar el cambio de escala, el término de pérdidas es el mismo que en el caso de la Figura 5.15 (a) para la esfera ya que este término no depende de la forma de la estructura.

La Figura 5.16 muestra en línea negra el término de pérdidas y en colores el término radiativo para esferoides con las relaciones de aspecto indicadas en la figura. Para una mejor comparación también se incluye el caso de la esfera. Para esferoides de relación de aspecto $M = 5$, se predice GP 10^5 veces mayor con respecto a la molécula aislada. A este límite se puede llegar siempre y cuando las

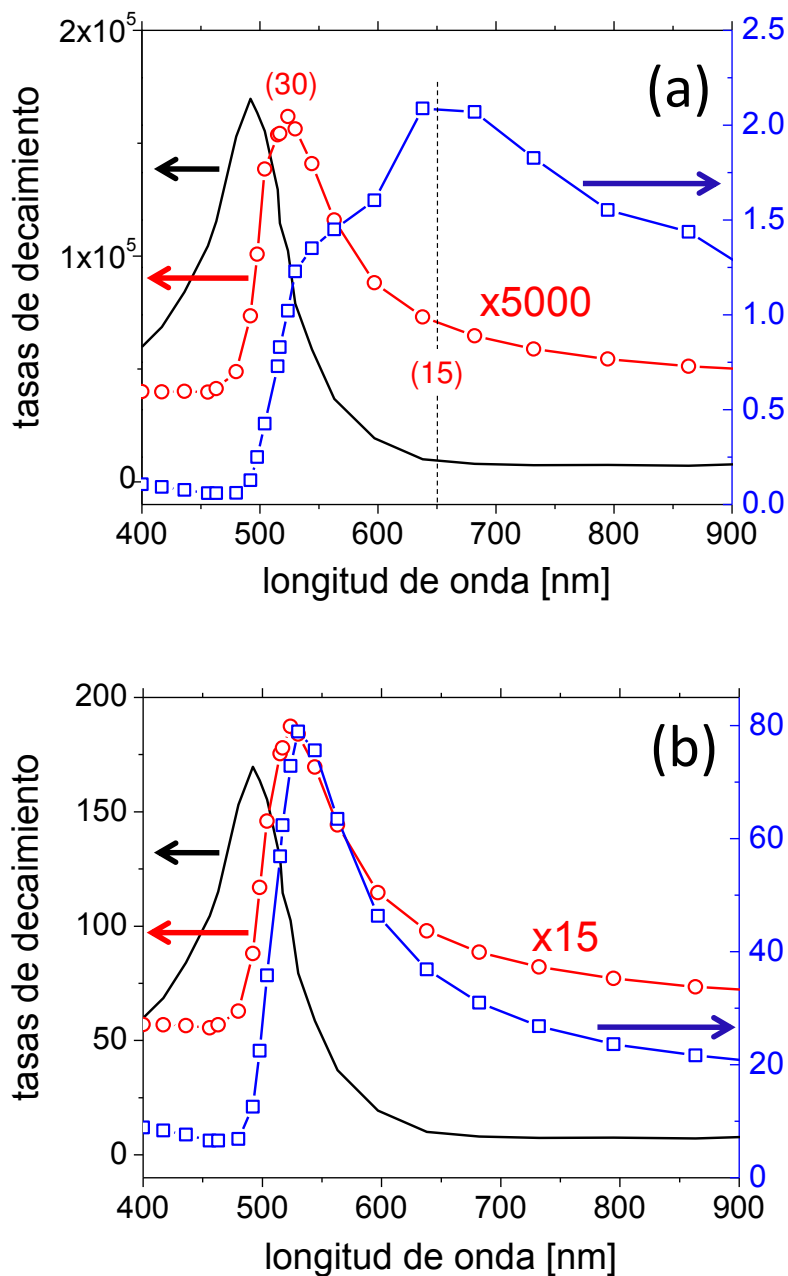


Figura 5.14: Cálculo de la ganancia en el número de fotones, GP, (círculos rojos), ganancia en el brillo, GB, (cuadrados azules), y el término de pérdidas, L, (línea llena negra), para una molécula de $\phi^0 = 0.01$ inmersa en agua como función de la longitud de onda en el máximo de emisión de la molécula. (a): a 1 nm de la superficie de la NP, (b): a 10 nm de la superficie de la NP.

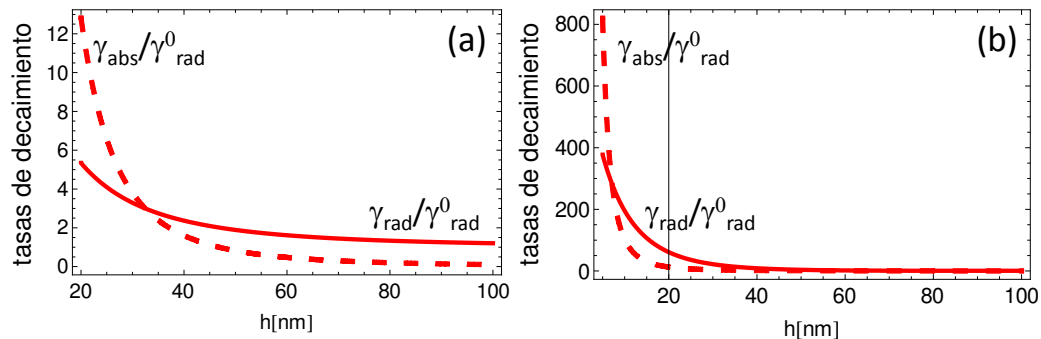


Figura 5.15: Tasas de decaimiento radiativa (línea llena) y de transferencia de energía a la NP (línea punteada), en función de la separación NP-molécula para NPs de dos geometrías diferentes. (a): una esfera, (b): un esferoide de $M = r_z/r_x = 4$.

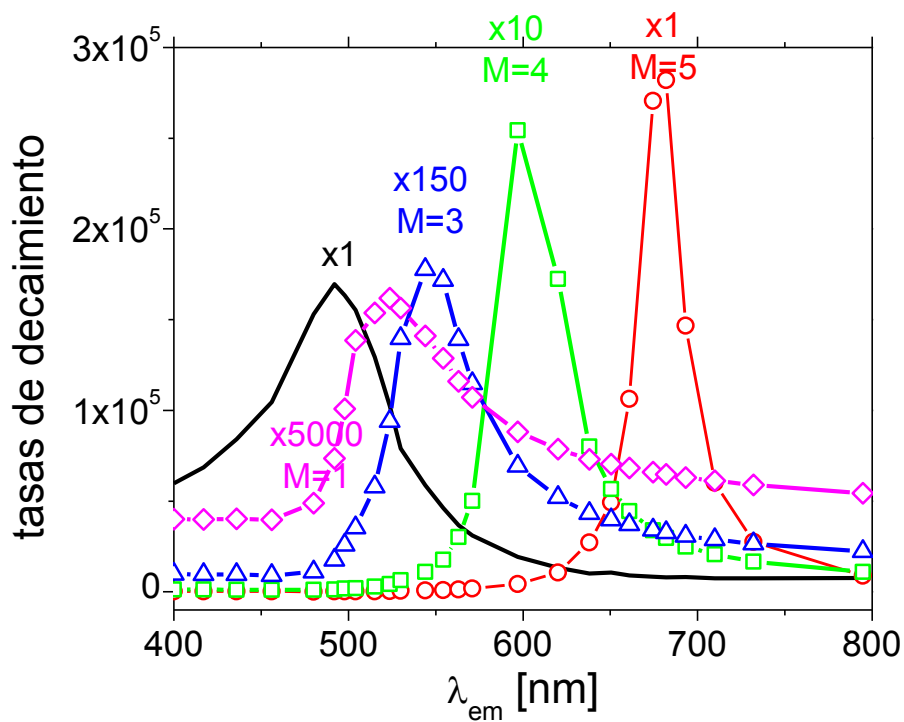


Figura 5.16: Cálculos del término de pérdidas, ec. 5.16 en línea llena negra; y de la ganancia en el número de fotones, ec. 5.23 en símbolos de colores, para esferoides de oro de semiejes según los indicados en la Figura.

vías de degradación que hasta acá se despreciaron y que limitan el número de fotones emitidos no sean importantes. No obstante es interesante esta predicción ya que abre perspectivas y orienta en la dirección para mejorar el desempeño.

Es importante notar que la separación del término radiativo y el disipativo que se obtiene para los esferoides y que estamos describiendo en esta sección, genera un aumento en GB que no es consecuencia de un cambio en la tasa de excitación (fenómeno ya descrito por otros autores) sino que aparece como consecuencia de separar el término radiativo del disipativo.

Resumiendo, hasta el momento se demostró que el aumento en el brillo de los sistemas híbridos formados por moléculas fluorescentes y NPs metálicas es fuertemente dependiente de la separación NP-molécula y de la eficiencia cuántica de fluorescencia de las moléculas, Figura 5.9. Los cálculos utilizando moléculas fluorescentes de diferentes ϕ^0 demuestran que hay un mayor aumento en la emisión fluorescente para las especies de bajos ϕ^0 . Además, la extensión espacial de la región realizada se reduce mientras que ϕ^0 disminuye, Figura 5.9. Se estudió el efecto del tamaño de las NPs en la emisión del híbrido y se demostró que para NPs más grandes se obtienen valores de GB más altos, Figura 5.12. Se estudió el efecto que las características espectrales de la molécula tienen en la emisión del sistema híbrido. Se demostró que regulando la separación NP-molécula se pueden conseguir sistemas que maximicen GB y GP simultáneamente o independientemente, Figura 5.14. Se estudió el efecto que la geometría de la NP tiene sobre la emisión del sistema híbrido. Para híbridos basados en esferoides se demostró que además del aumento en la tasa de excitación, la separación del término radiativo (que depende de la geometría de la NP) con respecto al término de pérdidas (que no depende de la geometría), produce un dramático aumento de GB que alcanza valores del orden de 10^5 para esferoides de relación de aspecto $M = 5$, Figura 5.16.

En la próxima sección se realizan algunos experimentos desde el punto de vista estático, que demuestran el aumento del contraste en la emisión de la fluorescencia al usar NPs como consecuencia del aumento en GB.

5.4. Experimentos de intensificación de fluorescencia

En esta sección se muestran los experimentos realizados para probar las predicciones de la Figura 5.9. Para una descripción más detallada se separa a los experimentos en tres etapas; i) inmovilización de las NPs sobre cubreobjetos, ii) determinación de una única NP de oro, iii) adquisición de las imágenes de fluorescencia.

5.4.1. Inmovilización de las NPs sobre cubreobjetos

En un recipiente limpio se sonicaron cubreobjetos en agua Mili-Q durante 20 minutos. Se renovó el agua del recipiente y se volvió a sonicar por 20 minutos más. Luego se los sumergió durante 10 segundos en HF 5% y se los enjuagó con

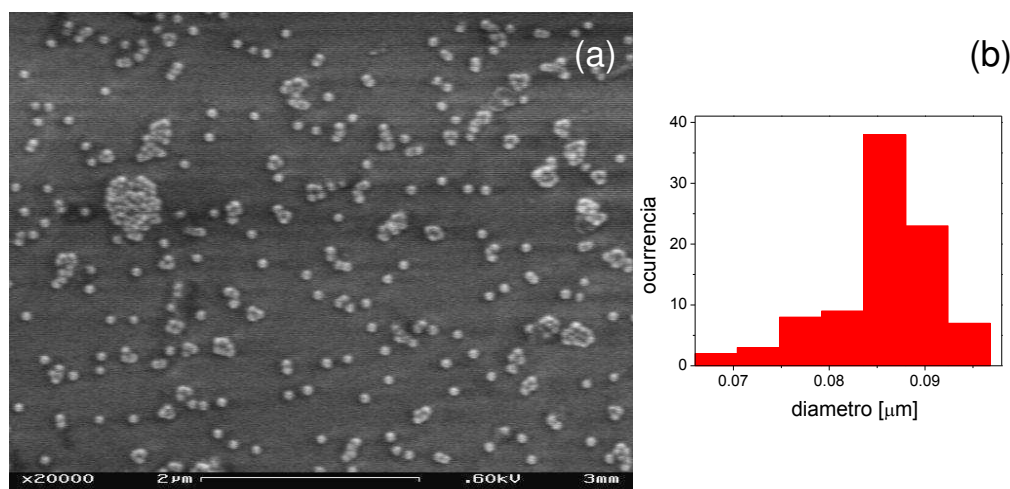


Figura 5.17: (a): Imagen SEM de las NPs utilizadas en este trabajo tomada en el Centro de Microscopías Avanzadas, FCEN, por Silvio Ludueña. (b): Estadística de la distribución de tamaños realizada sobre 90 NPs. El diámetro medido es $(0.085 \pm 0.007) \mu\text{m}$.

abundante agua Mili-Q. Se los dejó en cámara cerrada hasta que se secan completamente. Sobre el cubreobjetos seco se incubó 100 ml de una solución 1:50 en agua de Polietilenimina (de 50KDa) 2% peso/peso (PEI; Aldrich) durante 5 minutos, y luego se enjuagó tres veces con agua Mili-Q. El objetivo de esta etapa es cambiar la carga superficial al cubreobjetos de manera de favorecer una interacción electrostática con las NPs que permita fijarlas. Una vez funcionalizados y secos se incubó $50 \mu\text{l}$ de una solución comercial de NPs de oro de 40 nm de radio nominal (Ted Pella, USA) y concentración 1.1×10^{10} partículas/mL durante 5 minutos. La Figura 5.17 muestra una imagen de microscopía electrónica de barrido, SEM, de las NPs utilizadas.

Finalmente se lavó con abundante agua Mili-Q y se guardó en caja cerrada para su posterior uso. Con este protocolo la cobertura final es aproximadamente de 0.1 nanopartículas/ μm^2 . La Figura 5.18 muestra algunos ejemplos de las muestras construídas.

5.4.2. Ubicación y caracterización de una única NP de oro

Con las muestras preparadas el paso que sigue es identificar las NPs. Como se mencionó anteriormente, la óptica de campo lejano está limitada por la difracción de la luz empleada para iluminar. Por esta razón, con un microscopio óptico convencional los objetos de tamaño mucho menor que la longitud de onda de excitación aparecen en la imagen con el tamaño de la PSF del microscopio. Si bien en las imágenes de la Figura 5.18 hay una diferencia de contraste notoria, solo con la imagen de transmisión no se puede asegurar que todos los puntos oscuros son la imagen de una NP. Para confirmar el origen de cada uno de los puntos oscuros

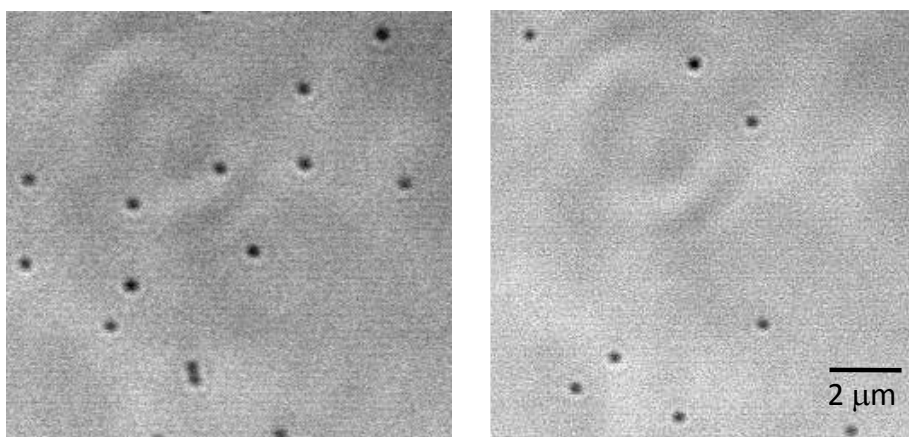


Figura 5.18: Imágenes de transmisión típicas para las muestras de NP de oro adsorbidas sobre un cubreobjetos. Las imágenes fueron tomadas excitando a 543 nm. La separación entre NPs vecinas permite con alta probabilidad eliminar la existencia simultánea de dos NPs en un volumen de observación limitado por difracción.

en la imagen de transmisión, se usaron dos métodos. El primer método utiliza el espectro de extinción de las NPs. Como la posición y la forma del espectro de extinción son fuertemente dependientes del material y del tamaño de las partículas, esta medida es una “huella digital” de la NP. En la Figura 5.19 comparamos el espectro de extinción de una suspensión de las mismas NPs que utilizamos para preparar las muestras, medido en un espectrofotómetro, con la extinción medida sobre un punto oscuro de las imágenes de transmisión usando las cinco longitudes de onda de excitación disponibles en el microscopio. La coincidencia de los espectros de extinción medidos sobre uno de los puntos oscuros y sobre la suspensión de NPs confirma que en la región de la muestra analizada hay efectivamente una NP esférica de oro de ~ 40 nm de radio.

El segundo método para la ubicación de una NP en la imagen de transmisión usa la intensidad de transmisión obtenida excitando la muestra con dos longitudes de onda diferentes. Mientras que el oro extingue fuertemente la luz en el verde, las impurezas lo hacen mayoritariamente en el azul (dispersión Rayleigh). La Figura 5.20 muestra dos ejemplos sobre dos regiones diferentes. En la Figura 5.20(a) un punto oscuro aparece en la imagen de transmisión tomada excitando a 488 nm y no así al excitarla en 543 nm. Este es un ejemplo en donde el punto oscuro corresponde a una impureza. En el caso (b), en cambio, el punto oscuro aparece en las dos imágenes. El mínimo de transmisión pasa del 85 % en el azul, al 62 % en el verde. Esto es consistente con una absorción preferencial en la región espectral del plasmón del oro.

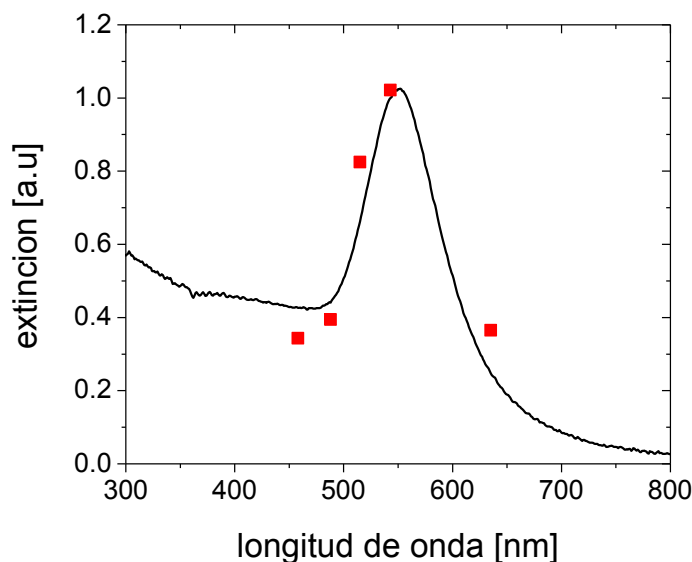


Figura 5.19: Espectros de extinción medido con un espectrofotómetro para una suspensión de las mismas NPs que se usaron para armar las muestras de microscopía (línea llena) comparadas con la extinción de una única NP calculada a partir de las imágenes de transmisión obtenidas usando los cinco láseres disponibles en el microscopio (puntos).

5.4.3. Adquisición de las imágenes de fluorescencia.

En la Figura 5.21 se muestran imágenes de transmisión y sus correspondientes imágenes de fluorescencia adquiridas simultáneamente y en exactamente las mismas condiciones de excitación. Las muestras utilizadas son soluciones $1 \mu\text{M}$ de Rodamina B/agua, Figura 5.21(a, b), y de Rosa de Bengala/agua, Figura 5.21(c, d), sobre cubreobjetos preparados y caracterizados según las secciones 5.4.1 y 5.4.2.

Como las soluciones son homogéneas y los puntos brillantes que se observan en la Figura 5.21 se dan solamente en la posición de las NPs, o bien las NPs o alguno de sus modificadores superficiales fluorescen, o bien la emisión fluorescente en la región cercana a las NPs está fuertemente realzada con respecto al resto del volumen de observación. Para descartar la fluorescencia de las NPs, en la Figura 5.22 se muestra una imagen de fluorescencia tomada antes (b), y después (c), de agregar una gota de Rosa de Bengala en solución. Mientras que la imagen de transmisión, Figura 5.22(a), muestra seis NPs en la región observada, en la señal de fluorescencia recién aparecen luego de agregar la solución. Este experimento demuestra que las NPs no fluorescen y, por lo tanto, la fuerte emisión fluorescente que se observa en las muestras de Rosa de Bengala son consecuencia de una intensificación de la emisión que se da únicamente en las cercanías de las NPs.

Para cuantificar el contraste entre las intensidades de fluorescencia de las re-

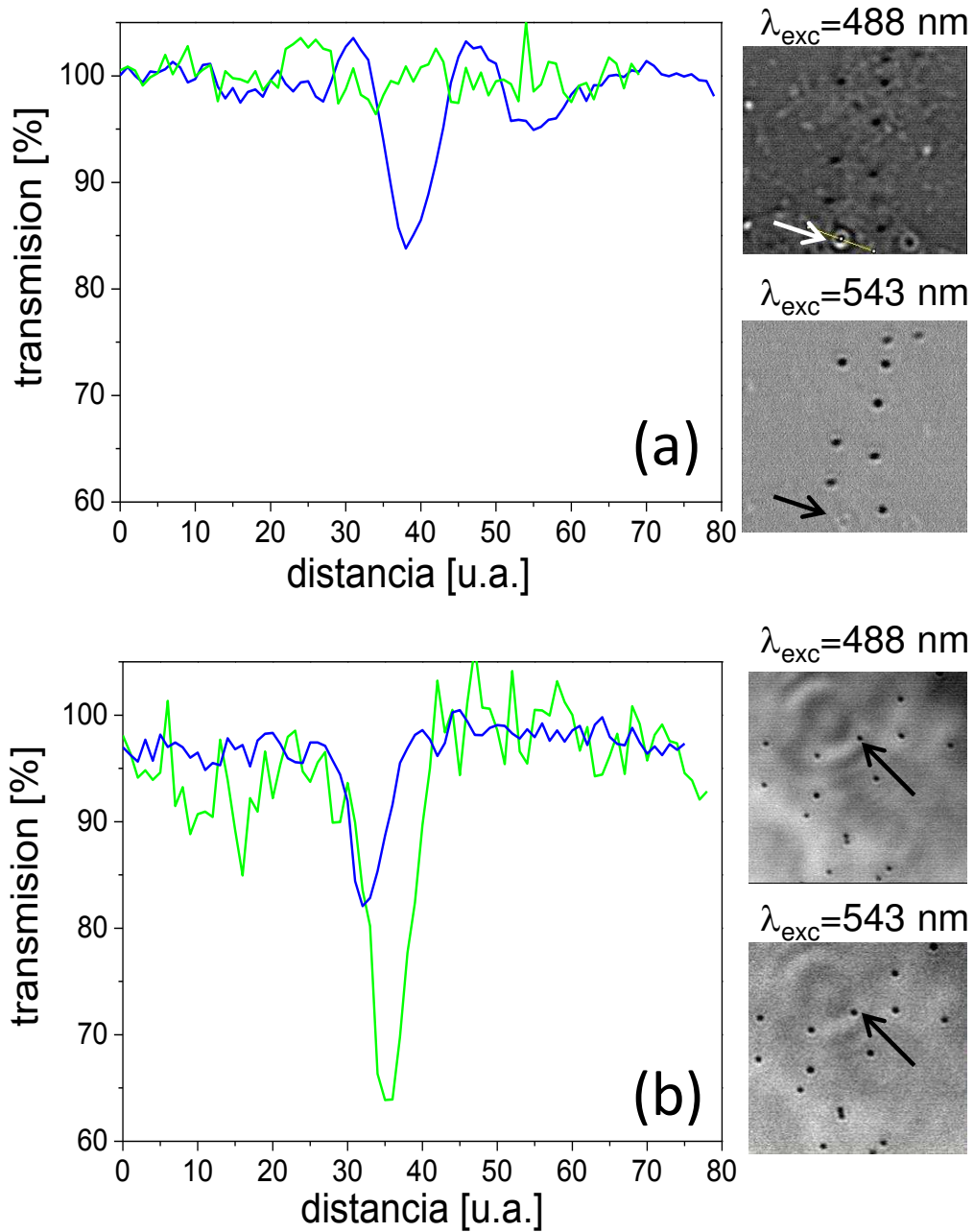


Figura 5.20: Perfiles de la señal de transmisión sobre una posible NP obtenidos a partir de las imágenes ópticas excitando en resonancia con el plasmón (543 nm, en línea verde) y fuera de la resonancia (488 nm, en línea azul). (a): La flecha identifica una impureza sobre el sustrato, (b): La flecha identifica una NP sobre el sustrato.

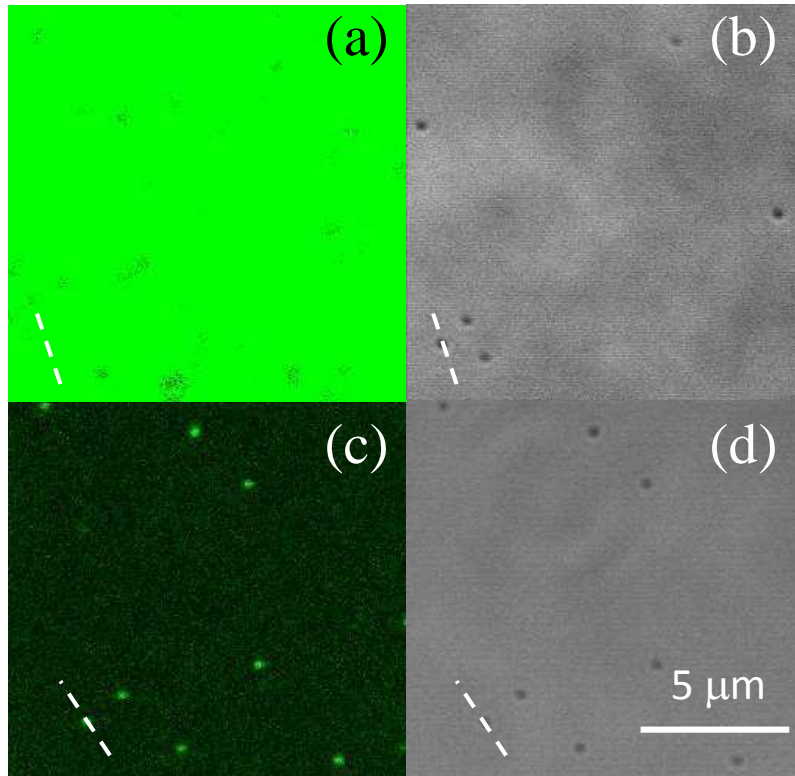


Figura 5.21: Imágenes de fluorescencia (izq.) y de transmisión (der.) para dos muestras de ϕ^0 distintos. (a, b) Rodamina B en agua, concentración $1 \mu\text{M}$ y $\phi^0 = 0.4$; (c, d) Rosa de Bengala en agua, concentración $1 \mu\text{M}$ y $\phi^0 = 0.02$.

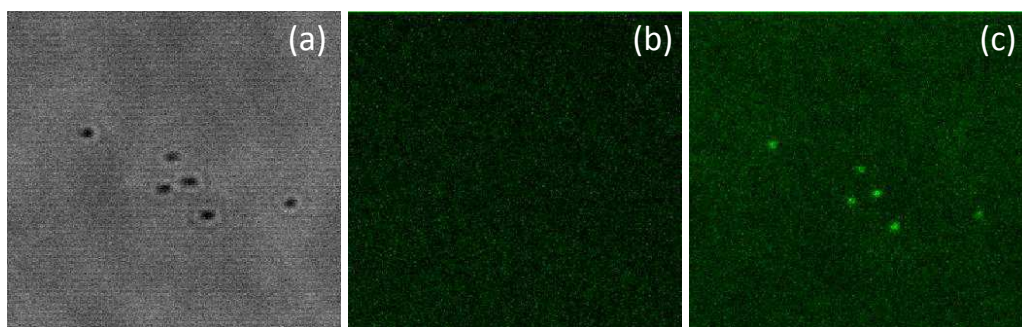


Figura 5.22: Imágenes confocales para un solución de Rosa de Bengala en agua sobre cubreobjetos preparados con NPs de oro de 40 nm de radio. (a): la imagen de transmisión muestra seis NPs, (b): imagen de fluorescencia obtenida antes de poner la solución de Rosa de Bengala, (c): imagen de fluorescencia obtenida después de poner la solución de sonda.

giones donde hay y donde no hay NPs, en la Figura 5.23 se muestran los perfiles de intensidad obtenidos para las soluciones de Rodamina B en agua (en azul), y de Rosa de Bengala en agua (en rojo), en ambos casos calculados sobre una NP (línea punteada de la Figura 5.21). El contraste en la emisión de fluorescencia que se muestra en la Figura 5.21 también se pone de manifiesto en la Figura 5.23. Mientras que para la solución de Rodamina B (en línea azul) la emisión es constante e igual a 203 ± 31 u.a, para la solución de Rosa de Bengala (en línea roja) se observa un aumento de un factor 15 de la intensidad máxima en la posición de la NP con respecto al valor de la intensidad en una región donde no hay NPs. El ajuste por una función gaussiana del perfil de intensidad de fluorescencia para la solución de Rosa de Bengala se muestra en línea negra. El ajuste muestra que el ancho a mitad de altura es de 223 ± 6 nm que se corresponde con la PSF del microscopio usando un objetivo de $NA = 1.35$ y un excitación a $\lambda_{exc} = 543$ nm. La intensidad de fondo promedio se determinó a partir de un histograma de la intensidad de fluorescencia colectada sobre una region sin NPs. Los resultados obtenidos fueron 203 ± 31 u.a y 9 ± 6 u.a para las soluciones de Rodamina B y Rosa de Bengala respectivamente. Es decir, sin tener en cuenta los efectos de intensificación, la emisión de Rodamina B es aproximadamente 20 veces más alta que la emisión de Rosa de Bengala.

Para comparar con los resultados obtenidos experimentalmente se estimó la intensidad de fluorescencia esperada a partir del brillo de las soluciones. En este caso, el brillo se calcula como el producto de la eficiencia cuántica de emisión por el coeficiente de extinción molar a la longitud de onda de excitación, ϵ_{λ} . A 543 nm, ϵ_{543} vale $105800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y $40800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para Rodamina B y para Rosa Bengala respectivamente. Teniendo en cuenta $\phi^0 = 0.4$ y $\phi^0 = 0.02$ para las eficiencias cuánticas de emisión de Rodamina B y Rosa Bengala respectivamente se obtiene un brillo relativo de 50 que es del orden del obtenido en los experimentos. El factor dos entre el valor teórico y el experimental se puede deber a diferencias en las eficiencias cuánticas de emisión, especialmente para la Rosa de Bengala en donde la la eficiencia cuántica de emisión es muy baja.

5.4.4. Experimentos de fotoblanqueo de la muestra

Para confirmar que la fuerte emisión en la Figura 5.21 (c) se debe a moléculas de algún modo adheridas a la superficie de la NP, se hizo un experimento de fotoblanqueo. El experimento consiste en irradiar continuamente una NP durante 80 s, utilizando $40 \mu\text{W}$ de un láser verde linealmente polarizado. La Figura 5.24(a), muestra la situación previa a la irradiación. En la Figura 5.24(b) se muestra la evolución temporal de la intensidad colectada durante la irradiación. La curva no muestra ninguna evidencia de decaimientos discretos causados por el fotoblanqueo de moléculas individuales lo que sugiere que hay una gran cantidad de moléculas adheridas a la superficie de la NP cuya fluorescencia se apaga por completo en algunos segundos. Luego, la intensidad permanece constante. En (c) se ve que la intensificación de la fluorescencia desapareció por completo en la zona irradiada.

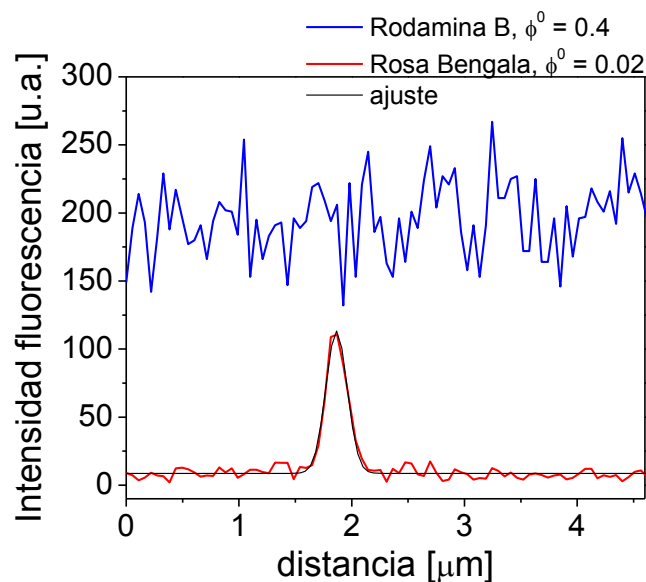


Figura 5.23: Perfiles de la intensidad de fluorescencia obtenidos para soluciones $1 \mu\text{M}$ de Rodamina B en agua, $\phi^0 = 0.4$ (en línea azul), y Rosa de Bengala en agua, $\phi^0 = 0.02$ (en línea roja). En los dos casos los perfiles se trazaron sobre una NP. Mientras que para la solución de Rodamina B la emisión es constante, para la solución de Rosa de Bengala se muestra una diferencia de intensidades de alrededor de 15 entre la región cercana y la región alejada a una NP. En línea negra se muestra el ajuste del perfil por una función gaussiana de ancho a mitad de altura de $223 \pm 6 \text{ nm}$. La intensidad de fondo promedio se determinó a partir de un histograma de la intensidad de fluorescencia colectada sobre una región sin NPs. Los resultados obtenidos fueron $203 \pm 31 \text{ u.a.}$ y $9 \pm 6 \text{ u.a.}$ para las soluciones de Rodamina B y Rosa de Bengala respectivamente.

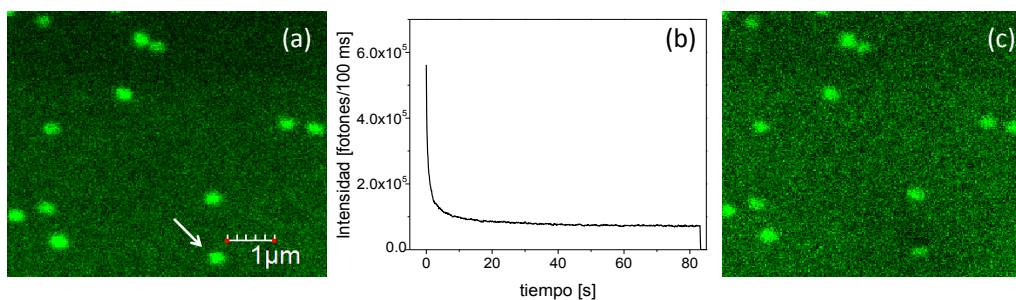


Figura 5.24: Imágenes de fluorescencia para una muestra de Rosa de Bengala en 80 % glicerol en agua sobre una muestra con NPs inmovilizadas. (a): control antes de irradiar, (b): variación temporal de la intensidad de la zona iluminada (c): después de irradiar.

Resumiendo, en este capítulo se demostró que el aumento en el brillo de moléculas en las cercanías de NPs metálicas es fuertemente dependiente de la eficiencia cuántica de fluorescencia de las moléculas bajo estudio. Los cálculos y las observaciones experimentales utilizando moléculas fluorescentes de diferentes ϕ^0 demuestran un mayor aumento en la emisión fluorescente para las especies débilmente fluorescentes. Desde el punto de vista teórico se demostró que la extensión espacial de la región realzada se reduce mientras que ϕ^0 disminuye. Este resultado es consistente con nuestros resultados para experimentos de FCS en volúmenes reducidos (ver capítulo 7) [Estrada et al. 2008, Estrada et al. 2009b]. Por otra parte se mostró que también es posible aumentar el número total de fotones emitidos por una sola molécula antes de destruirse. Con todas estas herramientas, es posible determinar *a priori* los parámetros geométricos y constitutivos de la NP que permiten optimizar al sistema híbrido para una aplicación en particular. A modo de ejemplo, la capacidad de registrar la fluorescencia de moléculas de bajo ϕ^0 , por ejemplo fluorescencia intrínseca de especies que generalmente son consideradas no fluorescentes, podría ser relevante en problemas de biología molecular. Por otra parte, la capacidad de extraer más fotones de una molécula antes de fotoblanquearse es una característica muy interesante de explorar en experimentos de seguimiento de partículas.

Capítulo 6

Función de correlación modificada por una superficie.

En experimentos de FCS, la presencia de una superficie dentro o cerca del volumen de observación modifica apreciablemente las curvas de correlación [Fradin et al. 2003]. Como los experimentos de FCS intensificado que se presentan en el capítulo siguiente se hacen usando NPs adheridas a un cubreobjetos, es importante caracterizar este efecto. En este capítulo se mide la modificación de las curvas de correlación con la posición de una superficie plana con respecto al volumen de observación, y con la carga de dicha superficie. Se analiza el cambio en la función de correlación para el caso difusional cuando el volumen de observación está parcialmente obstruido por una superficie o cuando esta se ubica cerca del volumen de observación. También se analiza el efecto de la adsorción de la sonda sobre la superficie.

6.1. Descripción general

En general, en un experimento de FCS in vitro, la muestra es homogénea y el volumen de la muestra (de típicamente algunas decenas de μl) es mucho más grande que el volumen de observación del microscopio (~ 1 fl). En esos casos los experimentos se realizan ubicando el volumen de observación en el seno de la solución a estudiar como se esquematiza en la Figura 6.1(d). Con esta simple precaución se evitan las interacciones entre las moléculas y la superficie que son las que modifican la función de correlación. Sin embargo, no siempre es posible realizar el experimento de esta manera. En experimentos en células, puede ser necesario por ejemplo, estudiar regiones de la membrana celular o cercanas a ella. En un trabajo previo, Fradin y colaboradores estudiaron el efecto sobre la curva de correlación que tiene una superficie cerca del volumen de observación [Fradin et al. 2003].

Los experimentos de FCS intensificado que se proponen en este trabajo, y que se presentan en el próximo capítulo, se hacen usando NPs adheridas a un cubreob-

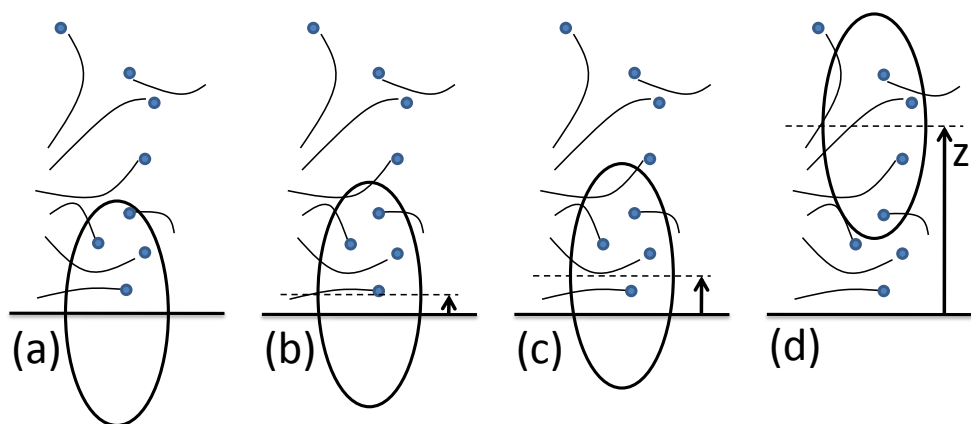


Figura 6.1: Esquema del experimento de FCS cerca de una superficie. (a): la superficie limita el volumen de observación, (b y c): el volumen de observación se sumerge cada vez más dentro de la solución, (d): volumen de observación en el seno de la solución y lejos de la superficie. En este esquema la línea llena horizontal es una de las caras de un cubreobjetos. Estrictamente hablando hay que tener en cuenta que el espesor nominal de un cubreobjetos tradicional (número 1) es de entre 150 y 170 μm .

jetos. Por esta razón, para hacer una correcta interpretación de los experimentos, es importante caracterizar el efecto que la cercanía de una superficie tiene sobre la curva de correlación. Para estudiar este efecto, se hicieron los experimentos que se describen en la sección 6.2 y los resultados se analizaron a partir de dos interpretaciones diferentes que se presentan en las secciones 6.2.1 y 6.2.2.

6.2. Experimentos

Se hicieron experimentos que estudian la dependencia de las curvas de correlación con respecto a dos características importantes del problema: la posición del volumen de observación respecto a la superficie, y la carga superficial del cubreobjetos. Todos los experimentos que se muestran en este capítulo se hicieron usando una gota de una solución de TMR C = 18 nM en agua, directamente depositada sobre un cubreobjetos. En la Figura 6.2 se muestran, a modo de ejemplo, dos curvas de correlación (correspondientes al promedio de 500 experimentos cada una) obtenidas sobre el mismo cubreobjetos pero donde el volumen de observación se ubicó en dos posiciones de la muestra. La posición relativa del volumen de observación con respecto a la superficie también se muestra en la Figura 6.2. Como consecuencia de la presencia de la superficie se pueden observar claramente dos efectos: un cambio en la amplitud de la correlación, asociado a un cambio en el número medio de moléculas en el volumen de observación, y un cambio en la

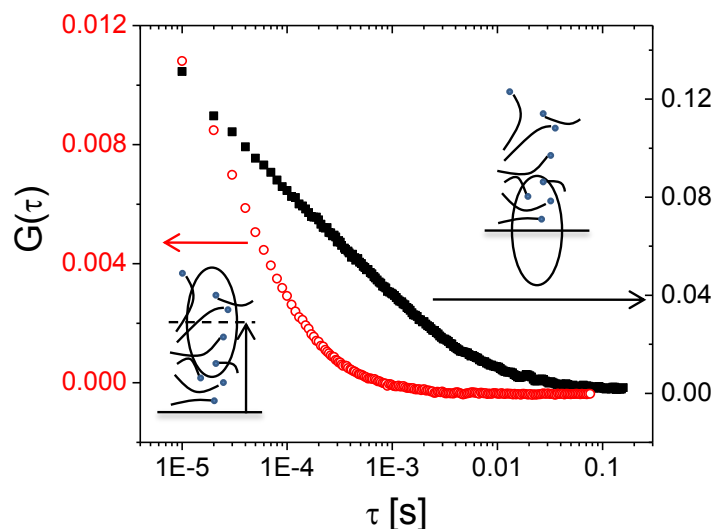


Figura 6.2: Funciones de correlación de una solución de TMR/agua $C = 18$ nM sobre la superficie del cubreobjetos (en cuadrados llenos negros), y a $1 \mu\text{m}$ de la superficie (en círculos vacíos rojos). Más adelante en este capítulo se muestra que tener el centro del volumen de observación a $1 \mu\text{m}$ de la superficie es equivalente a que el volumen esté completamente sumergido en la solución.

dependencia temporal que refleja algún tipo de interacción¹ de las moléculas con la superficie. Para estudiar este efecto más sistemáticamente, se realizaron experimentos variando la posición del volumen de observación de manera controlada.

El experimento es análogo al que se mostró previamente. Primero, se deposita $\sim 45 \mu\text{l}$ de la solución de TMR en agua. Luego, el volumen de observación se ubica de manera que la superficie del cubreobjetos quede centrada con respecto al eje mayor del volumen de observación, Figura 6.1(a). Para centrar el cubreobjetos se usa el efecto de aumento de intensidad debido a las moléculas adsorbidas sobre la superficie del cubreobjetos, descrito en la sección 3.3.2 y mostrado en la Figura 3.8. Finalmente se realizan mediciones cada 50 nm avanzando con el volumen de observación cada vez más adentro de la solución, Figuras 6.1(b) y (c).

Este experimento se realizó con cubreobjetos tratados de dos maneras diferentes. En el primer caso el cubreobjetos se lavó con HF al 5% durante 10 s y luego se lo enjuagó con abundante agua Mili-Q. Este procedimiento aumenta la carga superficial negativa propia del cubreobjetos. En el segundo caso, el cubreobjetos se trató con una solución de Polietilenimina (PEI; Aldrich) durante 5 minutos como se describió en la sección 5.4.1. Este procedimiento cambia la carga superficial del cubreobjetos, quedando esta ahora con un valor positivo. Los resultados de las funciones de correlación medidas para ambas superficies se muestran en las Figuras 6.3(a) y 6.3(b), respectivamente.

¹El término interacción se usa en el sentido amplio de la palabra, ya sea para describir una reacción química o simplemente una reflexión de las moléculas en la superficie.

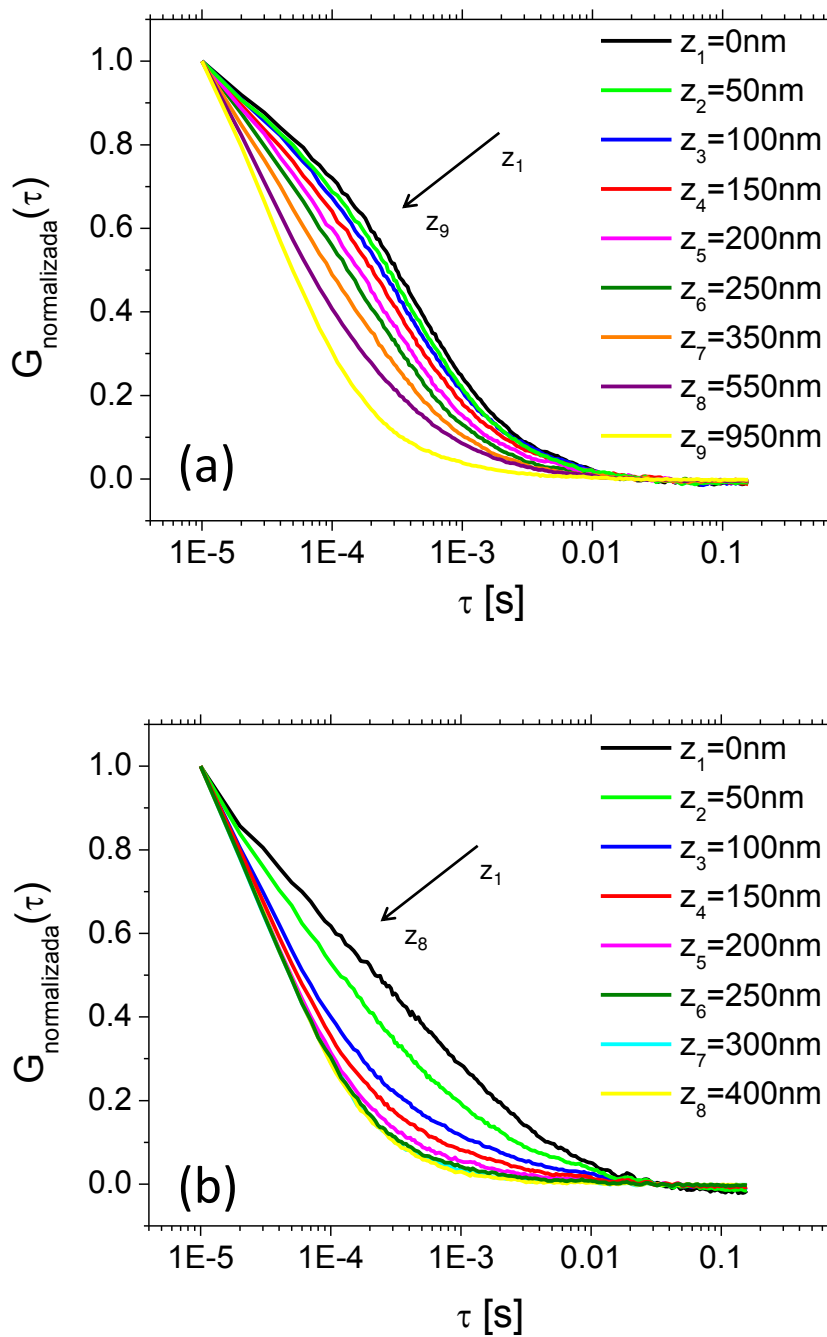


Figura 6.3: Funciones de correlación de una solución de TMR/agua $C = 18$ nM, lejos de la superficie (valores altos de z), y cerca de la superficie (valores chicos de z). (a): sobre vidrio tratado con HF y lavado, (b): sobre un vidrio tratado con HF, lavado y luego cubierto con PEI.

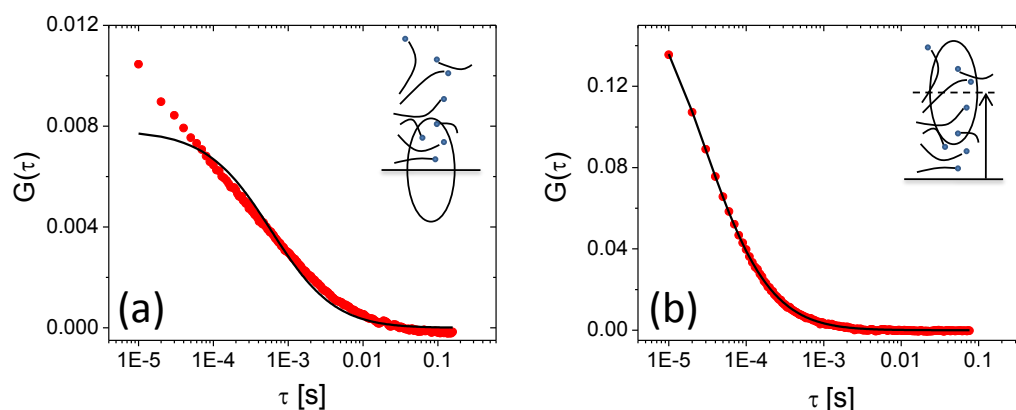


Figura 6.4: Experimentos de correlación realizados con la superficie de un cubreobjetos centrada en el volumen de observación (a), y la superficie muy alejada del volumen de observación (b). En ambos casos el ajuste realizado corresponde a un modelo que considera un único tiempo de correlación difusional, ec. 2.11. La superficie es un cubreobjetos tratado con HF.

Una simple inspección de los resultados obtenidos en la Figura 6.3 muestra que el comportamiento de la función de correlación no sólo depende de la posición de la superficie, efecto que ya se había observado en la Figura 6.2, sino también de la carga superficial del cubreobjetos. Para hacer un análisis cuantitativo de los resultados, las curvas de correlación obtenidas en las Figuras 6.3(a) y 6.3(b) se ajustaron usando un modelo que considera la difusión de una única especie de moléculas, es decir un modelo que tiene un único tiempo de correlación difusional, ec. 2.11. Mientras que este modelo ajusta muy bien los experimentos realizados lejos de la superficie, Figura 6.4(b), no ocurre lo mismo con los experimentos realizados cerca de la superficie, Figura 6.4(a). Esto se debe a que cuando el volumen de observación está cerca de la superficie, las curvas de correlación se ven afectadas por la interacción de las moléculas con la superficie. Para tener en cuenta esta interacción se proponen dos maneras de analizar los datos: (i): considerar que cerca de la superficie hay una subpoblación de las moléculas que difunden con un coeficiente de difusión aparente, $D_{aparente}$, menor al coeficiente de difusión de las moléculas lejos de la superficie. Esta interpretación describe el efecto de la superficie como un *enlentecimiento* en la difusión de las moléculas que están cerca de la superficie; (ii): considerar que cerca de la superficie hay una adsorción-desorción de una proporción de las moléculas con la superficie además de la difusión a través del volumen de observación.

En general, el hecho de introducir más parámetros mejora el ajuste. Para evitar un exceso de parámetros libres, y dado que en los experimentos se usó una solución de una sonda estándar, en todos los ajustes por un modelo que incluye dos tiempos de correlación (dos tiempos de correlación difusionales en el caso (i), o un tiempo de correlación difusional mas uno de adsorción-desorción en el caso (ii)), un tiempo

de correlación difusional se fijó en $46 \mu\text{s}$, que corresponde al tiempo de correlación difusional medido cuando el volumen de observación está en el seno de la solución. Esto se realizó tanto cuando se usaron dos tiempos de correlación difusionales en el caso (i), como cuando se usó un tiempo de correlación difusional mas un proceso de adsorción-desorción en el caso (ii). De este modo, todos los experimentos se ajustaron por distintos modelos pero en todos los casos los modelos tienen un único tiempo de correlación como parámetro libre.

6.2.1. Caso (i): dos tiempos de correlación difusionales

En la Figura 6.4(a), se ve claramente que cuando la superficie está cerca del volumen de observación un modelo difusional con un único tiempo de correlación no describe los resultados obtenidos. En esta sección, los resultados se analizan agregando un tiempo de correlación difusional adicional. Es decir, en el volumen de observación hay dos especies de moléculas. Una especie que difunde con un coeficiente de difusión $D = 280 \mu\text{m}^2/\text{s}$ fijo (es decir $\tau_{dif} = 46 \mu\text{s}$ fijo) y una segunda especie que difunde con $D_{aparente}$ libre (es decir τ_{dif} libre). De este modo el modelo con dos tiempos difusionales tiene la misma cantidad de parámetros libres que el modelo con un tiempo difusional. Luego, todos los experimentos de la Figura 6.3 se ajustaron simultáneamente por el modelo de uno y el modelo de dos tiempos de correlación difusionales (aunque en este caso, uno de los tiempos se mantuvo fijo como se explicó anteriormente). Los tiempos obtenidos a partir de los ajustes se muestran en la Figura 6.5.

La Figura 6.5 muestra que en ambas superficies a partir de la distancia d_c (marcada con la flecha vertical) los ajustes con el modelo que considera un único tiempo difusional (cuadrados llenos) dan un valor para el tiempo característico constante en $\sim 45 \mu\text{s}$. Este valor corresponde al tiempo de residencia medio de una molécula de TMR difundiendo con $D = 280 \mu\text{m}^2/\text{s}$. En los mismos casos, el tiempo obtenido a partir del ajuste por el modelo de dos tiempos difusionales (círculos vacíos) dan valores que no tienen ningún sentido. La distancia d_c , que corresponde a la distancia a partir de la cual la superficie no tiene ningún efecto sobre la función de correlación, depende de la superficie y vale $\sim 950 \text{ nm}$ para el vidrio tratado con HF (superficie cargada negativamente) y $\sim 300 \text{ nm}$ para el vidrio tratado con HF y cubierto con PEI (superficie cargada positivamente). Es decir, para el volumen de observación sumergido en la muestra una distancia d_c o mayor, las curvas de correlación deberían ser todas iguales a la curva de correlación para moléculas difundiendo con un tiempo difusional $\sim 45 \mu\text{s}$. Esto se observa en las mediciones de la Figura 6.6. Es decir que a partir de d_c la interacción de las moléculas con la superficie se puede despreciar y un modelo que considere la difusión de una única especie de moléculas alcanza para describir los resultados obtenidos.

Los valores de d_c obtenidos con ambas superficies a partir de los experimentos que se muestran en la Figura 6.5 son marcadamente diferentes. TMR es una molécula sin carga pero con estructura de zwitterion. Posee un centro de cargas po-

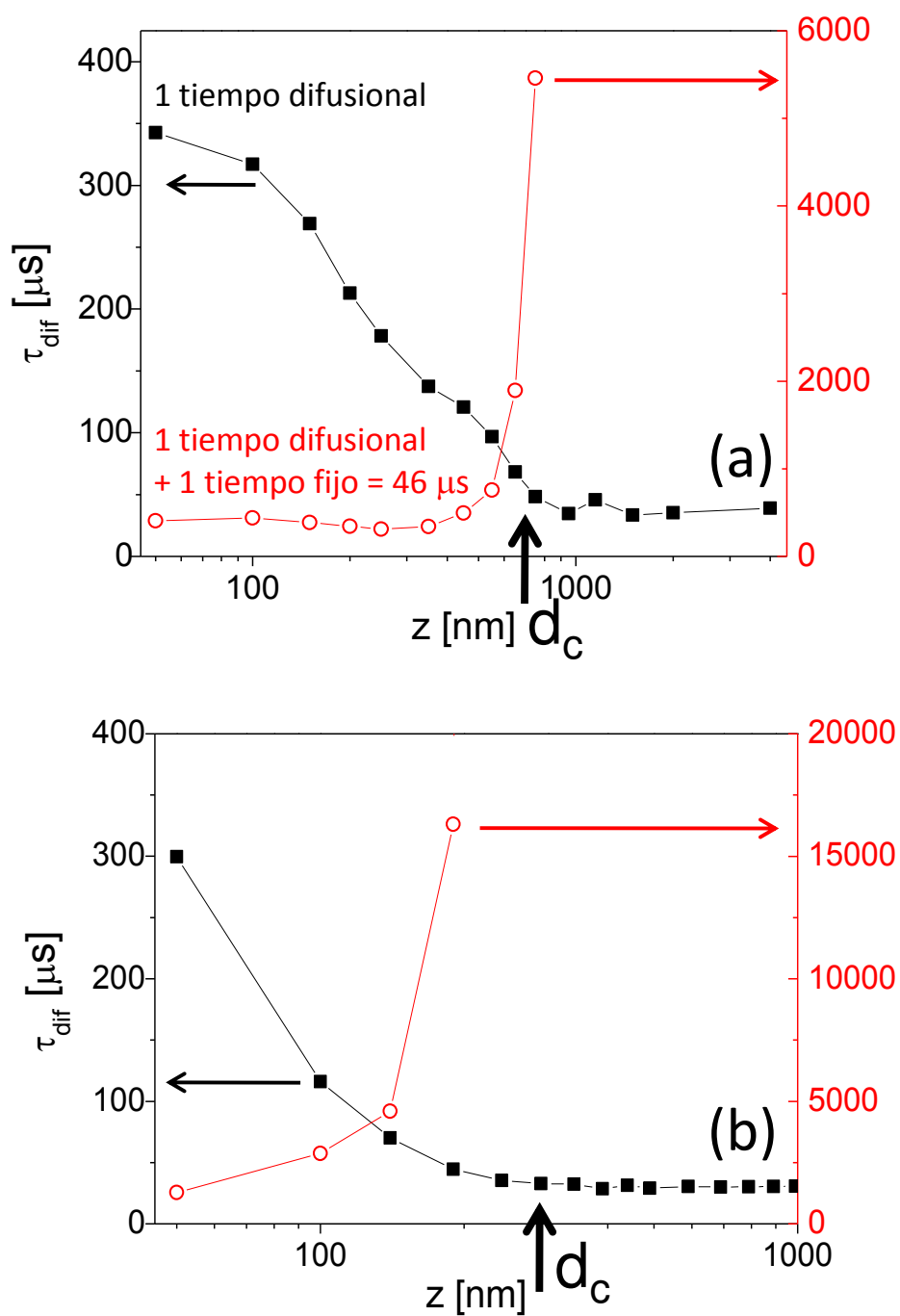


Figura 6.5: Tiempos característicos obtenidos a partir del ajuste por la función de correlación para los modelos de uno (cuadrados llenos negros) y de dos (círculos vacíos rojos) tiempos de correlación difusionales. En el caso del modelo con dos tiempos difusionales, uno se fijó en $46 \mu\text{s}$. La flecha vertical indica la distancia característica, d_c (a): sobre vidrio tratado con HF y lavado, (b): sobre vidrio tratado con HF, lavado y luego cubierto con PEI.

superficie	carga superf	d_c	τ_{dif}^{max}	τ_{dif}^{min}	$D_{aparente}^{min}$	$D_{aparente}^{max}$
vidrio HF	neg.	~ 950 nm	0.5 ms	0.3 ms	$25 \mu\text{m}^2/\text{s}$	$40 \mu\text{m}^2/\text{s}$
vidrio HF+PEI	pos.	~ 300 nm	4 ms	1 ms	$3 \mu\text{m}^2/\text{s}$	$10 \mu\text{m}^2/\text{s}$

Tabla 6.1: Parámetros más importantes de la caracterización por FCS de dos superficies con diferente carga superficial. d_c es la distancia a partir de la cual la función de correlación medida se puede describir como la difusión de una única especie de moléculas. Para distancias menores que d_c se muestran los valores de los coeficientes de difusión aparentes, $D_{aparente}$, que surgen de los tiempos τ_{dif}^{max} y τ_{dif}^{min} de la especie adicional. Notar que el $D_{aparente}$ es mucho menor que el D para la difusión de las moléculas lejos de la superficie, lo cual es consistente con nuestra interpretación de moléculas enlentecidas como consecuencia de la superficie.

sitivas deslocalizado en los grupos amino y un centro de carga negativa localizado en el grupo carboxilato. No posee contraión porque es una sal interna.

El pKa del grupo carboxilato está en torno a 5, por lo que no debe ser extraño que se halle protonada cerca de la superficie del vidrio tratado con HF. Esto le confiere una carga positiva a la sonda que aumenta su interacción con la superficie tratada con HF. Es menos probable que PEI protone a TMR y en todo caso este hecho sólo va a disminuir la interacción sonda-polímero. Estas razones pueden explicar el hecho de que TMR interactúa más fuertemente con el vidrio tratado con HF que con el vidrio recubierto con PEI.

Es importante notar que para los valores obtenidos de d_c la superficie todavía está dentro del volumen de observación, y sin embargo, un modelo que considere la difusión a través de un volumen gaussiano en las tres dimensiones describe los resultados. Esto ocurre porque al ser $\omega_z \gg \omega_0$ el decaimiento de las fluctuaciones está dominado por la difusión en la dimensión más corta del volumen de observación (ver sección 2.2)

Para distancias menores que d_c es necesario agregar un segundo tiempo para obtener un ajuste razonable de los resultados. Este segundo tiempo de correlación difusional se puede relacionar con un coeficiente de difusión aparente, $D_{aparente}$, que depende de la distancia y de la superficie.

Resumiendo, la Figura 6.5 muestra que la interacción de las moléculas con la superficie perdura a distancias más largas entre la superficie y el centro del volumen de observación para el vidrio tratado con HF comparado con el vidrio tratado con HF y cubierto con PEI. Superada la distancia característica, las curvas de correlación son siempre iguales y se pueden explicar a partir de un modelo que considera la difusión de una única especie con $D \sim 280 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Un resumen de los resultados más importantes de este análisis se pueden ver en la Tabla 6.1.

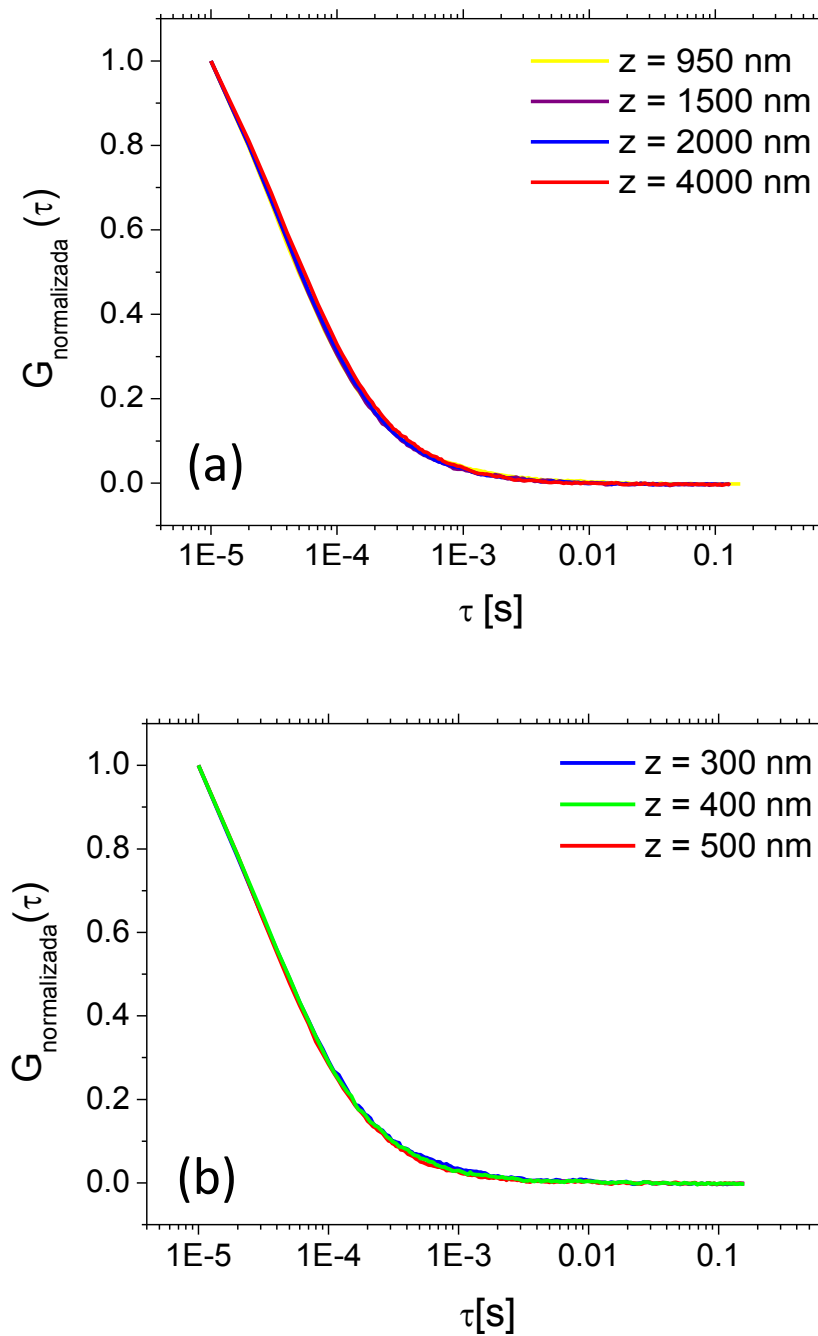


Figura 6.6: Curvas de correlación de una solución de TMR/agua $C = 18$ nM, cuando el volumen de observación está alejado de la superficie del cubreobjetos. (a): sobre vidrio tratado con HF y lavado, (b): sobre vidrio tratado con HF, lavado y luego cubierto con PEI.

6.2.2. Caso (ii): un tiempo de correlación difusional y un tiempo de correlación de adsorción-desorción

Ya se mostró que el modelo de un único tiempo característico difusional describe muy bien las mediciones realizadas lejos de la superficie del cubreobjetos, Figura 6.4(b), pero no ajusta cuando la superficie está cerca del volumen de observación, Figura 6.4(a). En esta sección, para incluir el proceso adicional a la difusión que aparece cerca de la superficie, se hace una interpretación alternativa a la realizada en la sección 6.2.1. En trabajos anteriores se propuso que las moléculas pueden interactuar con una superficie, con un proceso que se puede aproximar al de una reacción en volumen [Wirth et al. 2001, Starr et al. 2001, Sanchez et al. 2001]. En la Figura 6.7 se ajustaron los datos por un modelo que incluye, además de la difusión, un término que tiene en cuenta una interacción de adsorción-desorción de las moléculas a la superficie. La adsorción se trató como un proceso del tipo

$$A + Sup = A_{ads} \quad (6.1)$$

donde

$$\frac{1}{\tau_R} = k_A A + k_B \quad (6.2)$$

Un proceso de reacción como el planteado en la expresión 6.1 tiene una función de correlación como la dada en la ec. 2.14. Es decir, en el caso en el que $\tau_c^{reaccion} \ll \tau_c^{dif}$, la función de correlación total que tiene en cuenta un proceso de difusión y una reacción queda²:

$$\begin{aligned} G_{total}(\tau) &= 2G(\tau)_{dif} + 2G(\tau)_{reaccion} \\ &= 2 \frac{1}{\langle N \rangle} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_{\omega_0}^{dif}} \right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_{\omega_0}^{dif}} \left[\frac{\omega_0}{\omega_z} \right]^2 \right)^{-\frac{1}{2}} + 2G_{0R} e^{-\frac{\tau}{\tau_R}} \\ &= 2G_0^{dif} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_{\omega_0}^{dif}} \right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_{\omega_0}^{dif}} \left[\frac{\omega_0}{\omega_z} \right]^2 \right)^{-\frac{1}{2}} + 2G_{0R} e^{-\frac{\tau}{\tau_R}} \end{aligned} \quad (6.3)$$

donde el factor dos que precede a $G(\tau)_{reaccion}$ viene de suponer que $\tau_c^{reaccion} \ll \tau_c^{dif}$, ec. 2.17, mientras que el factor dos de $G(\tau)_{dif}$ viene de suponer que la superficie del cubreobjetos está centrada en el volumen de observación y, por la tanto, la cantidad de moléculas que difunden es exactamente la mitad de las que habría con el volumen de observación completamente sumergido en la muestra.

Al igual que en la sección 6.2.1, para mantener el mismo número de parámetros libres y así poder comparar los resultados, el tiempo de correlación difusivo se fijó a partir del que surge en los ajustes con el volumen de observación lejos de

²En el caso opuesto, $\tau_c^{reaccion} \gg \tau_c^{dif}$, no tiene sentido físico plantear una función de correlación correspondiente a una difusión y una reacción. Una vez que la molécula difundió afuera del volumen de observación no es posible recuperar otros procesos. Si $\tau_c^{reaccion} \gg \tau_c^{dif}$ las dos especies difunden como dos especies independientes.

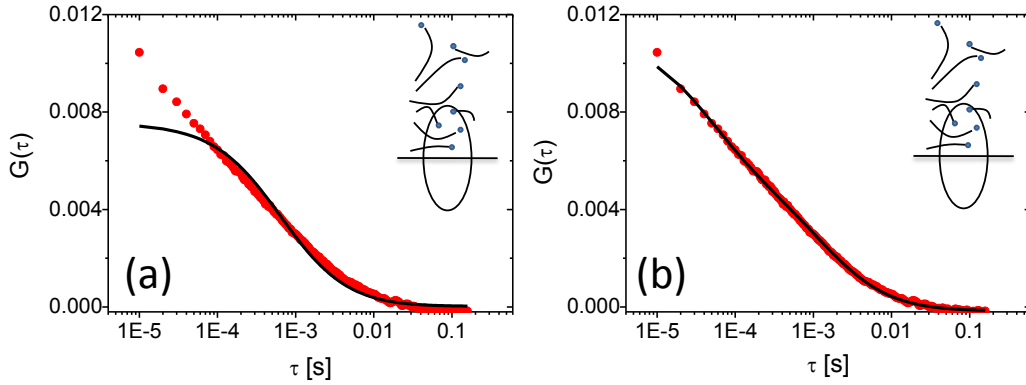


Figura 6.7: Curva de correlación medida con la superficie del cubreobjetos centrada en el volumen de observación. (a): ajustada por un modelo que considera únicamente la difusión de las moléculas. (b): ajustada por un modelo que además de la difusión considera una adsorción tratada como un proceso de reacción en volumen. En este caso el tiempo de correlación difusional se igualó al obtenido en este experimento lejos de la superficie.

la superficie. Los tiempos de correlación de reacción, τ_R , obtenidos para las dos superficies se muestran en la Figura 6.8. Al igual que en la Figura 6.5, los tiempos obtenidos para las curvas de correlación medidas a distancias menores que d_c se mantienen aproximadamente constantes con valores entre 1 y 3 ms para el vidrio tratado con HF, y entre 2 y 5 ms para el vidrio tratado con HF y cubierto con PEI. Para distancias mayores a d_c el modelo que considera un tiempo difusional y un tiempo de reacción dan valores de los parámetros inconsistentes (valores para la amplitud del proceso de reacción, G_{0R} , negativa). Finalmente, los valores de d_c obtenidos fueron de alrededor de 700 nm para el vidrio tratado con HF y de 200 nm para el vidrio tratado con HF y cubierto con PEI, valores muy similares a los encontrados en la sección 6.2.1.

Por último, se analizó el peso relativo que cada uno de los dos procesos tiene sobre la curva de correlación, en función de la posición de la superficie. La Figura 6.9 muestra que a medida que el volumen de observación se acerca a la superficie, la contribución relativa del término de reacción con respecto al término difusivo aumenta. Este efecto ya había sido observado en el trabajo de Fradin y colaboradores. La amplitud de la correlación tiene que ver con el número de moléculas que participan de cada proceso, con el nivel de la señal de fondo y con el cambio de brillo asociado a cada proceso de fluctuación. Como no se conocen las amplitudes para los cambios de brillo de una molécula en cada circunstancia, no se puede extraer conclusiones sobre el número de moléculas que participa de cada proceso.

Resumiendo los resultados de este capítulo, cuando las mediciones se realizan lejos de una superficie, un modelo puramente difusivo alcanza para explicar los resultados obtenidos experimentalmente. Sin embargo, como se puede ver en las Figuras 6.7(a) y 6.4(a), no ocurre lo mismo cuando se estudia la región cercana a una superficie. Cerca de la superficie del cubreobjetos es necesario agregar al mo-

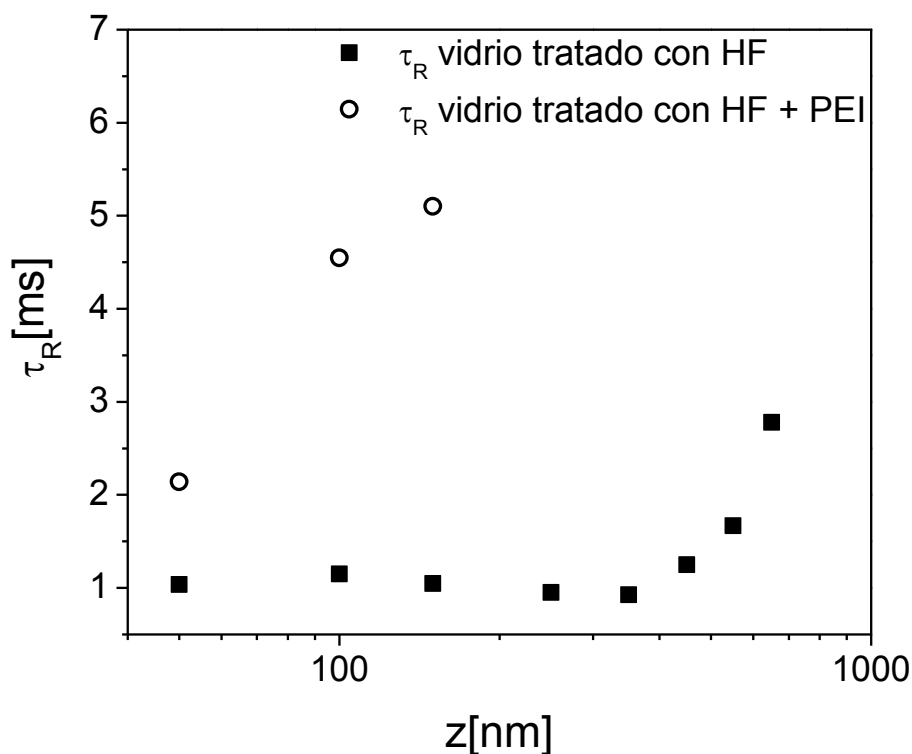


Figura 6.8: Tiempos de correlación para la reacción, τ_R , obtenidos a partir del ajuste con el modelo de un tiempo difusional fijo más un tiempo de reacción. En (cuadrados llenos) sobre la superficie de vidrio tratado con HF y lavado, y en (círculos vacíos) sobre vidrio tratado con HF, lavado y luego cubierto con PEI. Las d_c son 700 nm para el vidrio tratado con HF y 200 nm para el vidrio cubierto con PEI.

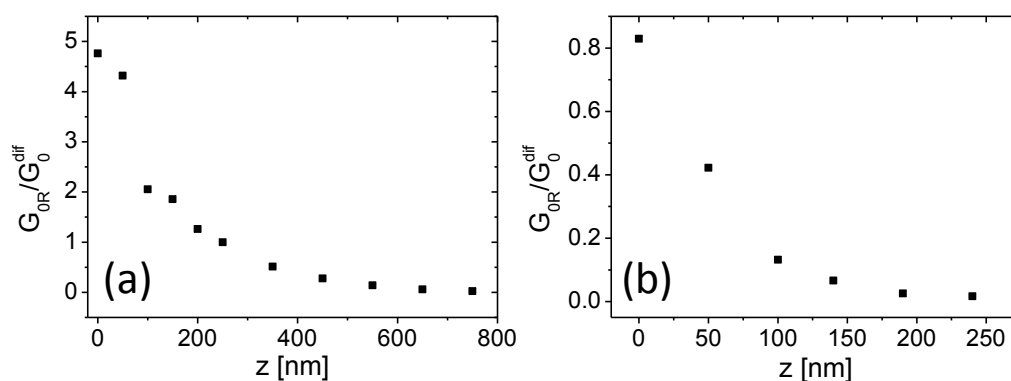


Figura 6.9: Amplitud relativa del término de reacción, G_{0R} , con respecto al término difusivo, G_0^{diff} . (a) vidrio tratado con HF, (b) vidrio tratado con HF y cubierto con PEI.

delo, un tiempo de correlación adicional. El tiempo adicional se interpretó de dos maneras diferentes: como una subpoblación del total de las moléculas difundiendo con un coeficiente de difusión diferente (sección 6.2.1), o como un proceso de adsorción-desorción de las moléculas con la superficie (sección 6.2.2). Con ambas interpretaciones, se determinaron los tiempos de correlación y las distancias características a partir de las cuales la superficie no afecta a la curva de correlación. Para las dos superficies analizadas, las distancias características corresponden a una posición de la superficie dentro del volumen de observación.

La posibilidad de observar un cambio tan dramático en las curvas de correlación cerca y lejos de una superficie demuestran que la espectroscopía de correlación de la fluorescencia puede usarse como técnica para caracterizar de manera no invasiva superficies transparentes con una resolución espacial del orden del tamaño del volumen de observación.

6.3. Expresión analítica para la función de correlación cerca de una superficie

La expresión para la función de correlación para el caso difusional, fue derivada en la ec. 2.11. Sin embargo, en las secciones anteriores se utilizó esta misma expresión para ajustar procesos donde había una superficie cerca. En esta sección se estudia más cuidadosamente la validez de esta aproximación.

Para determinar la expresión analítica de la función de correlación, a medida que el volumen de observación se acerca a una superficie, se debe tener en cuenta que las moléculas no pueden explorar libremente todo el volumen, Figura 6.1(a-c). La intensidad de fluorescencia colectada a tiempo t , $I(t)$ ya no es la derivada en la ec. 2.7, sino que ahora depende de la posición de la superficie con respecto al centro del volumen de observación, z_{umbral} ,

$$I(t) = Q \int_{z_{umbral}}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} p_{norm}(\mathbf{r}) C(\mathbf{r}, t) dx dy dz \quad (6.4)$$

Mientras que en el plano xy , las moléculas no tiene restringido su movimiento y, por lo tanto, todas contribuyen a la intensidad colectada, en la dirección de propagación del haz hay moléculas unicamente a partir de $z = z_{umbral}$. Este no es el único efecto que la presencia de la superficie tiene sobre la función de correlación. Una molécula puede reflejarse en la superficie y así reingresar al volumen de observación aumentando su tiempo de residencia. Como consecuencia de esto, aumenta el tiempo de correlación. Un caso particular ocurre cuando la superficie se encuentra en el centro del volumen de observación, $z_{umbral} = 0$, Figura 6.1(a). Las moléculas que reingresan al volumen de observación por haberse reflejado en la superficie, se pueden considerar como originadas en un volumen de observación imagen. En este caso particular, el volumen de observación efectivo total (el real más su imagen) tiene las mismas dimensiones que cuando el volumen de observación se encuentra completamente sumergido en la solución. Por lo tanto, la

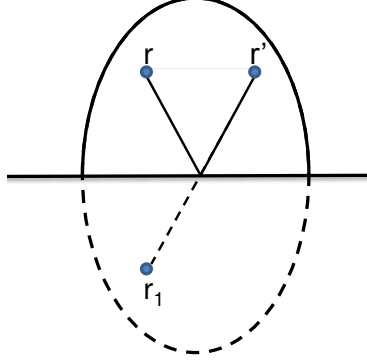


Figura 6.10: La superficie del cubreobjetos separa al volumen de observación en partes iguales. Las moléculas que se reflejan en la superficie se pueden considerar como provenientes del volumen imagen.

función de correlación es la misma que en el caso en que no existe la superficie. Sin embargo, la cantidad de moléculas es la mitad que en el caso del volumen de observación completamente inmerso en la muestra. Este hecho contribuye con un factor 2 en la amplitud de la correlación.

Para incluir las condiciones de reflexión en la superficie, en el trabajo de [Fradin et al. 2003] los autores redefinen la probabilidad de encontrar una molécula en la posición \mathbf{r}' a tiempo t si encontraba en la posición \mathbf{r} a $t = 0$. En nuestro cálculo, se simetriza la dependencia espacial del brillo, $p(\mathbf{r})$ como un método alternativo para incluir las posibles reflexiones en la superficie del cubreobjetos. Se puede demostrar que para el caso particular de $z_{umbral} = 0$, se cumple que:

$$G_{sim\ p(\mathbf{r})}(\tau) = 2 G_{dif}(\tau) = 2 \frac{1}{\langle N \rangle} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_{dif} \omega_0} \right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_{dif} \omega_0} \left[\frac{\omega_0}{\omega_z} \right]^2 \right)^{-1/2} \quad (6.5)$$

Es decir, la expresión analítica para la función de correlación en el caso en el que la superficie está centrada en el volumen de observación es, a menos de un factor, exactamente la misma expresión que en el caso en el que el volumen de observación está completamente inmerso en la muestra, ec. 2.11. Para otra posición de la superficie la expresión exacta de la función de correlación difusional requiere resolver las integrales de la ec. 2.8 utilizando la expresión 6.4 para la intensidad de fluorescencia colectada.

Capítulo 7

FCS de alta resolución espacial

En este capítulo se presenta una nueva técnica que combina las ventajas de las técnicas de correlación basadas en la fluorescencia con la altísima resolución espacial de las microscopías de campo cercano. Los resultados obtenidos en soluciones $150 \mu\text{M}$ de sonda, demuestran una resolución espacial 10^4 veces aumentada con respecto a las técnicas de FCS tradicionales. En este capítulo se muestran los experimentos y se presenta un modelo detallado de la función de correlación que explica los resultados experimentales. Finalmente para mostrar la factibilidad de un experimento de FCS de alta resolución en células, se muestran experimentos en la membrana de células adherentes de *Xenopus Laevis*.

7.1. Experimentos de FCS de alta resolución en solución

La estrategia que se propone en este trabajo para aumentar la resolución espacial de las técnicas de correlación, se basa en la intensificación y el confinamiento de la radiación incidente alrededor de una NP metálica. Los efectos de intensificación generan dentro del volumen determinado por la detección confocal una región con propiedades ópticas diferentes. Un esquema de la situación planteada en los experimentos se muestra en la Figura 7.1. En esta situación, en el volumen de observación aparecen regiones bien diferenciadas y con propiedades ópticas diferentes. Una región es el volumen determinado por la detección confocal, región 1 en la Figura 7.1, y al que llamaremos, al igual que antes, volumen limitado por difracción, V_{dif} . La otra es la región adyacente a la NP en la dirección de polarización del haz incidente donde el campo local está intensificado, regiones 2 y 3 en la Figura 7.1 y a las que llamaremos volúmenes reducidos, V_{red} . Los experimentos se realizan iluminando a través de un microscopio confocal un cubreobjetos al que se han adherido NPs metálicas de oro. Sobre el cubreobjetos se pone $\sim 50 \mu\text{l}$ de una solución de Rosa de Bengala (Aldrich) $150 \mu\text{M}$ en glicerol (Fluka) 80% en agua. Esta concentración es 10^4 veces superior a las utilizadas en experimentos de FCS convencionales.

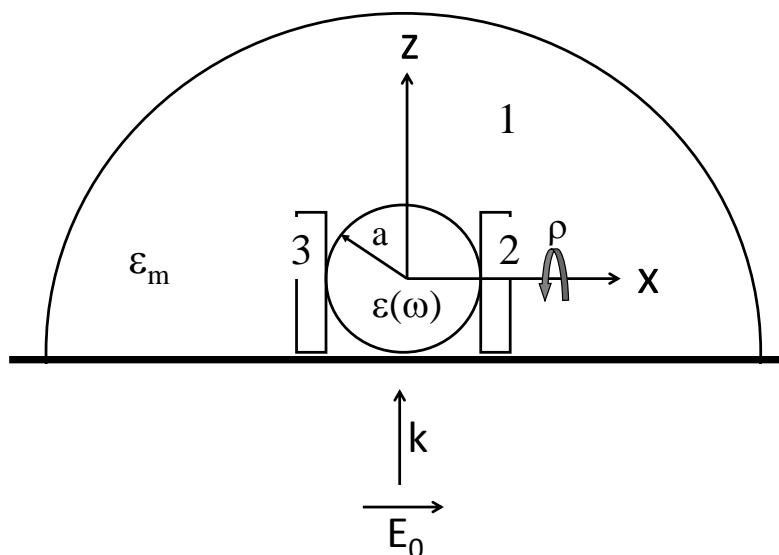


Figura 7.1: Esquema de la configuración experimental para experimentos de FCS de campo cercano. La región 1 es la región determinada por la detección confocal mientras que las regiones 2 y 3 son las originadas por la presencia de la NP.

Para preparar los cubreobjetos se usa el protocolo descrito en la sección 5.4 y las NPs se identifican y caracterizan con los métodos propuestos en la misma sección. Finalmente, se colecta la intensidad de fluorescencia en función del tiempo, enfocando sobre dos sectores del cubreobjetos: iluminando sobre una NP, e iluminando sobre un sector del cubreobjetos sin NPs.

Resultados típicos de estos experimentos se muestran en la Figura 7.2. En ausencia de NPs en el volumen de observación se obtiene para la curva de correlación, la curva en puntos rojos de la Figura 7.2. En este caso, el experimento es equivalente a uno de FCS convencional (solo aparece la región 1 de la Figura 7.1) y, sin embargo, no se observa una curva de correlación. Esto es consecuencia de la alta concentración y de la baja eficiencia de emisión de la solución utilizada. Como la concentración en estos experimentos está varios órdenes de magnitud por encima de las concentraciones permitidas para un experimento de FCS convencional, en este caso no se espera obtener una curva de correlación, que es lo que observa en puntos rojos en la Figura 7.2. Sin embargo, usando exactamente las mismas condiciones de irradiación, pero incidiendo sobre una NP, se obtiene la curva de correlación en puntos negros de la Figura 7.2. Este resultado implica una reducción en el volumen de observación o lo que es equivalente, un aumento en la resolución espacial.

Para hacer un análisis cuantitativo de las funciones de correlación y obtener los tiempos característicos de los procesos involucrados en la fluctuación de la señal, en la siguiente sección se deducen las expresiones para la función de correlación en el caso de una configuración como la propuesta en la Figura 7.1.

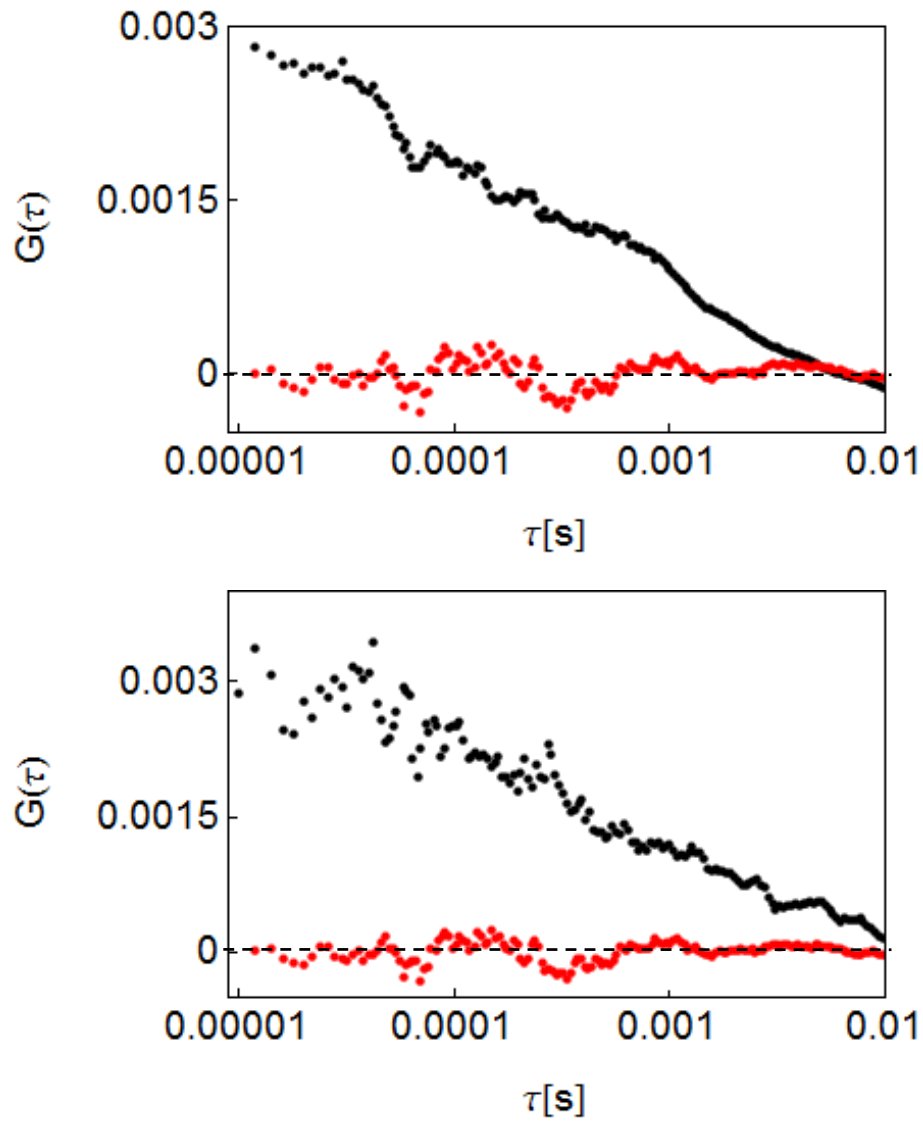


Figura 7.2: Experimentos de FCS de campo cercano sobre una muestra de Rosa de Bengala $C = 150 \mu\text{M}$ en glicerol, sobre un cubreobjetos comercial al que se han adherido NPs de oro de 40 nm de radio nominal. Los paneles (a) y (b) corresponden a dos experimentos en idénticas condiciones.

7.2. Modelo para la función de correlación en experimentos de FCS de alta resolución

En la sección 4.2 se hizo la deducción de la expresión para la función de correlación para un volumen determinado por la superposición de dos distribuciones de intensidad 3D-Gaussiana. Este modelo simplificado de la función de correlación permitió extraer criterios importantes para el diseño del experimento relacionados con el nivel de intensificación y la relación de tamaños entre los dos volúmenes. La simplificación más importante de este modelo radica en aproximar la distribución espacial de la intensidad en las inmediaciones de la NP como un función 3D-Gaussiana. Un modelo para la función de correlación más detallado debe considerar más cuidadosamente el perfil de intensidad de los volúmenes adyacentes a la NP, regiones 2 y 3 de la Figura 7.1, y la cercanía de la superficie del cubreobjetos y de la NP que, como se discutió en el capítulo 6, modifican la libre difusión molecular. La distribución espacial de la intensidad de campo eléctrico en las inmediaciones de una NP metálica ha sido estudiada por varios autores. Si el radio de la NP, a , es pequeño comparado con la longitud de onda del haz incidente, la expresión para la distribución de intensidad alrededor de la NP, se puede encontrar en [Novotny et al. 2007] y está dada por:

$$I_{afuera}(x, \rho) = I_0 + I_0 \left| \frac{\varepsilon(\omega) - \varepsilon_m}{\varepsilon(\omega) + 2\varepsilon_m} \right|^2 \frac{1}{[(x/a)^2 + (\rho/a)^2]^3} \left[4 - 3 \frac{\frac{(\rho/a)^2}{(x/a)^2}}{1 + \frac{(\rho/a)^2}{(x/a)^2}} \right] \quad (7.1)$$

donde $\rho^2 = y^2 + z^2$. La intensidad es máxima cuando la parte real de $\varepsilon(\omega) = -2\varepsilon_m$. Esta condición corresponde a la frecuencia de resonancia de los plasmones superficiales de la NP esférica. En la Figura 7.3 se muestran, en puntos, los perfiles de intensidad en las coordenadas adimensionales x/a y ρ/a , dadas por la expresión 7.1 para el caso de una NP de oro, inmersa en agua y excitada a 540 nm. También se muestra, en línea continua, que los perfiles de intensidad se pueden aproximar en el intervalo de distancias de interés, por una función exponencial en la coordenada x/a y una función gaussiana en la coordenada ρ/a . Es decir, los volúmenes intensificados adyacentes a la NP, regiones 2 y 3, se pueden aproximar por discos de espesor $\sim a/5$ y de radio $\sim a$. Estas aproximaciones de la ec. 7.1, permiten obtener una expresión analítica de la función de correlación en un caso como el presentado en la Figura 7.1.

Al igual que en la sección 4.2, la derivación de la función de correlación se puede hacer siguiendo los pasos desarrollados en el capítulo 2. Teniendo en cuenta las aproximaciones que se muestran en la Figura 7.3, la distribución espacial de la fluorescencia colectada se puede escribir como:

$$p_{total}(\mathbf{r}) = \alpha p_1(\mathbf{r}) + p_2(\mathbf{r}) = \alpha \underbrace{e^{-2(z^2+y^2)/\omega_{01}^2} e^{-x/d}}_{V_{red}} + \underbrace{e^{-2(x^2+y^2)/\omega_{02}^2} e^{-2z^2/\omega_{z2}^2}}_{V_{dif}} \quad (7.2)$$

donde el primer término corresponde a uno de los dos volúmenes reducidos, V_{red} , el segundo término al volumen limitado por difracción, V_{dif} y $\alpha = I_{01}/I_{02}$ es el factor de intensificación en la intensidad luminosa entre los volúmenes. En el caso más general, la expresión para obtener la función de correlación es:

$$G(\tau) = \frac{Q^2 \int_V \int_{V'} p_{total}(\mathbf{r}) p_{total}(\mathbf{r}') \langle C(\mathbf{r}, t) C(\mathbf{r}', t + \tau) \rangle dV dV'}{\left(Q \int_V p_{total}(\mathbf{r}) \langle C(\mathbf{r}, t) \rangle dV \right)^2} \quad (7.3)$$

Como $p_{total}(\mathbf{r})$ es la superposición de dos términos, la función de correlación total tiene cuatro contribuciones,

$$G_{11}(\tau) = \frac{Q^2 \int_V \int_{V'} p_1(\mathbf{r}) p_1(\mathbf{r}') \langle C(\mathbf{r}, t) C(\mathbf{r}', t + \tau) \rangle dV dV'}{\left(Q \int_V p_{total}(\mathbf{r}) \langle C(\mathbf{r}, t) \rangle dV \right)^2} \quad (7.4)$$

$$G_{12}(\tau) = 2\alpha Q^2 \frac{\int_V \int_{V'} p_1(\mathbf{r}) p_2(\mathbf{r}') \langle C(\mathbf{r}, t) C(\mathbf{r}', t + \tau) \rangle dV dV'}{\left(Q \int_V p_{total}(\mathbf{r}) \langle C(\mathbf{r}, t) \rangle dV \right)^2} \quad (7.5)$$

$$G_{21}(\tau) = 2\alpha Q^2 \frac{\int_V \int_{V'} p_2(\mathbf{r}) p_1(\mathbf{r}') \langle C(\mathbf{r}, t) C(\mathbf{r}', t + \tau) \rangle dV dV'}{\left(Q \int_V p_{total}(\mathbf{r}) \langle C(\mathbf{r}, t) \rangle dV \right)^2} \quad (7.6)$$

$$G_{22}(\tau) = 2\alpha^2 Q^2 \frac{\int_V \int_{V'} p_2(\mathbf{r}) p_2(\mathbf{r}') \langle C(\mathbf{r}, t) C(\mathbf{r}', t + \tau) \rangle dV dV'}{\left(Q \int_V p_{total}(\mathbf{r}) \langle C(\mathbf{r}, t) \rangle dV \right)^2} \quad (7.7)$$

donde el factor 2 viene del hecho que,

$$G_{12}(\tau) = G_{13}(\tau) \quad (7.8)$$

$$G_{21}(\tau) = G_{31}(\tau) \quad (7.9)$$

$$G_{22}(\tau) = G_{33}(\tau) \quad (7.10)$$

En la ec. 7.7 se hace la suposición fuerte de que, debido a la presencia de la NP, no hay correlación entre las regiones 2 y 3. Es decir,

$$G_{23}(\tau) = G_{32}(\tau) = 0 \quad (7.11)$$

Finalmente, resolviendo cada una de las cuatro integrales se obtiene la expresión para la función de correlación que, para el caso de moléculas difundiendo a

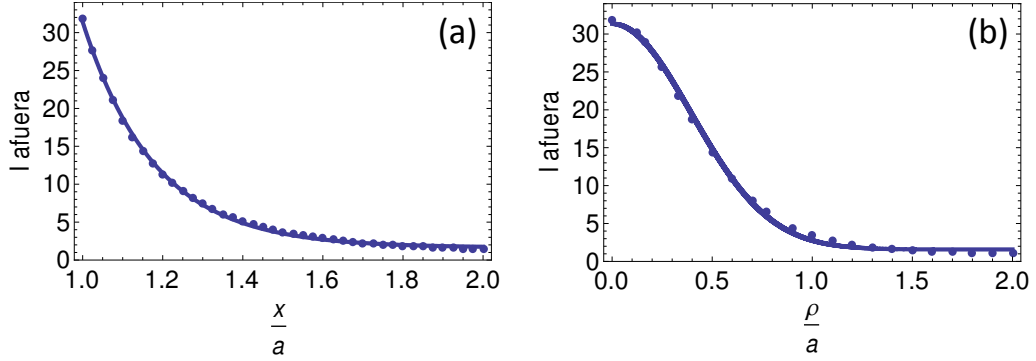


Figura 7.3: Perfil de la distribución de intensidad afuera de una NP de oro normalizada a su radio. Para el cálculo se tomó $\varepsilon(\omega) = -4.64 + i 2.17$ que corresponde a una longitud de onda de excitación de $\lambda_{exc} = 540$ nm y para el medio circundante, $\varepsilon_m = (1.33)^2$. (a): (puntos), calculado para $\rho = 0$ a partir de la ec. 7.1 (línea continua). Del ajuste por una función exponencial se obtiene una distancia característica $d \sim 0.2 a$. (b): (puntos), calculado para $x = a$ a partir de la ec. 7.1 (línea continua). Del ajuste por una función gaussiana se obtiene un tamaño característico $\omega_{01} \sim a$.

través de un esquema como el que se muestra en la Figura 7.1, queda:

$$G(\tau) = \left(\frac{1}{\frac{\langle N_{dif} \rangle}{4\sqrt{2}} + \alpha \langle N_{red} \rangle} \right)^2 (f_0 + f_1 + f_2) \quad (7.12)$$

donde

$$f_0 = \frac{\langle N_{dif} \rangle}{16 \left(\frac{\tau}{\tau_{dif}} + 1 \right) \left(\frac{\tau}{25\tau_{dif}} + 1 \right)^{\frac{1}{2}}} \quad (7.13)$$

$$f_1 = \alpha 2 \langle N_{red} \rangle \frac{\exp \left(\frac{-2a^2}{25\omega_{01}^2 \left(\frac{2\tau}{25\tau_{dif}} + 1 + \frac{\omega_{02}^2}{25\omega_{01}^2} \right)} \right)}{\left(\frac{2\tau}{\tau_{dif}} + 1 + \frac{\omega_{02}^2}{\omega_{01}^2} \right)^{\frac{1}{2}} \left(\frac{2\tau}{25\tau_{dif}} + 1 + \frac{\omega_{02}^2}{25\omega_{01}^2} \right)^{\frac{1}{2}}} \quad (7.14)$$

$$f_2 = \frac{\alpha^2 \langle N_{red} \rangle}{2 \left(\frac{4\tau}{9\tau_{red}} + 1 \right)} \left[\frac{2}{\sqrt{\pi}} \sqrt{\frac{\tau}{\tau_{red}}} + \left(1 - 2 \frac{\tau}{\tau_{red}} \right) e^{-\frac{\tau}{\tau_{red}}} \operatorname{Erfc} \left(\sqrt{\frac{\tau}{\tau_{red}}} \right) \right] \quad (7.15)$$

Al igual que en la expresión 4.2, la ec. 7.12 tiene tres términos. f_0 , es independiente de α y describe la correlación de las moléculas que difunden a través de V_{dif} . f_1 , que es proporcional a α , describe la correlación cruzada entre V_{dif} y V_{red} y viceversa. Es decir, da la probabilidad de hallar a una molécula en V_{red} a $t = \tau$ si se encontraba en V_{dif} a $t = 0$. Por último, f_2 , que es proporcional a α^2 describe la correlación de las moléculas que difunden a través de V_{red} .

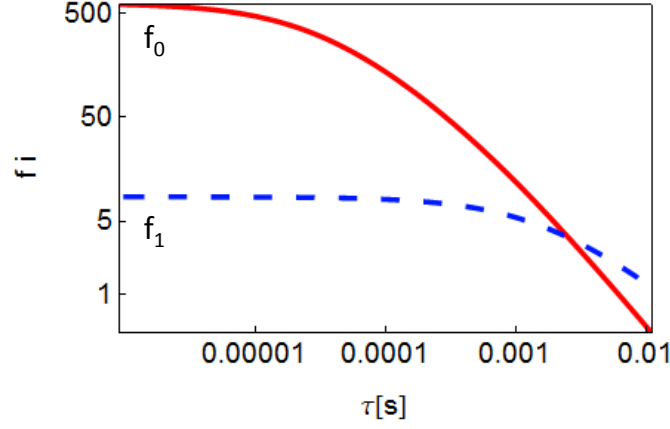


Figura 7.4: Términos f_0 y f_1 (independiente y proporcional a α respectivamente) calculados a partir de 7.15 utilizando los parámetros: $\omega_{01} = 30$ nm, $\omega_{02} = 300$ nm, $\alpha = 100$, $N_{dif} = 10^4$, $N_{red} = 1$ y $\tau_{red} = 30$ μ s.

El modelo propuesto predice que si no hay NPs en el volumen de observación, $\alpha = 0$, el único término que queda de la ec. 7.12 es f_0 . Experimentalmente no se observa correlación en ausencia de NPs, Figura 7.2, y por lo tanto se desprecia este término del modelo. Más aún, para valores realistas de los parámetros, f_1 es menor que f_0 para cualquier valor de t entre los μ s y las decenas de ms en donde ambos factores son del mismo orden, Figura 7.4. Por lo tanto, el término que contribuye mayoritariamente en la ec. 7.12 es f_2 .

Con estas consideraciones la función de correlación para moléculas difundiendo a través de una configuración como la que se esquematiza en la Figura 7.1 se puede escribir como:

$$\begin{aligned} G(\tau) &\sim \frac{32}{\langle N_{dif} \rangle^2} f_2 \\ &= \frac{\beta}{\left(\frac{4\tau}{9\tau_{red}} + 1\right)} \left[\frac{2}{\sqrt{\pi}} \sqrt{\frac{\tau}{\tau_{red}}} + \left(1 - 2\frac{\tau}{\tau_{red}}\right) e^{-\frac{\tau}{\tau_{red}}} \operatorname{Erfc}\left(\sqrt{\frac{\tau}{\tau_{red}}}\right) \right] \end{aligned} \quad (7.16)$$

donde $\langle N_{dif} \rangle$ es el número medio de moléculas en $V_{dif} = \pi^{3/2} \omega_{02}^2 \omega_{z2}$, $\langle N_{red} \rangle$ es el número medio de moléculas en $V_{red} = \pi \omega_{01}^2 d$. El tiempo medio de residencia de las moléculas en V_{red} , τ_{red} , se puede escribir en función del coeficiente de difusión y de la distancia corta en V_{red} como:

$$\tau_{red} = \frac{d^2}{D} \quad (7.17)$$

La expresión obtenida para la función de correlación tiene solamente dos parámetros: una amplitud, $\beta = 16\alpha^2 N_{red} / N_{dif}^2$, que depende del factor de intensificación, α , y de la cantidad de moléculas en V_{red} y en V_{dif} , y un tiempo característico, τ_{red} . Para ganar confianza sobre el modelo propuesto, se verificó que

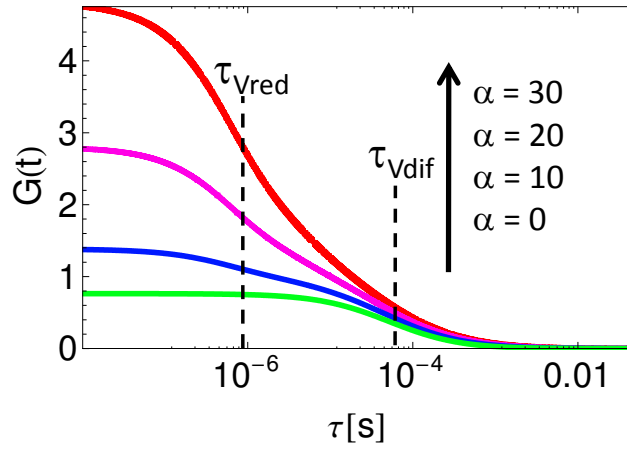


Figura 7.5: Función de correlación correspondiente al modelo detallado, ec. 7.12, en función del factor de intensificación, α . Los parámetros utilizados son: $\omega_{01} = 30$ nm, $d = 140$ nm, para el volumen reducido; y $\omega_{02} = 250$ nm, $\omega_{z2} = 5\omega_{02}$ para el volumen limitado por difracción. $C = 10$ nM, $D = 300 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Con estos parámetros, el volumen reducido es comparable al obtenido en la Figura 4.2. Los tiempos de correlación obtenidos son $0.75 \mu\text{s}$ para el volumen reducido y $50 \mu\text{s}$ para el volumen limitado por difracción.

el modelo detallado para la función de correlación, ec. 7.16, contenga los resultados predichos por el modelo simplificado desarrollado en el capítulo 4, ec. 4.2.

La Figura 7.5 muestra cualitativamente las mismas características que las de la Figura 4.2. Para $\alpha = 0$ la función de correlación es la misma que se obtendría en un experimento de FCS tradicional mientras que para valores de α crecientes se observa un aumento en la resolución espacial de la técnica con un contraste aún mayor que el obtenido a partir de la suposición de dos volúmenes 3D Gaussianos. La elección de los parámetros se hizo de manera que V_{red} calculado como el disco de radio ω_{01} y espesor d , sea del orden de V_{red} calculado como el volumen 3D Gaussiano utilizado en la Figura 4.2.

7.3. Análisis y discusión de los resultados

En la sección anterior se dedujo una expresión para la función de correlación en el caso de moléculas difundiendo a través de una configuración de volúmenes como la esquematizada en la Figura 7.1. En esta sección se la utiliza para analizar cuantitativamente los resultados obtenidos en soluciones de Rosa de Bengala en glicerol 80% en agua.

Para una solución de Rosa de Bengala en glicerol 80% en agua se pueden estimar tiempos de correlación de $65 \mu\text{s}$ y 16 ms para la difusión a través de V_{red} y V_{dif} respectivamente. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, en ausencia de NPs en el volumen de observación no se obtiene una curva de correlación. Es decir, la difusión a través de V_{dif} no contribuye a la curva de correlación. Esto

es consecuencia de la alta concentración y de la baja eficiencia de emisión de la solución utilizada. El modelo que considera un único tiempo difusional, ec. 7.16, no alcanza para explicar los resultados. Todos los experimentos realizados muestran dos tiempos característicos: uno corto, en los μs , y uno largo, en los ms . El tiempo en los μs es consistente con el valor estimado para la difusión a través de V_{red} pero el tiempo en los ms no se puede atribuir a la difusión a través de V_{dif} . Dado que cerca de los volúmenes de observación hay superficies que modifican las funciones de correlación (la superficie del cubreobjetos modifica V_{dif} y la superficie de la NP modifica V_{red}) para introducir un tiempo característico adicional se propuso un modelo similar al utilizado para los experimentos cerca de superficies, ec. 6.3, donde ahora para el término de difusión se utilizó nuestro modelo, ec. 7.16. De este modo la ecuación que describe el comportamiento global queda:

$$G(\tau) = \frac{\beta}{\left(\frac{4\tau}{9\tau_{red}} + 1\right)} \left[\frac{2}{\sqrt{\pi}} \sqrt{\frac{\tau}{\tau_{red}}} + \left(1 - 2\frac{\tau}{\tau_{red}}\right) e^{-\frac{\tau}{\tau_{red}}} \text{Erfc}\left(\sqrt{\frac{\tau}{\tau_{red}}}\right) \right] + G_{0R} e^{-\frac{\tau}{\tau_R}} \quad (7.18)$$

donde los tiempos característicos cortos son consistentes con la difusión a través de V_{red} y los tiempos característicos largos con una interacción de las moléculas con una superficie. La necesidad de incluir un término de asociación-disociación ya había sido observada previamente en los experimentos de la sección 6.2.2. En este caso, por la disposición de V_{red} con respecto a la superficie del cubreobjetos, creemos que la interacción que se observa corresponde a la interacción de las moléculas con la superficie de la NP.

Este resultado muestra que el esquema propuesto permite no sólo estudiar procesos de difusión sino mecanismos de interacción con una resolución en el eje de polarización del campo incidente del orden de $\lambda/70$. La Figura 7.6 muestra algunos resultados típicos de los experimentos en soluciones de Rosa de Bengala 150 μM en glicerol 80 % en agua. Experimentos consecutivos en idénticas condiciones muestran una muy buena reproducibilidad de los resultados. Las contribuciones a la función de correlación total de cada proceso por separado, también se muestran en la Figura. En la columna derecha se incluyen los residuos del ajuste. Los parámetros obtenidos de los ajustes se resumen en la Tabla 7.1.

Con los experimentos de calibración realizados en la sección 3.4.1, se midió un V_{dif} de 0.4 fl. Por otra parte, para una NP de 40 nm de radio, los ajustes de la Figura 7.3 predicen un V_{red} que se puede aproximar por un disco de ~ 30 nm de radio y 8 nm de espesor. Es decir que el volumen reducido es 10^4 veces más chico que el volumen de detección confocal. Con este resultado, es razonable plantear que en V_{dif} hay alrededor de 10000 moléculas más que en V_{red} . Es decir, $\langle N_{dif} \rangle = 10^4 \langle N_{red} \rangle$. Luego, para determinar el valor de la intensificación de la intensidad de campo alcanzada en estos experimentos se usa el valor de la amplitud del término difusivo, β , Tabla 7.1. En todos los casos analizados β es siempre del mismo orden. Suponiendo una relación $\langle N_{dif} \rangle = 10^4 \langle N_{red} \rangle$ se obtiene una intensificación en la intensidad de alrededor de 100, valor que está en completo acuerdo con antecedentes teóricos [Novotny et al. 2007].

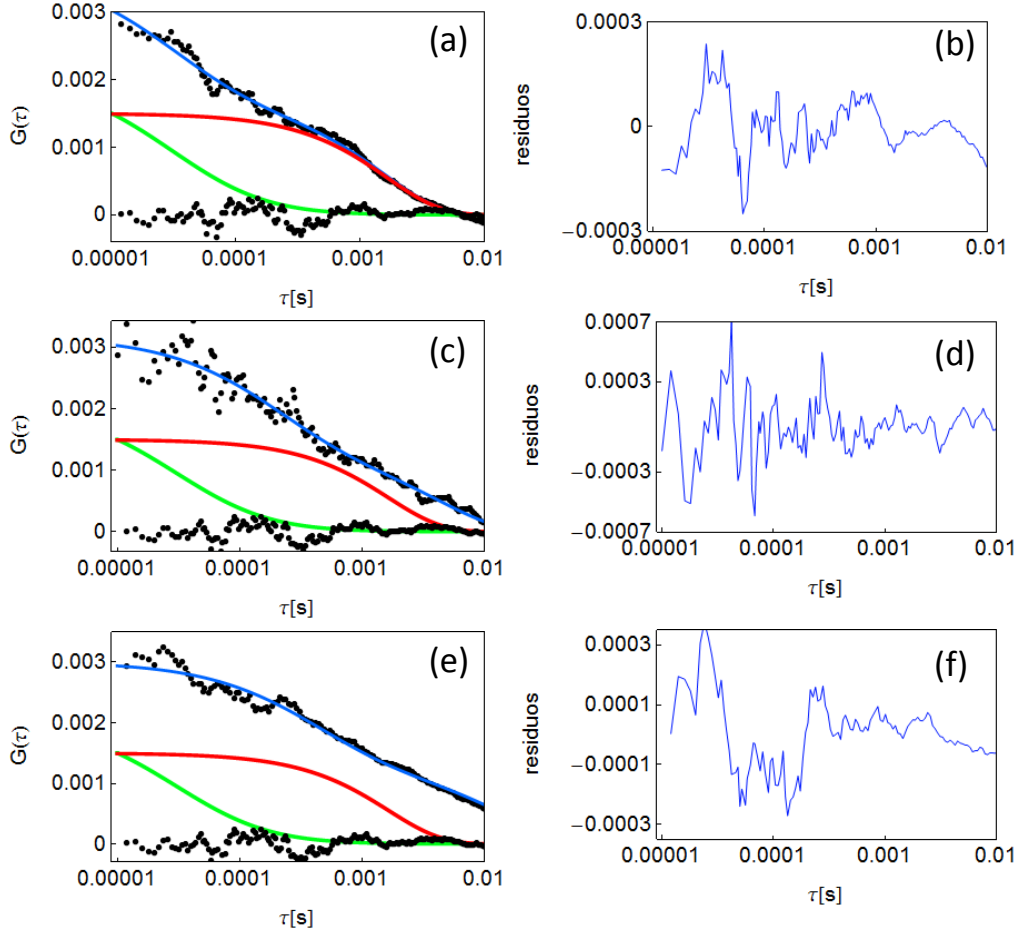


Figura 7.6: (izq.): Resultados de experimentos de FCS de campo cercano sobre una muestra de Rosa de Bengala $150 \mu\text{M}$ en glicerol 80% en agua. En línea continua se incluyen los ajustes por el modelo completo propuesto en la ec. 7.18 y las contribuciones por separado del término difusional (en verde) y del término de reacción (en rojo). (der.): Residuos del ajuste por el modelo de la ec. 7.18.

Experimento	β	G_{0R}	$\tau_{red} [\mu\text{s}]$	$\tau_R [\text{ms}]$
Figura 7.6(a, b)	0.0021	0.0015	27	1.6
Figura 7.6(c, d)	0.0021	0.0010	180	5
Figura 7.6(e, f)	0.0019	0.0011	380	16

Tabla 7.1: Parámetros obtenidos a partir de los ajustes de los datos experimentales por el modelo descrito en la ec. 7.18.

τ_{red} (Fijo)	β	G_{0R}	τ_R [ms]
27 [μ s]	0.0021	0.0015	1.6
50 [μ s]	0.0018	0.0014	1.8
100 [μ s]	0.0017	0.0012	2

Tabla 7.2: Parámetros obtenidos a partir de los ajustes de los datos experimentales por el modelo descrito en la ec. 7.18 para valores del parámetro τ_{red} fijos e iguales a los indicados en la Tabla.

El parámetro que presenta la mayor dispersión en los resultados obtenidos es τ_{red} que está relacionado a través de la ec. 7.17 con el coeficiente de difusión y con d . Un cambio en τ_{red} de un factor 10, corresponde con una variación en un factor 3 del valor de d , o un factor 10 en el valor del coeficiente de difusión. Para estimar un error al parámetro τ_{red} , en la Figura 7.7 se muestran los datos de la Figura 7.6(a) ajustados por el modelo descrito en la ec. 7.18 y valores de τ_{red} fijos, (desde 27 μ s para el caso (a), hasta 100 μ s para el caso (c)). De la Figura 7.7 se infiere que el nivel de ruido en la curva de correlación no permite distinguir claramente entre el ajuste para $\tau_{red} = 27 \mu$ s y $\tau_{red} = 100 \mu$ s y, por lo tanto, determina la sensibilidad del ajuste. Los valores obtenidos para el resto de los parámetros se resumen en la Tabla 7.2.

A pesar de la variación en los valores recuperados para el parámetro τ_{red} , los valores de D para la solución de Rosa de Bengala en glicerol 80% en agua calculados a partir de la ec. 7.17 con el tiempo τ_{red} medido y el valor de d predicho por la Figura 7.3, son $D = 2.4 \mu\text{m}^2/\text{s}$ y $D = 0.2 \mu\text{m}^2/\text{s}$ para el valor de τ_{red} mínimo y máximo respectivamente. Estos valores son del orden de $D = 5 \mu\text{m}^2/\text{s}$ que es el valor que predice la ecuación de Stokes-Einstein, ec. 3.3, teniendo en cuenta una viscosidad para el glicerol 80% en agua a 25°C de 45.9 mPa.s [Lide et al. 1992].

7.4. Estudio de la factibilidad de un experimento de FCS de alta resolución en células vivas

7.4.1. Descripción general

Las proteínas integrales de membrana actúan como sistema de transporte para conducir distintas moléculas a través de la membrana celular. Estas proteínas son flexibles y pueden adquirir diversas conformaciones. Se cree que la función específica de estos transportadores de moléculas se acciona a partir de una secuencia de cambios conformacionales. Para observar estos cambios conformacionales es necesario estudiar una única proteína a la vez, y para observar una única proteína es indispensable una técnica de alta resolución espacial [Lippincott-Schwartz et al. 2001]. Está fuera del alcance de esta Tesis el estudio detallado de la dinámica de las proteínas integrales de membrana, sin embargo es un ejemplo concreto que ilus-

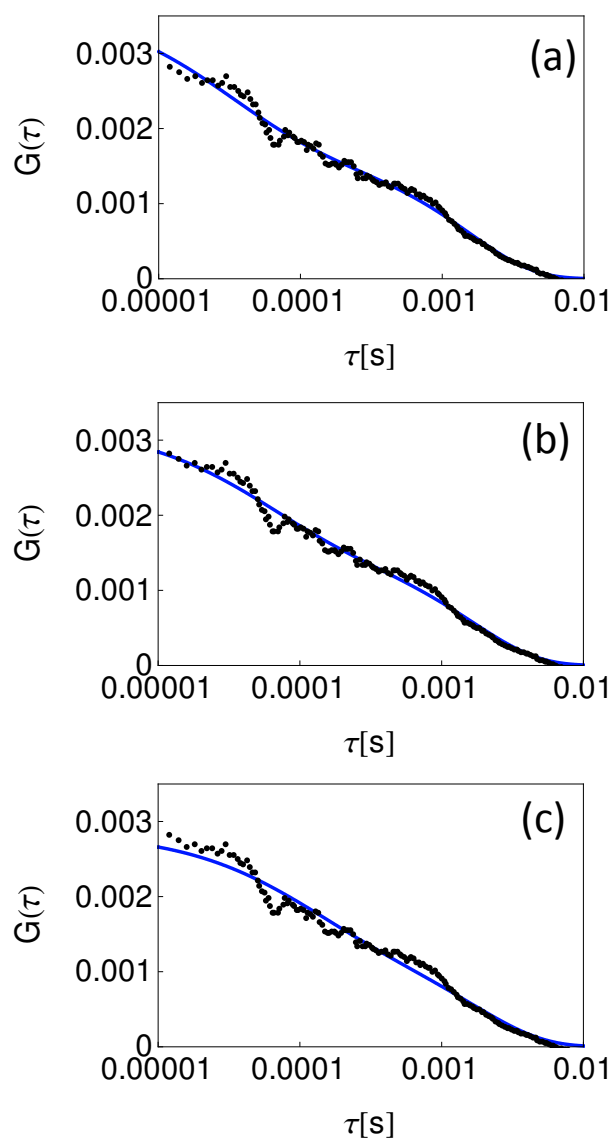


Figura 7.7: Datos mostrados en la Figura 7.6(a) ajustados con valores de τ_{red} fijos. (a): $\tau_{red} = 27 \mu\text{s}$, (b): $\tau_{red} = 50 \mu\text{s}$, (c): $\tau_{red} = 100 \mu\text{s}$. Las variaciones en el ajuste no permiten distinguir los diferentes τ_{red} .

tra una posible aplicación de la Espectroscopía de Correlación de alta resolución propuesta en este trabajo. Por esta razón, sin aspiraciones de hacer un estudio completamente cerrado, en esta sección se hacen experimentos en la membrana de células adherentes de un tipo de rana acuática sudafricana, *Xenopus laevis*.

7.4.2. Cultivo celular

El cultivo de las células se realiza en cápsulas de Petri de 25 cm² de área de crecimiento y 50 ml de capacidad. Debido a que este tipo de células necesitan adherirse a una superficie para sobrevivir y reproducirse, las cápsulas están modificadas para favorecer su adherencia [Corning]. Luego, se les coloca 5 ml de medio de cultivo que les provee los nutrientes esenciales, vitaminas, sustratos metabólicos, aminoácidos, iones inorgánicos y factores de crecimiento necesarios para la función celular [Mc Ateer et al. 1994]. La preparación del medio depende de la línea celular, en este caso se prepara con 0.7 g/l de L-15, 0.29 g/l de glutamina y 5mg/l de insulina. Se modifica el pH con HCl hasta llevarlo a 7.2. Luego se agrega 1 ml de Pen-Strep (Penicilina y Estreptomocina) por litro de solución y se suplementa con 40 ml de suero fetal bovino [Daniolos et al. 1990]. Finalmente, las células se incuban a 27°C en una incubadora de cultivo durante una semana aproximadamente [Brunstein 2008].

La mayoría de las líneas celulares muestran una disminución de la proliferación si la densidad de población aumenta significativamente [Mc Ateer et al. 1994]. Para evitarlo, se mantiene la densidad en alrededor del 50 % de confluencia. Para regular esto, se usa tripsina. La tripsina es una enzima que rompe los enlaces peptídicos de las proteínas, en este caso entre la célula y el sustrato, esto hace que las células se despeguen de la superficie de la cápsula de Petri fácilmente, y así se puede retirar una proporción de las células. La manipulación y los tratamientos se realizan dentro de una campana de flujo laminar para evitar la contaminación del cultivo.

Para las mediciones de FCS de alta resolución que se muestran en este capítulo se incubaron las células sobre cubreobjetos de una pulgada de diámetro con NPs adheridas. Los cubreobjetos se depositan dentro de una cápsula de Petri con ~ 2 ml de medio de cultivo. Antes de medir, el cubreobjetos se monta en una cámara diseñada para mediciones de microscopía.

7.4.3. Experimento de FCS de alta resolución en células vivas

Para probar la aplicabilidad de la técnica en células vivas, se realizaron experimentos en 5 células de *Xenopus laevis* preparadas en exactamente las mismas condiciones. Cada medición consiste en más de $8 \cdot 10^6$ intervalos temporales de 2 μ s cada uno, que se analizaron en segmentos de 32000 intervalos, lo que da alrededor de 200 correlaciones por experimento. En la Figura 7.8 se muestran los resultados de un experimento típico tomado con el microscopio Olympus FV1000.

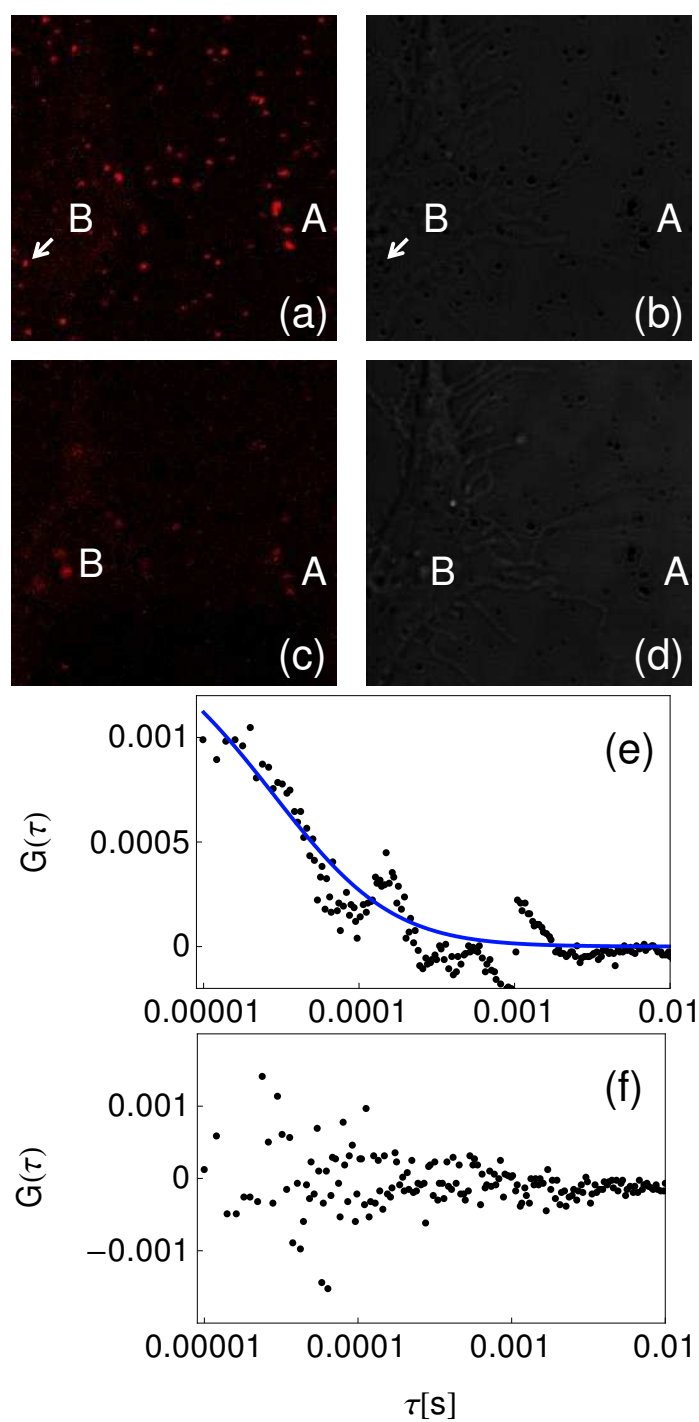


Figura 7.8: Experimento de FCS de alta resolución sobre células vivas de *Xenopus laevis*. (a, b): Imágenes de fluorescencia y transmisión adquiridas simultáneamente excitando a 543 nm. (c, d): Imágenes de fluorescencia y transmisión adquiridas simultáneamente excitando a 488 nm. (e): Curva de correlación tomada sobre una NP cubierta por la membrana celular. Los valores del ajuste en este experimento son: $\beta = 0.0016$ y $\tau_{red} = 25 \mu\text{s}$ (f): Curva de correlación en una zona de la membrana sin NP.

Las imágenes de la izquierda, son imágenes de fluorescencia adquiridas excitando en resonancia (543 nm) y fuera de la resonancia (488 nm) del plasmón de las NPs, Figuras 7.8(a y c) respectivamente. Las imágenes de la derecha, adquiridas simultáneamente con las de fluorescencia, son las correspondientes imágenes de transmisión, Figuras 7.8(b y d). Las características generales de este resultado pueden explicarse con el mismo análisis realizado para los experimentos en solución.

En las imágenes de fluorescencia se pueden ver puntos que aparecen brillantes en la imagen tomada a 543 nm pero no aparecen en la imagen tomada a 488 nm. Como se mostró en los experimentos de la sección 5.4, estos puntos corresponden a zonas localizadas de alta intensificación de la fluorescencia como consecuencia de la excitación resonante de una NP. Hay otros puntos, marcados como A, que aparecen brillantes en ambas imágenes de fluorescencia y que se pueden atribuir a grandes agregados de NPs. Finalmente, hay puntos para los cuales la imagen de fluorescencia a 488 nm aparece brillante y en 543 nm aparece oscura. Estos puntos, marcados como B, probablemente se deban a una contaminación del sustrato como se describió en la sección 5.4.

El resultado de uno de los experimentos de correlación de alta resolución también se muestra, en puntos, en la Figura 7.8. En este caso el experimento fue realizado sobre la NP marcada con la flecha y sobre una región dentro de la célula sin NPs, Figura 7.8(e y f) respectivamente. La línea llena corresponde al ajuste del experimento por nuestro modelo difusivo, ec. 7.16.

En este punto es importante remarcar dos cosas. Motivados por la gran intensificación obtenida en los experimentos para Rosa de Bengala en solución cuya eficiencia de fluorescencia es de solo el 2%, en este experimento no se marcó externamente ningún componente de la célula. Es decir, la altísima emisión obtenida en la Figura 7.8(a) corresponde a la intensificación de la fluorescencia de alguna especie débilmente fluorescente, probablemente asociada al medio de cultivo. Por otra parte, el ajuste de los datos se hizo con un modelo que tiene en cuenta únicamente un componente difusivo. Hay antecedentes en la literatura de experimentos en células adherentes sobre sustratos con agujeros de tamaño nanométrico [Wenger et al. 2007]. Wenger y colaboradores proponen que en ese caso la célula se adhiere perfectamente a la superficie del sustrato tomando la forma del agujero, como se esquematiza en la Figura 7.9.

Haciendo la misma suposición y recordando que el volumen intensificado medido a partir de los experimentos en solución se puede aproximar por un disco de alrededor de 30 nm de radio y 8 nm de espesor, sección 7.3, es razonable postular que el volumen analizado en el experimento de la Figura 7.8(e) corresponde a una región sobre la membrana celular en la dirección de polarización del campo incidente de alrededor de 60 nm de sección ($\lambda/9$) y espesor 8 nm ($\lambda/70$). Esta hipótesis se puede sustentar esencialmente por dos hechos: los coeficientes de difusión obtenidos a partir de los tiempos característicos medidos, $D \sim 0.1 - 1 \mu\text{m}^2/\text{s}$, se corresponden con los obtenidos para lípidos y proteínas integrales de membrana [Lippincott-Schwartz et al. 2001, Krichevsky et al. 2002]. Además, el hecho de

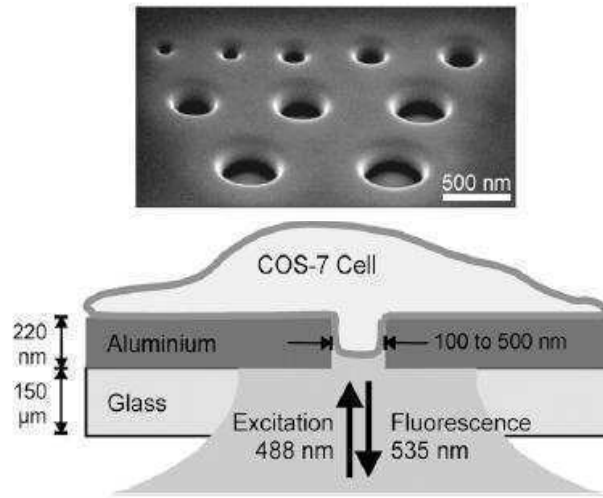


Figura 7.9: Esquema de un experimento en donde una célula adherente toma la forma de un nanoagujero. Figura tomada de la referencia [Wenger et al. 2007].

que no haya sido necesario incluir en el modelo el término de asociación-disociación que fue incluido previamente en los experimentos en solución, sugiere que no se trata de una difusión libre.

Finalmente, las curvas de correlación para el esquema intensificado y sin intensificar, Figuras 7.8(e y f) respectivamente, son claramente diferentes. Aunque a partir de este único experimento, no se puede explicar el origen de la correlación medida en la Figura 7.8(e), este resultado permite demostrar que un experimento de FCS de alta resolución como el propuesto en esta Tesis es posible de aplicar en células vivas, dejando al estudio específico de la dinámica de las proteínas integrales de membrana como tema para futuros trabajos.

Conclusiones

En esta Tesis se propuso e implementó una nueva técnica que combina las ventajas de la Espectroscopía de Correlación de la Fluorescencia, FCS, con la altísima resolución espacial de las microscopías de campo cercano. El principio de funcionamiento de la *Espectroscopía de Correlación de Campo Cercano* se basa en la intensificación del campo electromagnético en la proximidad de una nanopartícula metálica, NP. La región del espacio intensificada actúa como un nuevo volumen de observación, cuya resolución lateral y axial se pueden controlar a partir del tamaño, la forma y el material de la NP.

- Para NPs esféricas de oro de 40 nm de radio, se demostró una resolución espacial del orden de $\lambda/70$ y $\lambda/9$ en las direcciones de polarización y de propagación del haz incidente respectivamente. Este dramático aumento de la resolución espacial con respecto a los esquemas tradicionales de FCS, (cuyas resoluciones son de alrededor de $\lambda/2$ y 6λ en las direcciones de polarización y de propagación del haz incidente) permitió estudiar soluciones a concentraciones 10000 veces más alta que la concentración límite para un experimento de FCS tradicional. Además, a partir de un experimento sencillo, se mostró que es posible extender el uso de la Espectroscopía de Correlación de Campo Cercano al estudio de células vivas.
- Se desarrolló un modelo para la función de correlación difusional, para el caso en el que el campo de radiación es superposición del campo habitual de microscopía confocal más el campo realizado. El modelo permitió encontrar las condiciones experimentales más favorables. Es decir, las condiciones que permiten implementar fácilmente el experimento y que dan valores de intensificación suficientemente altos como para observar un aumento significativo de la resolución espacial. Además, el modelo permitió explicar satisfactoriamente los resultados obtenidos experimentalmente.
- Se estudió el efecto que una superficie cercana al volumen de observación tiene sobre las curvas de correlación. Se mostró que este efecto puede ser utilizado para caracterizar, de manera no invasiva, superficies transparentes con una resolución espacial del orden del tamaño del volumen de observación.
- Se construyó un microscopio confocal con sensibilidad para detectar la emisión de, en promedio, una única molécula en el volumen de observación. Este

instrumento se utilizó para hacer experimentos de FCS, fuera del intervalo de operación del microscopio confocal comercial disponible en el Departamento de Física.

- Se desarrollaron los métodos para depositar las NPs sobre sustratos de vidrio y se mostró que, a pesar del tamaño de las NPs, éstas se pueden identificar a partir de dos imágenes ópticas: una tomada en resonancia y la otra fuera de la resonancia del plasmón de la NP.
- Se hizo un estudio exhaustivo sobre los mecanismos por los cuales la interacción NP-molécula, modifica la emisión fluorescente de la molécula. Se mostró que una molécula de baja eficiencia de fluorescencia acoplada correctamente con el plasmón de la superficie metálica, aumenta significativamente su emisión fluorescente, dando lugar a sondas más brillantes. Al mismo tiempo, debido a la reducción en el tiempo de vida media de la molécula, (que surge por la aparición de un canal de decaimiento no radiativo adicional altamente eficiente) los canales de fotoblanqueo por absorción desde estados excitados se reducen considerablemente, dando lugar a sondas de mayor durabilidad. Como consecuencia de este análisis, se avanzó en el diseño de nuevas sondas fluorescentes basadas en sistemas híbridos que combinan NPs metálicas con sondas fluorescentes.

Perspectivas

Los resultados de los experimentos de FCS intensificado presentados en esta Tesis, abren numerosas posibilidades en el campo de la biofísica y de las ciencias de los materiales. El trabajo de Levene y colaboradores publicado en Science [Levene et al. 2003] generó mucho entusiasmo en la comunidad de biofísicos, por la posibilidad de estudiar procesos a nivel de moléculas individuales sin necesidad de diluir la muestra. Sin embargo, el esquema propuesto por Levene está limitado al estudio de la región adyacente al sustrato y, por lo tanto, no se puede utilizar para estudiar regiones específicas en el interior de una célula.

El esquema propuesto en esta Tesis permitió obtener resultados a concentraciones $150 \mu\text{M}$ de sonda. El uso de NPs brinda una posibilidad adicional a los experimentos: la funcionalización adecuada de la superficie de la NP permite explorar su localización específica. El gran realzamiento del brillo y el contraste mayor de las especies emisoras de bajo rendimiento cuántico también permiten alentar la perspectiva de usar la emisión intrínseca de los sistemas, tal como se insinúa en los experimentos realizados en células. Esto permitiría examinar casi cualquier región dentro de la célula con resolución nanométrica. En el área de los materiales, la posibilidad de utilizar las curvas de correlación para sensar propiedades de superficies transparentes es una técnica prometedora.

Con respecto al estudio de las propiedades de las sondas fluorescentes acopladas a NPs metálicas, el laboratorio ha incorporado recientemente al Dr. en Cs. Químicas Martín Mirenda, quien dirigido por el Dr. Alejandro Wolosiuk de la

Comisión Nacional de Energía Atómica están probando estrategias para la fabricación de los sistemas híbridos propuestos en esta Tesis. En el mismo sentido, la Dra. en Cs. Químicas María Julia Roberti está trabajando con el Dr. Pedro Aramendía en el acoplamiento de las NPs y las moléculas usando porciones de DNA de tamaño variable. Con este experimento se espera poder controlar la separación NP-molécula y así poder fabricar sistemas híbridos con características específicas. Estos sistemas híbridos permitirían, por ejemplo, experimentos de seguimiento de partículas por períodos de tiempo muy prolongados.

Apéndice A

Código en MatLab para calcular la función de correlación

```
function []=CorrFCS();
%-----Parámetros de adquisición-----%
dt=1e-6;    % tiempo de integración
% ch1, ch2 son vectores filas
%-----%
close;

tic
% cargo los datos del canal 1
load C:\Laura\mediciones\julio\24\p35uW1.txt
ch1=p35uW1;

% plot (ch1)
% ylabel ('cantidad fotones/tiempo de integracion')
% xlabel ('tiempo de integración')
% title ('canal 1')
% pause

% cargo los datos del canal 2
load C:\Laura\mediciones\julio\24\p35uW2.txt
ch2=p35uW2;

% plot (ch2)
% ylabel ('cantidad fotones/tiempo de integracion')
% xlabel ('tiempo de integración')
% title ('canal 2')
```

```

% pause

% convierto los datos en vectores columna
d1=ch1';
d2=ch2';
clear ch1;
clear ch2;

[d11,aux]=size (d1);

% genero las matrices donde voy a guardar los datos
todas=zeros (d11,1);
Gprom=zeros (d11,2);

% -----CALCULO LA CORRELACION-----
% calculo las coordenadas "x"
tverd=[0:d11-1]*dt;
tverd=tverd';

% calculo las coordenadas "y"
Gaux=abs (ifft (fft (d1).*conj (fft (d2)))); % uso teorema de
% Wiener-Khinchin que relaciona la
% correlación con la FFT
G=Gaux/d11/mean(d1)/mean(d2)-1; % normalizo la correlación
%-----

% grafico la correlación
semilogx (tverd,G), grid on
xlabel ('{\tau} (seg)')
ylabel ('G ({\tau})')
pause

todas (:,1)=G;
prom=mean (todas,2);

% guardo los datos para levantarlos con Origin
Gprom (:,1)=tverd;
Gprom (:,2)=prom;
save todas.txt todas -ascii;
save Gprom.txt Gprom -ascii;

% genero mi array de tiempos equiespaciados logaritmicamente
% logspace (a,b,n) genera n numeros entre 10^a y 10^b

```

```

% tlog=logspace (0,log10 (d11-1),D*log10 (d11-1))
% escrito así genera D numeros entre 1 y n

tlog=logspace (-7,1,8*log10 (d11-1));
tlog=tlog';
[ttlog,aux]=size (tlog);

% genero el vector donde voy a guardar los datos log espaciados
esplog=zeros (ttlog,2);

xavg=zeros (ttlog,1);
yavg=zeros (ttlog,1);

i=1;
while length (find (tlog (i)<tverd & tlog (i+1)>tverd))<2;
    xavg (i)=tverd (i);
    yavg (i)=prom (i);
    i=i+1;
end

while i<length (tlog)
    h=find (tlog (i)<tverd & tlog (i+1)>tverd);

    xavg (i)=tlog (i)/2+tlog (i+1)/2;
    % xavg (i)=(tlog (i+1)-tlog (i))/2;
    yavg (i)=mean (prom (h));
    i=i+1;
end

% guardo los datos espaciados logaritmicamente
esplog (:,1)=xavg;
esplog (:,2)=yavg;
save esplog35uW.txt esplog -ascii;

semilogx (xavg,yavg,'*'), grid on
xlabel ('\tau (seg)')
ylabel ('Gprom ({\tau})')

% guardo los datos para levantarlos con SimFCS
xavg=xavg';
yavg=yavg';

Gprom_SimFCS _tmr18nMb = [xavg; yavg];
fid = fopen ('Gprom_SimFCS _tmr18nMb.txt','wt');

```

```
fprintf (fid, '% .6f % .6f \n', Gprom_SimFCS _tmr18nMb);  
fclose (fid);  
toc
```

Apéndice B

Cálculo de la variación de temperatura por la presencia de una NP

En esta Tesis se presentaron experimentos basados en el fuerte confinamiento del campo electromagnético alrededor de una nanopartícula metálica. Otra característica de las NP excitadas resonantemente es que se calientan y, por ende, calientan el entorno. Para estimar el cambio de la temperatura en la superficie de la NP, en este Apéndice se resuelve la ecuación de difusión del calor en el caso estacionario, $\nabla^2 T = 0$ para calcular el aumento de la temperatura en la superficie de la nanopartícula y su dependencia con la distancia a la superficie.

La ecuación que describe la conducción térmica es la ley de Fourier. La ley de Fourier afirma que la relación entre el flujo de energía, J , y el gradiente de temperatura, $\Delta T/\Delta r$, se puede escribir como:

$$\kappa^{solv} \frac{\Delta T}{\Delta r} = J \quad (\text{B.1})$$

donde κ^{solv} es una constante característica del medio denominada conductividad térmica del solvente y ΔT es la variación de temperatura en la superficie de la NP. En el caso de interés, el flujo de energía se puede expresar en términos de la intensidad de luz y la sección eficaz de absorción. De este modo la ley de Fourier se puede escribir como:

$$\kappa^{solv} \frac{\Delta T}{\Delta r} = \frac{I_{abs} \sigma_{abs}}{A_{sup}} \quad (\text{B.2})$$

donde I_{abs} es la intensidad absorbida por la NP, σ_{abs} la sección eficaz de absorción y A_{sup} la superficie en \mathbf{R}^3 que encierra el volumen de la NP.

Escribiendo la intensidad absorbida por la NP en función de los parámetros de la radiación incidente la ec. B.1 se puede escribir como:

$$\kappa^{solv} \frac{\Delta T}{\Delta r} = \frac{P_{inc} \sigma_{abs}}{A_{sup}} \quad (\text{B.3})$$

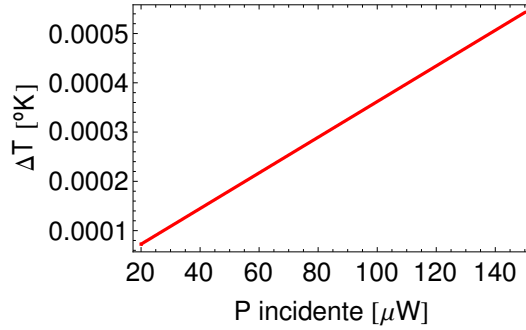


Figura B.1: Variación de la temperatura en la superficie de una NP esférica de oro de $a = 40$ nm inmersa en glicerol con la potencia incidente calculada a partir de la ec. B.4. Para $100 \mu\text{W}$ de potencia incidente el aumento de temperatura en la superficie es del orden de solo $10 \mu\text{K}$.

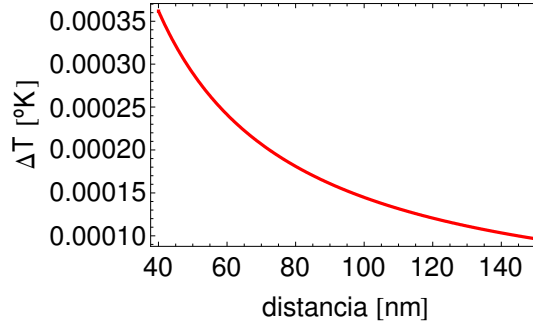


Figura B.2: Variación de la temperatura con la distancia a la superficie de una NP esférica de oro de $a = 40$ nm inmersa en glicerol. A 20 nm de la superficie de la NP la temperatura disminuye un 35% aproximadamente.

donde P_{inc} es la potencia incidente y $A_{inc} = \pi (250 \cdot 10^{-9} \text{m})^2$ es el area de la región enfocada por el láser. Luego, a partir de la ec. B.3 se puede despejar la variación de la temperatura en la superficie de la NP ($\Delta r = a$),

$$\Delta T = \frac{P_{inc} \sigma_{abs}}{4\pi a \kappa_{solv} A_{inc}} \quad (\text{B.4})$$

La Figura B.1 muestra cuánto se eleva la temperatura en la superficie de una partícula de oro de 40 nm de radio ($\sigma_{abs} = 10^{-19} \text{m}^2$) inmersa en glicerol ($\kappa = 0.28 \text{Wm}^{-1}\text{K}^{-1}$) en función de la potencia incidente enfocada en un spot de 250 nm de radio.

La Figura B.2 muestra la variación de la temperatura con la distancia a la superficie de la NP considerando una potencia incidente de $100 \mu\text{W}$ que es del orden de la utilizada en los experimentos realizados en esta Tesis. La temperatura disminuye un 35% a 20 nm de la superficie de la NP.

Los resultados obtenidos muestran un aumento marginal de la temperatura en la superficie de la NP. Por esta razón en este trabajo se despreciaron efectos relacionados a un calentamiento de la región intensificada con respecto a la no intensificada.

Apéndice C

Glosario de términos y símbolos

símbolo	descripción	1ra. cita
fl	femtolitro, (10^{-15} litros). $1 \text{ fl} = 1 \mu\text{m}^3$	Cap. 2
$\tilde{G}(\tau)$	función de correlación según la definición 2.1.	Cap. 2
$G(\tau)$	término temporal de la función de correlación, $\tilde{G}(\tau)$.	Cap. 2
τ	desfasaje temporal.	Cap. 2
$I(t)$	intensidad a tiempo t .	Cap. 2
ΔT	intervalo de conteo de fotones.	Cap. 2
η	eficiencia total de colección.	Cap. 2
K	eficiencia de detección del microscopio.	Cap. 2
σ_{abs}	sección eficaz de absorción de las moléculas.	Cap. 2
ϕ	eficiencia cuántica de fluorescencia de las moléculas.	Cap. 2
$\text{PSF}(\mathbf{r})$	respuesta óptica del microscopio para un objeto puntual.	Cap. 2
I_0	valor máximo de la intensidad colectada.	Cap. 2
$C(\mathbf{r}, t)$	concentración de moléculas en la posición \mathbf{r} a tiempo t .	Cap. 2
p_{norm}	distribución espacial normalizada de la fluorescencia colectada según la definición 2.5.	Cap. 2
ω_0, ω_z	semiejes de un volumen de observación 3D Gaussiano. Distancias en la dirección lateral y axial en las cuales la intensidad colectada cae a un valor $1/e^2$ del valor máximo.	Cap. 2
$Q = K \sigma_{abs} \phi I_0$	cantidad de fotones detectados por molécula por segundo.	Cap. 2
$g(\mathbf{r}, \mathbf{r}', \tau)$	término que tiene en cuenta el origen de las fluctuaciones de la señal de fluorescencia.	Cap. 2
D	coeficiente de difusión de las moléculas.	Cap. 2
V_{obs}	volumen de observación.	Cap. 2
$\tau_c = \frac{\omega_0^2}{4D}$	tiempo característico para la difusión a través de un volumen 3D Gaussiano.	Cap. 2
$\tau_c^{dif} = \tau_c$	tiempo característico para la difusión a través de un volumen 3D Gaussiano.	Cap. 2
G_{0R}	amplitud de la función de correlación para un proceso de reacción.	Cap. 2

símbolo	descripción	1ra. cita
τ_R o $\tau_c^{reaccion}$	tiempo característico de la función de correlación para un proceso de reacción.	Cap. 2
S/R	relación señal-ruido.	Cap. 2
m	número total de intervalos ΔT medidos durante un experimento.	Cap. 2
$G_0 = G(\tau = 0)$	amplitud de la función de correlación para un proceso general.	Cap. 2
I_{fondo}	intensidad de fondo colectada.	Cap. 2
NA	apertura numérica del objetivo.	Cap. 3
k	constante de Boltzman.	Cap. 3
T	temperatura.	Cap. 3
η_s	viscosidad de la solución.	Cap. 3
R_h	radio hidrodinámico de la molécula.	Cap. 3
P	peso de las moléculas.	Cap. 3
ρ	densidad de una proteína.	Cap. 3
V_{dif}	volumen limitado por difracción.	Cap. 4
V_{red}	volumen reducido que aparece como consecuencia de la interacción resonante de la radiación incidente con la nanoestructura metálica.	Cap. 4
$\alpha = I_{01}/I_{02}$	factor de intensificación en la intensidad entre los volúmenes V_{red} y V_{dif} .	Cap. 4
$M = V_{dif}/V_{red}$	relación de aspecto entre los volúmenes V_{red} y V_{dif} .	Cap. 4
ϕ^0	eficiencia cuántica de fluorescencia de la molécula en ausencia de NPs	Cap. 5
ϕ	eficiencia cuántica de fluorescencia de la molécula en presencia de NPs	Cap. 5
$\epsilon(\omega, \zeta)$	función dieléctrica compleja que tiene en cuenta efectos del tamaño de la NP.	Cap. 5

símbolo	descripción	1ra. cita
$\varepsilon(\omega)$	constante dieléctrica del material en volumen.	Cap. 5
ε_m	constante dieléctrica del medio.	Cap. 5
a	radio de la NP esférica.	Cap. 5
$\alpha(\omega)$	polarizabilidad.	Cap. 5
l_i	factor de depolarización en el semieje i .	Cap. 5
γ_{rad}^0	constante de desexcitación radiativa para la molécula aislada.	Cap. 5
γ_{nr}^0	constante de desexcitación no-radiativa para la molécula aislada.	Cap. 5
γ_{em}	velocidad de emisión de una molécula fluorescente.	Cap. 5
γ_{exc}	velocidad de excitación.	Cap. 5
$GB = \gamma_{em} / \gamma_{em}^0$	ganancia en el brillo con respecto a la molécula aislada.	Cap. 5
$\gamma_{exc} / \gamma_{exc}^0$	ganancia en la excitación con respecto a la molécula aislada	Cap. 5
ϕ / ϕ^0	ganancia en la eficiencia cuántica de fluorescencia con respecto a la molécula aislada.	Cap. 5
$L = \gamma_{abs} / \gamma_{rad}^0$	tasa de transferencia de energía a la NP.	Cap. 5
$GP = \gamma_{rad} / \gamma_{rad}^0$	tasa de decaimiento radiativo. Ganancia en el número total de fotones emitidos antes de fotoblanquearse con respecto a la molécula aislada.	Cap. 5
h	separación NP-molécula medida desde la superficie de la NP.	Cap. 5
ε_λ	coeficiente de extinción molar.	Cap. 5
d_c	distancia medida desde el centro del volumen de observación a la superficie del sustrato a partir de la cual el modelo de una especie difundiendo ajusta los datos experimentales.	Cap. 6
$D_{aparente}$	coeficiente de difusión suponiendo un modelo de dos especies difundiendo.	Cap. 6
z_{umbral}	distancia en la dirección de propagación del haz incidente, medida desde la superficie y hasta el centro del volumen de observación.	Cap. 6
$I_{afuera}(x, \rho)$	distribución espacial de la intensidad de campo eléctrico en las inmediaciones de una NP metálica.	Cap. 7

símbolo	descripción	Ira. cita
N_{dif}	número medio de moléculas en V_{dif} .	Cap. 7
N_{red}	número medio de moléculas en V_{red} .	Cap. 7
$\tau_{red} = d^2/D$	tiempo característico de difusión en un volumen de observación, V_{red} 2D Gaussiano-exponencial.	Cap. 7
d	distancia característica de decaimiento de la función $I_{afuera}(x)$ en la coordenada x.	Cap. 7
$\beta = 16\alpha^2 N_{red}/N_{dif}^2$	amplitud de la función de correlación considerando un modelo que tiene en cuenta la difusión de una especie a través de dos volúmenes: V_{dif} 3D Gaussiano, y V_{red} 2D Gaussiano-exponencial.	Cap. 7
κ^{solv}	conductividad térmica del solvente.	Apéndice B
$\Delta T/\Delta r$	gradiente de temperatura.	Apéndice B
J	flujo de energía.	Apéndice B
I_{abs}	intensidad de luz absorbida.	Apéndice B
A_{sup}	la superficie en \mathbf{R}^3 que encierra el volumen de la NP.	Apéndice B
P_{inc}	la potencia incidente.	Apéndice B
$A_{inc} = \pi r^2$	area del spot del haz incidente.	Apéndice B

Bibliografía

- [Abbe 1873] Abbe, E., Beitrage zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung, *Archiv. f. Mikroskop.* 9, 413-418 (1873).
- [Agio et al. 2007] Agio, M., Mori, G., Kaminski, F., Rogobete, L., Kuhn, S., Calligari, V., Nellen, P., Robin, F., Ekinci, Y., Sennhauser, U., Jackel, H., Solak, H., and Sandoghdar, V., Engineering gold nanoantennae to enhance the emission of quantum emitters, *Proc. of SPIE* 6717, (2007).
- [Al-Sayed et al. 2007] Al-Sayed, A. M., Majied, A. S., Thermal instability of gold nanorods in micellar solution of water-glycerol mixtures, *Colloids Surf. A* 246, 61-69 (2004).
- [Anger et al. 2006] Anger, P., Bharadwaj, P., and Novotny, L., Enhancement and Quenching of Single-Molecule Fluorescence, *Phys. Rev. Lett.* 96, 113002 (2006).
- [Aragón et al. 1976] Aragón, S. R., and Pecora. R., Fluorescence correlation spectroscopy as a probe of molecular dynamics. *J. Chem. Phys.* 64, 1791-1803 (1976).
- [Asano et al. 1975] Asano, S., Yamamoto, G., Light Scattering by a Spheroidal Particle, *Appl. Opt.* 14, 29-45 (1975).
- [Aslan et al. 2005] K. Aslan, I. Gryczynski, J. Malicka, E. Matveeva, J. R. Lakowicz, and C. D. Geddes, Metal-enhanced fluorescence: an emerging tool in biotechnology, *Curr. Op. in Biotech* 16, 55-62 (2005).
- [Axelrod et al. 1976] Axelrod, D., Koppel, D., Schlessinger, J., Elson, E., and Webb, W. W., Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. *Biophys. J.* 16, 1055-1069 (1976).
- [Axelrod et al. 1976b] Axelrod, D., Ravdin, P., Koppel, D., Schlessinger, J., Webb, W. W., Elson, E., and Podleski, T. R. Lateral motion of fluorescently labeled acetylcholine receptors in membranes of developing muscle fibers. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 16, 12, 4594-4598 (1976).

- [Bacia et al. 2002] Bacia, K., Majoul, I. V., and Schwille, P. Probing the endocytic pathway in live cells using dual-color fluorescence cross-correlation analysis. *Biophys. J.* 83, 1184-1193 (2002).
- [Berland et al. 1995] Berland, K. M., So, P. T., Gratton, E. Two-photon fluorescence correlation spectroscopy: method and application to the intracellular environment. *Biophys. J.* 68, 694-701 (1995).
- [Berland et al. 2004] Berland, K. M. Detection of specific DNA sequences using dual-color two-photon fluorescence correlation spectroscopy, *J. Biotechnol.* 108, 127-136 (2004).
- [Berland et al. 2004r] Berland, K. M., Fluorescence correlation spectroscopy: a new tool for quantification of molecular interactions. *Methods Mol. Biol.* 261, 383 (2004).
- [Berne et al. 1976] Berne, B. J., Pecora, R. *Dynamic Light Scattering* (New York, Wiley) (1976).
- [Betzig et al. 1986] Betzig, E., Lewis, A., Harootunian, A., Isaacson, M., and Kratschmer, E., Near Field Scanning Optical Microscopy (NSOM) Development and Biophysical Applications, *Biophys. J.* 49, 269-279 (1986).
- [Bharadwaj et al. 2007] Bharadwaj, P. and Novotny, L., Spectral dependence of single molecule fluorescence enhancement, *Opt. Express* 15, 14266-14274 (2007).
- [Bharadwaj et al. 2007b] Bharadwaj, P., Anger, P., and Novotny, L., Nanoplasmonic enhancement of single-molecule fluorescence, *Nanotechnology* 18, 044017-044021 (2007).
- [Bragas et al. 2000] A.V. Bragas and O. E. Martínez., Field-enhanced scanning optical microscope, *Optics Lett.* 25, 9, 631-633 (2000).
- [Brioude et al. 2005] Brioude, A., Jiang, X. C., Pileni, M. P., Optical Properties of gold nanorods: DDA simulations supported by experiments, *J. Phys. Chem. B* 109, 13138-13142 (2005).
- [Brunstein 2008] Brunstein, M., Microscopía de fluorescencia de partícula única para el estudio de motores moleculares involucrados en el transporte de organelas, Tesis de Licenciatura en Cs. Físicas, Fac. Cs. Exactas y Naturales, UBA (2008).
- [Binnig et al. 1982a] Binnig, G. and Rohrer, H. *Helv. Phys. Acta* 55, 726 (1982).
- [Binnig et al. 1982b] Binnig, G., Rohrer, H., Gerber, Ch., and Weibel, E. *Phys. Rev. Lett.* 49, 57 (1982).

- [Blom et al. 2006] Blom, H., Kastrup, L., and Eggeling, C., Fluorescence Fluctuation Spectroscopy in Reduced Detection Volumes. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 7, 51-66 (2006).
- [Born et al. 1975] Born, M., Wolf, D. E., *Principles of Optics* (Pergamon, Oxford, U.K.) (1975).
- [Brock et al. 1998] Brock, R., Hink, M. A., Jovin, T. M. Fluorescence correlation microscopy of cells in the presence of autofluorescence. *Biophys. J.* 75, 5, 2547-2557 (1998).
- [Brust et al. 1995] Brust, M., Fink, J., Bethell, D., Schiffrin, D. J., and Kiely, C., Synthesis and reaction of functionalised gold nanoparticles, *Chem. Commun.*, 1655-1656 (1995).
- [Bulsecò et al. 2007] Bulsecò, D. A., Wolf, D. E. Fluorescence correlation spectroscopy: molecular complexing in solution and in living cells. *Methods Cell Biol.* 81, 525 (2007).
- [Cambi et al. 2004] Cambi, A., de Lange, F., Noortje M. van Maarseveen, Nijhuis, M., Joosten, B., Erik M., van Dijk, H. P., de Bakker, B., Franssen, J., Bovee-Geurts, P., Van Leeuwen, F., Van Hulst, N., and Carl G. Figdor, Microdomains of the C-type lectin DC-SIGN are portals for virus entry into dendritic cells, *J. Cell Bio.* 164, 145-155 (2004).
- [Carminati et al. 1998] Carminati, R., Nieto-Vesperinas, M., and Greffet, J. J., Reciprocity of evanescent electromagnetic waves, *J. Opt. Soc. Am. A* 15, 706-712 (1998).
- [Chance et al. 1974] Chance, R. R., Prock, A., Silbey, R., Lifetime of an emitting molecule near a partially reflecting surface, *J. of Chem. Phys.* 60, 7, 2744-2748 (1974).
- [Chance et al. 1975] Chance, R. R., Miller, A. H., Prock, A., Silbey, R., Luminescent lifetimes near multiple interfaces: A quantitative comparison of theory and experiment, *Chem. Phys. Lett.* 33, 3, 590-592 (1975).
- [Chen et al. 1999] Chen, Y., Muller, J. D., Berland, K. M., Gratton, E. Fluorescence Fluctuation Spectroscopy. *Methods* 19, 234-252 (1999).
- [Cheng et al. 2007] Cheng, D., and Xu, Q., Separation distance dependent fluorescence enhancement of fluorescein isothiocyanate by silver nanoparticles, *Chem. Commun.*, 248-250 (2007).
- [Corning] <http://www.corning.com/lifesciences>
- [Daniolos et al. 1990] Daniolos, A., Lerner, A. B., and Lerner, M. R., Action of light on frog pigment cells in culture. *Pigment Cell Res.* 3, 38-43 (1990).

- [de Bakker et al. 2007] de Bakker, B., Bodnar, A., Van Dijk, E., Vamosi, G., Damjanovich, S., Waldmann, T., van Hulst, N., A. Jenei, Garcia-Parajo, M., Nanoscale organization of the pathogen receptor DC-SIGN mapped by single-molecule high-resolution fluorescence microscopy, *Chem. Phys. Chem.* 8, 1473-1480 (2007).
- [de Bakker et al. 2008] de Bakker, B., Bodnár, A., Van Dijk, E., Vamosi, G., Damjanovich, S., Waldmann, T., Van Hulst, N., Jenei, A., Garcia-Parajo, M., Nanometer-scale organization of the alpha subunits of the receptors for IL2 and IL15 in human T lymphoma cells, *J. Cell Sci.* 121, 627-633 (2008).
- [de Lange et al. 2001] de Lange, F., Cambi, A., Huijbens, R., de Bakker, B., Rensen, W., Garcia-Parajo, M., Van Hulst, N., and Figdor, c., Cell biology beyond the diffraction limit: near-field scanning optical microscopy, *J. Cell Sci.* 114, 4153-4160 (2001).
- [Dickson et al. 1996] Dickson, R. M., Norris, D., Tzeng, Y., and Moerner, W., Three-Dimensional Imaging of Single Molecules Solvated in Pores of Poly(acrylamide) Gels., *Science* 274, 966-968 (1996).
- [Digman et al. 2005] Digman, M. A., Brown, C. M., Sengupta, P., Wiseman, P. W., Horwitz, A. R., and Gratton, E. Measuring fast dynamics in solutions and cells with a laser scanning microscope. *Biophys. J.* 89, 1317-1327 (2005).
- [Drexhage 1960] Drexhage, K. H., *Journal of Luminescence*, 693-701 (1960).
- [Durig et al. 1986] Durig, U., Pohl, D. W., Rohrer, H., *J. Appl. Phys.* 59, 3318-3327 (1986).
- [Dyba et al. 2002] Dyba, M., and Hell, S., Focal spots of size $\lambda/23$ open up far-field fluorescence microscopy at 33 nm axial resolution, *Phys. Rev. Lett.* 88, 163901 (2002).
- [Elson et al. 1974] Elson, E. L., and Magde, D., Fluorescence correlation spectroscopy I: Conceptual basis and theory, *Biopolymers* 13, 1 (1974).
- [Elson 2004] Elson, E. L., Quick tour of fluorescence correlation spectroscopy from its inception, *J. Biomed. Opt.* 9, 857 (2004).
- [Enderlein 2002] Enderlein, J., Theoretical study of single molecule fluorescence in a metallic nanocavity, *Appl. Phys. Lett.* 80, 2, 315-317 (2002).
- [Estrada et al. 2008] Estrada, L. C., Aramendía, P. F., and Martínez, O. E., 10000 times volume reduction for fluorescence correlation spectroscopy using nano-antennas, *Opt. Express* 16, 20597-20602 (2008).
- [Estrada et al. 2009] Estrada, L. C., Aramendía, P. F., and Martínez, O. E., Factors affecting the fluorescence enhancement in nanoparticles-fluorophore hybrid probe with plasmonic properties, *Opt. Comm.*, enviado (2009).

- [Estrada et al. 2009b] Estrada, L. C., Aramendía, P. F., and Martínez, O. E., 10000 times volume reduction for fluorescence correlation spectroscopy using nano-antennas. Trabajo seleccionado por el editor Gregory W. Faris para su republicación en *V. J. of Biomedical Optics* 4, 2 (2009).
- [Estrada et al. 2009c] Estrada, L. C., Brunstein, M., Bouchoule, S., Le-Gratiet, L., Sagnes, I., Talneau, A., Levenson, J. A., Martínez, O. E. and Yacomotti, A. M., Photonic Crystal substrates for confocal microscopy applications: enhanced fluorescence from dyes emitting in the visible using photonic band-edge slow Bloch modes, *Opt. Express*, en preparación (2009).
- [Fahey et al. 1977] Fahey, P. F., Koppel, D. E., Barak, L. S., Wolf, D. E., Elson, E. L., Webb, W. W., Lateral diffusion in planar lipid bilayers, *Science* 195, 305-306 (1977).
- [Fischer et al. 2005] Fischer, R., Fotin-Mleczek, M., Hufnagel, H., and Brock, R. Break on through to the other side - Biophysics and cell biology shed light on cationic cell-penetrating peptides, *Chem Bio Chem* 6, 2126-2142 (2005).
- [Foquet et al. 2004] Foquet. M., Korlach, J., Zipfel, W. R., Webb. W. W., and Craighead, H. G., Focal Volume Confinement by Submicrometer-Sized Fluidic Channels, *Anal. Chem.* 76, 1618-1626 (2004).
- [Fradin et al. 2003] Fradin, C., Abu-Arish, A., Granek, R., and Elbaum, M., Fluorescence Correlation Spectroscopy Close to a Fluctuating Membrane, *Biophys. J.* 84, 2005-2020 (2003).
- [Fu et al. 2007] Fu, A. H., Gu, W. W., Boussert, B., Koski, K., Gerion, D., Manna, L., Le Gros, M., Larabell, C. A., Alivisatos, A. P., Semiconductor quantum rods as single molecule fluorescent biological labels, *Nano Letters* 7, 179-182 (2007).
- [Fujii et al. 1995] Fujii, T., Nishikiori, H., Tamura, T., Absorption spectra of rhodamine B dimers in dip-coated thin films prepared by the sol-gel method, *Chem. Phys. Lett.* 233, 424-429 (1995).
- [GarciaParajo et al. 1999] García Parajo, M. F., Veerman, J. A., Segers-Nolten, G. M. J., de Grooth, B. G., Greve, J., van Hulst, N. F., Visualising individual green fluorescent proteins with a near field optical microscope, *Cytometry* 36, 239-246 (1999).
- [Ghosh et al. 2009] Ghosh, S. K., and Pal, T., Photophysical aspects of molecular probes near nanostructured gold surfaces, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 11, 3831-3844 (2009).
- [Gou et al. 2005] Gou, L., Murphy, C., Fine-tuning the shape of gold nanorods, *J. Chem. Mater.* 17, 3668-3672 (2005).

- [Grakoui et al. 1999] Grakoui, A., Shannon K. Bromley, Cenk Sumen, Mark M. Davis, Andrey S. Shaw, Paul M. Allen, Michael L. Dustin, The immunological Synapse: A Molecular Machine Controlling T Cell Activation, *Science* 285, 221-227 (1999).
- [Grecco et al. 2004] Grecco, H., Lidke, K., Heintzmann, R., Lidke, D., Spagnuolo, C., Martinez, O., Jares-Erijman, E., and Jovin, T., Ensemble and Single Particle Photophysical Properties (Two-photon Excitation, Anisotropy, FRET, Lifetime, Spectroconversion) of Commercial Quantum Dots in Solution and on/in Live Cells. *Microscopy Research and Technique* 65, 169-179 (2004).
- [Guiot et al. 2000] Guiot, E., Enescu, M., Arrio, B., Johannin, G., Roger, G., Tosti, S., Tfibel, F., Merola, F., Run, A., Georges, P., Fontaine-Aupart, M. P., Molecular dynamics of biological probes by Fluorescence Correlation Microscopy with two-photon excitation, *J. Fluorescence* 10, 4, 413-419 (2000).
- [Haugland et al. 1996] Haugland, R., editor. *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Molecular Probes* 6th edition, (Eugene, OR) (1996).
- [Haupts et al. 1998] Haupts, U., Maiti, S., Schwille, P., Webb, W. W., Dynamics of fluorescent fluctuations in green fluorescent protein observed by fluorescence correlation spectroscopy, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 95, 13573-13578 (1998).
- [Hebert et al. 2005] Hebert, B., Costantino, S., Wiseman, P. W., Spatio temporal image correlation spectroscopy (STICS) theory, verification and application to protein velocity mapping in living CHO cells, *Biophys. J.* 88, 3601-3614 (2005).
- [Hess et al. 2002] Samuel T. Hess, Shaohui Huang, Ahmed A. Heikal, Watt W. Webb, Biological and chemical applications of fluorescence correlation spectroscopy: a review, *Biochemistry* 41, 697-705 (2002).
- [Hillisch et al. 2001] Hillisch, A., Lorenz, M., Diekmann, S., Recent advances in FRET: distance determination in protein-DNA complexes, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11, 201-207 (2001).
- [Hohng et al. 2004] Hohng, S., and Ha, T. Near-Complete Suppression of Quantum Dot Blinking in Ambient Conditions, *J. Am. Chem. Soc.* 126, 1324-1325 (2004).
- [Hwang et al. 1998] Hwang, J., Gheber, L. A., Margolis, L. and Edidin, M. Domains in cell plasma membranes investigated by near-field scanning optical microscopy, *Biophys. J.* 74, 2184-2190 (1998).
- [Ianoul et al. 2005] Ianoul, A., Donna D Grant, Yanouchka Rouleau, Mahmud Bani-Yaghoub, Linda J Johnston and John Paul Pezacki, Imaging nanometer

- domains of bold beta-adrenergic receptor complexes on the surface of cardiac myocytes, *Nature Chem. Biol.* 1, 196-202 (2005).
- [Jackson 2006] Jackson, M. B., *Molecular and cellular biophysics* (Cambridge University Press, Cambridge) (2006).
- [Jiang et al. 2006] Jiang, X. C., Brioude, A., Pileni, M. P., Gold nanorods: Limitations on their synthesis and optical properties, *Colloids Surf. A* 277, 201-206 (2006).
- [Johnson et al. 1972] Johnson, P. B., and Christy, R. W., Optical properties of the noble metals, *Phys. Rev. B* 6, 4370-4379 (1972).
- [Kalkbrenner et al. 2001] Kalkbrenner, T., Ramstein, M., Mlynek, J., Sandoghdar, V., A single gold particle as a probe for apertureless scanning near-field optical microscopy, *J. Microscopy* 202, 72-76 (2001).
- [Kask et al. 1997] Kask, P., Gunther, R., Axhausen, P., Statistical accuracy in fluorescence fluctuation experiments, *Eur. Biophys. J.* 25, 163-169 (1997).
- [Kastrup et al. 2005] Kastrup, L., Blom, H., Eggeling, C., and Hell, S. W., Fluorescence Fluctuation Spectroscopy in Subdiffraction Focal Volumes, *Phys. Rev. Lett.* 94, 178104 (2005).
- [Kelly et al. 2003] Kelly, K. L., Coronado, E., Zhao, L. L., and Schatz, G. C., The optical properties of metal nanoparticles: the influence of size, shape, and dielectric environment, *J. Phys. Chem. B* 107, 668-677 (2003).
- [Kneipp et al. 1997] Kneipp, K., Wang, Y., Kneipp, H., Perelman, L., Itzkan, I., Dasari, R., and Feld, M., Single Molecule Detection Using Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS), *Phys. Rev. Lett.* 78, 1667-1670 (1997).
- [Koppel et al. 1976] Koppel, D. E., Axelrod, D., Schlessinger, J., Elson, E. L., Webb, W. W., Dynamics of fluorescence marker concentration as a probe of mobility, *Biophys. J.* 16, 1315-1329 (1976).
- [Koppel 1974] Koppel, D. E., Statistical accuracy in fluorescence correlation spectroscopy, *Phys. Rev. A*. A10, 1938-1945 (1974).
- [Kreibig et al. 1995] U. Kreibig and M. Vollmer, *Optical properties of metal clusters* (Springer-Verlag, Berlin) (1995).
- [Krichevsky et al. 2002] Krichevsky, O., and Bonnet, G., Fluorescence correlation spectroscopy: the technique and its applications, *Reports on Progress in Physics* 65, 251-297 (2002).
- [Kuhn et al. 2006] Kuhn, S., Hakanson, U., Rogobete, L., Sandoghdar, V., Enhancement of single-molecule fluorescence using a gold nanoparticle as an optical nanoantenna, *Phys. Rev. Lett.* 97, (2006).

- [Lakowicz 1983] Lakowicz, J. R., *Principles of fluorescence spectroscopy* (Plenum Press, New York) (1983).
- [Lakowicz et al. 2002] Lakowicz, J., Shen, Y., D'Auria, S., Malicka, J., Fang, J., Gryczynski, Z., and Gryczynski, I., Radiative Decay Engineering: 2. Effects of Silver Island Films on Fluorescence Intensity, Lifetimes, and Resonance Energy Transfer, *Anal. Biochem* 301, 261-277 (2002).
- [Lakowicz et al. 2002] Gryczynski, I., Malicka, J., Gryczynski, Z., Geddes, G., and Lakowicz, J., The CFS engineers the intrinsic radiative decay rate of low quantum yield fluorophores, *J. of Fluorescence* 12, 1, 11-13 (2002).
- [Lee et al. 2005] Lee, K. S., Al-Sayed, A. M., Dependence of the Enhanced Optical Scattering Efficiency Relative to that of Absorption for Gold Metal Nanorods on Aspect Ratio, Size, end-cap Shape, and Medium Refractive Index, *J. Phys. Chem. B* 109, 20331-20338 (2005).
- [Leutenegger et al. 2006] Leutenegger, M., Gosch, M., Perentes, A., Hoffmann, P., Martin, O., Lasser, T., Confining the sampling volume for Fluorescence Correlation Spectroscopy using a sub-wavelength sized aperture. *Opt. Express* 14, 956-969 (2006).
- [Levene et al. 2003] Levene, M., Korlach, J., Turner, S., Foquet, M., Craighead, H., Webb, W. W., Zero-Mode Waveguides for Single-Molecule Analysis at High Concentrations, *Science* 299, 682-686, (2003).
- [Lide et al. 1992] Lide, D., editor. *Handbook of Chemistry and Physics* 73rd edition, (CRC Press) (1992).
- [Lifshitz et al. 1984] Lifshitz, E. M., Landau, L. D., Pitaevskii, L. P., *Electrodynamics of Continuous Media* (Butterworth-Heinemann: Burlington) (1984).
- [Link et al. 1999] Link, S., and El-Sayed, M., Size and Temperature Dependence of the Plasmon Absorption of Colloidal Gold Nanoparticles, *J. Phys. Chem. B* 103, 4212-4217 (1999).
- [Lippincott-Schwartz et al. 2001] Lippincott-Schwartz, S., Studying protein dynamics in living cells, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 444-456 (2001).
- [Liz-Marzán et al. 1996] Liz-Marzán, L., and Lado-Touriño, I., Reduction and Stabilization of Silver Nanoparticles in Ethanol by Nonionic Surfactants, *Langmuir* 12, 3585-3589 (1996).
- [Magde et al. 1974] Magde, D., Elson, E. L., Webb, W. W., Fluorescence Correlation Spectroscopy II: An experimental realization, *Biopolymers* 13, 29-61 (1974).

- [Magde et al. 1972] Magde, D., Elson, E. L., Webb, W. W., Thermodynamics fluctuations in a reacting system: Measurement by fluorescence correlation spectroscopy, *Phys. Rev. Lett.* 29, 705-708 (1972).
- [Masip 2006] Masip, M., Modelado de nanopartículas y Generación de luz blanca, Tesis de Licenciatura en Cs. Físicas, Fac. Cs. Exactas y Naturales, UBA (2006).
- [Mayboroda et al. 2003] Mayboroda, O. A., van Remoortere, A., Tanke H. J., Hokke, C. H., Deelder, A. M., A new approach for fluorescence correlation spectroscopy (FCS) based immunoassays, *J. Biotechnol.*, 107, 185-192 (2003).
- [Mc Ateer et al. 1994] Mc Ateer, J., and Davis, J., em Basic cell culture technique and the maintenance of cell lines, (Oxford University Press) (1994).
- [Medina et al. 2002] Medina, M., Schwille, P., Fluorescence correlation spectroscopy for the detection and study of single molecules in biology, *Bioassays.* 24, 758 (2002).
- [Meyer et al. 1988] Meyer, T., Schindler, H., Simultaneous measurement of aggregation and diffusion of molecules in solutions and in membranes, *Biophys. J.* 54, 6, 983-993 (1988).
- [Michalet et al. 2001] Michalet, X., Pinaud, F., Lacoste, T. D., Dahan, M., Bruchez, M. P., Alivisatos, A. P., Weiss, S., Properties of fluorescent semiconductor nanocrystals and their application to biological labeling, *Single Molecules* 2, 4, 261-276, (2001).
- [Mie 1908] Mie, G., *Ann. Physik* 25, 377 (1908).
- [Mishchenko et al. 2000] Mishchenko, M. I., Hovenier, J. W., Travis L. D., *Light Scattering by Nonspherical Particles* Academic Press, San Diego (2000).
- [Muhlschlegel et al. 2005] Muhlschlegel, P., Eisler, H., Martin, O., Hecht, B. and Pohl, D., Resonant Optical Antennas, *Science* 308, 1607-1609 (2005).
- [Murphy et al. 2005] Murphy, C., Sau, T., Gole, A., Orendorff, C., Gao, J., Gou, L., Hunyadi, S., Li, T., Anisotropic Metal Nanoparticles: Synthesis, Assembly, and Optical Applications, *Phys. Chem. B* 109, 13857-13870 (2005).
- [Murphy et al. 2002] Murphy, C., Jana, N., Controlling the aspect ratio of inorganic nanorods and nanowires, *Adv. Mater.* 14, 80-82 (2002).
- [Nirmal et al. 1996] Nirmal, M., Dabbousi, B. O., Bawendi, M. G., Macklin, J. J., Trautman, J. K., Harris, T. D., Brus, L. E., Fluorescence intermittency in single cadmium selenide nanocrystals, *Nature* 383 (6603): 802-804, (1996).
- [Novotny et al. 2007] Novotny, L., Hetch, B., *Principles of Nano-Optics* (Cambridge University Press, Cambridge) (2007).

- [Palmer et al. 1987a] Palmer, A. G., Thompson, N. L., Molecular aggregation characterized by high order autocorrelation in fluorescence correlation spectroscopy, *Biophys. J.* 52, 2, 257-270 (1987).
- [Palmer et al. 1987b] Palmer, A. G., Thompson, N. L., Theory of sample translation in fluorescence correlation spectroscopy, *Biophys. J.* 51, 2, 339-343 (1987).
- [Palmer et al. 1989] Palmer, A. G., Thompson, N. L., High order fluorescence fluctuation analysis of model protein clusters, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 86, 16, 6148-6152 (1989).
- [Patel et al. 1991] Patel, S. S., Wong, I. and Johnson, K. A., Pre-steady-state kinetic analysis of processive DNA replication including complete characterization of an exonuclease deficient mutant, *Biochem.* 30, 511-525 (1991).
- [Perez Juste et al. 2005] Perez Juste, J., Pastoriza Santos, I., Liz Marzan, L. M., Mulvaney, P., Gold nanorods: synthesis, characterization and applications, *Coord. Chem. Rev.* 249, 1870-1901 (2005).
- [Perez Juste et al. 2004] Perez Juste, J., Liz Marzan, L. M., Carnie, S., Chan, D. Y. C., Mulvaney, P., *Adv. Funct. Mater.* 14, 571 (2004).
- [Pitsillides et al. 2003] Pitsillides, C., Joe, E., Wei, X., Anderson, R., and Lin, C., Selective cell targeting with light-absorbing microparticles and nanoparticles, *Biophys. J.* 84, 4023-4032 (2003).
- [Pohl et al. 1984] Pohl, D. W., Denk, W., and Lanz, M., Optical stethoscopy: image recording with resolution $\lambda/20$, *Appl. Phys. Lett.* 44, 651-653 (1984).
- [Politz et al. 1998] Politz, J. C., Browne, E. S., Wolf, D. E., and Pederson, T., Intracellular diffusion and hybridization state of oligonucleotides measured by fluorescence correlation spectroscopy in living cells, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 95, 6043-6048 (1998).
- [Qian et al. 1990] Qian, H., On the statistics of fluorescence correlation spectroscopy, *Biophys. Chem.* 38, 49-57 (1990).
- [Qian et al. 1990b] Qian, H., Elson E. L., Distribution of molecular aggregation by analysis of fluctuation moments, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 87, 14, 5479-5483 (1990).
- [Qian et al. 1991] Qian, H., Elson E. L., Analysis of confocal laser-microscope optics for 3D fluorescence correlation spectroscopy., *Appl. Opt.*, 30, 1185-1195, (1991).
- [Riboh et al. 2004] J. C. Riboh, A. J. Haes, A. D. McFarland, C. R. Yonzon, R. P. Van Duyne, *J. Phys Chem. B* 107, 1772 (2004).

- [Rigler 1995] Rigler, R., Fluorescence correlations, single molecule detection and large number screening. Applications in biotechnology. *J. Biotechnol.* 41, 177 (1995).
- [Rigler et al. 1993] Rigler, R., Mets, U., Widengren, J., and Kask, P. Fluorescence correlation spectroscopy with high count rate and low background: analysis of translational diffusion. *Eur. Biophys. J.*, 22, 169-175 (1993).
- [Rogobete et al. 2007] L. Rogobete, F. Kaminski, M. Agio, and V. Sandoghdar, *Opt. Lett.* 32, 1623-1625 (2007).
- [Ruan et al. 2004] Ruan, Q., Cheng, M. A., Levi, M., Gratton, E. and Mantulin, W. W., Spatial-temporal studies of membrane dynamics: scanning fluorescence correlation spectroscopy (SFCS). *Biophys. J.* 87, 1260-1267 (2004).
- [Sako et al. 2000] Sako, Y., Minoghchi, S. and Yanagida, T. Single-molecule imaging of EGFR signalling on the surface of living cells. *Nat. Cell Biol.* 2, 168-172 (2000).
- [Sanchez et al. 2001] Sanchez, S., Chen, Y., Muller, J. D., Gratton, E., Hazlett, T. L., *Biochemistry* 40, 6903-6911 (2001).
- [Sase et al. 1995] Sase, I. et al, *Biophys. J.* 69, 323, (1995).
- [Scaffardi et al. 2005] Scaffardi, L. B., Pellegrini, N., de Sanctis, O. and Tocho, J. O., Sizing gold nanoparticles by optical extinction spectroscopy, *Nanotechnology* 16, 158-163 (2005).
- [Scaffardi et al. 2006] Scaffardi, L. B., and Tocho, J. O., Size dependence of refractive index of gold nanoparticles, *Nanotechnology* 17, 1309-1315 (2006).
- [Scarpettini et al. 2009] Scarpettini, A. F., Pellegrini, N., and Bragas, A. V., Optical imaging with subnanometric vertical resolution using nanoparticle-based plasmonic probes, *Opt. Commun.* 282, 1032-1035 (2009).
- [Schmidt et al. 1995] T. Schmidt, *J. Phys. Chem.* 99, 17662, (1995).
- [Schomburg et al. 2001] Schomburg, D. and Schomburg, I. *Handbook of Enzymes* 2nd edition (Springer, New York) (2001).
- [Schneider et al. 2006] G. Schneider, G. Decher, *Nano Lett.* 6, 530-536 (2006).
- [Schwille et al. 2001] Schwille, P. Fluorescence correlation spectroscopy and its potential for intracellular applications. *Cell Biochem. Biophys.* 34, 383 (2001).
- [Schwille et al. 2004] Schwille, P., and Haustein, E. FCS, An introduction to its applications. Material disponible online en: www.biophysics.org/education/schwille.pdf

- [Srisombat et al. 2008] Srisombat, L., Park, J., Zhang, S., and Lee, R. T. Preparation, Characterization, and Chemical Stability of Gold Nanoparticles Coated with Mono, Bis, and Tris-Chelating Alkanethiols, *Langmuir* 24, 7750-7754 (2008).
- [Starr et al. 2001] Starr, T. E., Thompson, N. L. Total Internal Reflection with Fluorescence Correlation Spectroscopy: Combined Surface Reaction and Solution Diffusion, *Biophys. J.* 80, 3, 1575-1584 (2001).
- [Stranik et al. 2007] Stranik, O., Nooney, R., McDonagh, C. and MacCraith, B. Optimization of nanoparticle size for plasmonic enhancement of fluorescence, *Plasmonics* 2, 15-22 (2007).
- [Schuck et al. 2005] Schuck, P. J., Fromm, D. P., Sundaramurthy, A., Kino, G. S. and Moerner, W. E. *Phys. Rev. Lett.* 94, 017402 (2005).
- [Schutz et al. 1997] Schutz, G. J., *Biophys. J.* 73, 1073 (1997).
- [Svedberg et al. 1911] Svedberg, T., Inouye, K. Eine neue Methode zur prufung der gultigkeit des Boyle-Gay-Lussacschen Gesetzes fur kolloide losungen. *Zeitschr. f. Physik. Chemie.* 77, 145-191 (1911).
- [Synge et al. 1928] Synge, E. H. *Phil. Mag.* 6, 356 (1928).
- [Tam et al. 2007] Tam, F., Goodrich G. P., Johnson, B. R., and Halas, N. J., Plasmonic enhancement of molecular fluorescence, *Nano Lett.* 7, 496-501 (2007).
- [Ted Pella Inc.] <http://www.tedpella.com>
- [Thomas et al. 2004] Thomas, M., Greffet, J. J., Carminatti, R., and Arias-Gonzalez, J. R. Single-molecule spontaneous emission close to absorbing nanostructures, *Appl. Phys. Lett.* 85, 17, 3863-3865 (2004).
- [Thomas et al. 2000] K. G. Thomas, and P. V. Kamat, *J. Am. Chem. Soc.* 122, 2655-2656 (2000).
- [Thompson et al. 2002] Recent advances in fluorescence correlation spectroscopy. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12, 634 (2002).
- [Tsien 1998] Tsien, R. Y. The green fluorescent protein, *Annu. Rev. Biochem.* 67, 509-544 (1998).
- [Urban et al. 2009] Urban, A. S., Fedoruk, M., Horton, M. R., Rdlar, J. O., Stefani, F. D., and Feldmann, J., Controlled Nanometric Phase Transitions of Phospholipid Membranes by Plasmonic Heating of Single Gold Nanoparticles, *Nano. Lett.* XX, (2009).
- [Urban et al. 2009b] Urban, A. S., Fedoruk, M., Stefani, F. D., Feldmann, J., Local melting effects on phospholipid membranes using plasmonic heating, *Proceedings of SPIE* 7394-31 (2009).

- [Valeur 2001] Valeur, B. *Molecular Fluorescence. Principles and Applications*. (Wiley-VCH) (2001).
- [Wang et al. 2006] Wang, H., Brandl, D. W., Le, F., Nordlander, P., and Halas, N., Nanorice: A Hybrid Plasmonic Nanostructure, *Nano Lett.* 6, 4, 827-832 (2006).
- [Webb et al. 1996] Webb, R. H. Confocal optical microscopy, *Rep. Prog. Phys.* 59, 427-471 (1996).
- [Weiss 1999] Weiss, S. Fluorescence spectroscopy of single biomolecules. *Science* 283, 1676-1683 (1999).
- [Weissman et al. 1976] Weissman, M., Schindler, H., Feher, G., Determination of molecular weights by fluctuation spectroscopy: application to DNA. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 73, 2276-2780 (1976).
- [Wenger et al. 2007] Wenger, J., Conchonaud, F., Dintinger, J., Wawrezinieck, L., Ebbesen, T. W., Rigneault, H., Marguet, D., and Lenne, P. F., Diffusion Analysis within Single Nanometric Apertures Reveals the Ultrafine Cell Membrane Organization, *Biophys. J.* 92, 913-919 (2007).
- [Wickramasinghe et al. 1993] Wickramasinghe, H. K. Chapter 3: Extensions of STM, from *Scanning Tunneling Microscopy* (Academ. Press, Inc.) (1993).
- [Widengren et al. 1998] Widengren, J., Rigler, R., *Cell. Mol. Biol.* 44, 857 (1998).
- [Widengren et al. 1995] Widengren, J., Mets, U., and Rigler, R., Fluorescence correlation spectroscopy of triplet states in solution: a theoretical and experimental study, *J. Phys. Chem.* 99, 13368-13379 (1995).
- [Widengren et al. 1994] Widengren, J., R. Rigler, and U. Mets. Triplet-state monitoring by fluorescence correlation spectroscopy. *J. Fluorescence* 4, 255-258 (1994).
- [Wirth et al. 2001] Wirth, M. J., and Swinton, D. J., Single-Molecule Study of an Adsorbed Oligonucleotide Undergoing Both Lateral Diffusion and Strong Adsorption, *J. Phys. Chem. B* 105, 1472-1477, (2001).
- [Wiseman et al. 1999] Wiseman, P. W., and Petersen N.O., Image correlation spectroscopy II. Optimization for ultrasensitive detection of preexisting platelet-derived growth factor-beta receptor oligomers on intact cells. *Biophys. J.* 76, 963-977 (1999).
- [Xie et al. 1994] Xie, X. S., and Dunn, R. C. Probing single molecule dynamics. *Science* 265, 361-364 (1994).
- [Yonzon et al. 2004] Yonzon, C. R., Haynes, C. L., Zhang, X., Walsh, J. T., Van Duyne, R. P., *Anal. Chem.* 76, 78, (2004).

- [Zhang et al. 2002] Zhang, J., and Campbell, R. E. Creating new fluorescent probes for cell biology. *Nature Rev. Mol. Biol.* 3, 906-918 (2002).
- [Zharov et al. 2006] Zharov, V. P., Mercer, K., Galitovskaya, E. N., and Smeltzer, M. S., Photothermal Nanotherapeutics and Nanodiagnostics for Selective Killing of Bacteria Targeted with Gold Nanoparticles. *Biophys. J.* 90, 619-627 (2006).

Agradecimientos

Como hacer para resumir en pocas líneas todas las sensaciones que se me cruzan por la cabeza.

En primer lugar quiero agradecer a mis directores Oscar y Pedro por dejarme aprender de ellos, por darme oportunidades constantemente, por compartir conmigo el entusiasmo con el que hacen ciencia.

A Oscar. Todos los que trabajamos con él sabemos de la atmósfera que Oscar crea a su alrededor, aunque probablemente él ni lo sospeche. Una de las cosas que más me sorprenden de él es la cantidad de veces que me encontré resolviendo problemas que meses antes, Oscar había sugerido que iban a aparecer. Oscar es la persona científicamente más brillante que conozco y además de eso conserva una sencillez admirable. Oscar: gracias por todas las oportunidades, empezando por aquella que me diste cuando mi beca tambaleaba.

A Pedro. Pedro no solo es un excelente científico también es una excelente persona, y la combinación de ambas cualidades es lo que lo convierte en un tipo muy especial. Además, está siempre en todos los detalles, y cuando digo todos me refiero a todos.

A Andrea, que tiene la responsabilidad de agarrar el timón de tremendo barco, y eso no la achica ni un poquito.

A Lía y a Vale, las no físicas, que sorportan todas nuestras burradas cuando de cosas bio se trata.

Imposible no nombrar a toda la gente del Laboratorio. Son 7 años en el LEC!!! todavía no me fui y ya los extraño. No los voy a nombrar uno por uno, porque escriba lo que escriba va a ser poco. El laboratorio es mi segunda casa y cada uno de sus integrantes son un poquito mi familia. Gracias por las discusiones, los intercambios de opiniones, las interminables rondas de mate, gracias, gracias, gracias chicos!

A todo el grupo de fotoquímica del INQUIMAE, donde nunca me sentí sapo de otro pozo!, bueno a decir verdad hubo algunos seminarios...digamos casi nunca.

A Marcia Levitus y a su grupo del Departamento de Química y Bioquímica de la Universidad Estatal de Arizona, quienes hace 4 años me recibieron con los brazos abiertos y me introdujeron en el mundo de FCS.

A Alejandro Colman-Lerner por las apasionadas discusiones científicas.

A todas las personas que día a día ponen mucho esfuerzo y trabajo para que el Departamento de Física sea el lugar que es. Un espacio libre, donde se pueden

debatir ideas y donde se puede hacer ciencia al mejor nivel.

Para el final dejé a mi familia, sin ellos no hubiera empezado este camino, no lo hubiera transitado, y seguramente no lo hubiera terminado. Empezando por mis abuelos, inmigrantes italianos que llegaron a la Argentina sin nada pero con muchísimos sueños por cumplir (y con una valija llena de muñequitos de yeso) y hoy, años después, tienen una nieta doctora. En especial a mi abuela, que se fue justito antes de la charla pero que me regaló un abrazo cuando se enteró que ya había entregado la Tesis.

Como no agradecer a mis padres Hector Estrada y Tecla Barsanti. Sin el apoyo de ellos nada de esto hubiera sido posible. Nada. A ellos les debo lo que soy y a ellos va dedicada esta Tesis.

Finalmente a vos, Ro, por estar conmigo, por hacerme feliz y por acompañarme en esta nueva etapa que emprendemos juntos.

Laura
Agosto de 2009