

Tesis Doctoral

Manipulación de fluorescencia molecular mediante nanopartículas metálicas

Pellegrotti, Jesica Vanesa

2015-03-31

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:

Pellegrotti, Jesica Vanesa. (2015-03-31). Manipulación de fluorescencia molecular mediante nanopartículas metálicas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Pellegrotti, Jesica Vanesa. "Manipulación de fluorescencia molecular mediante nanopartículas metálicas". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2015-03-31.

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

Manipulación de fluorescencia molecular mediante nanopartículas metálicas

Tesis presentada para optar al título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Ciencias Físicas

Autor: ***Jesica Vanesa Pellegrotti***

Director de Tesis: Dr. Fernando D. Stefani

Consejero de Estudios: Dr. Pablo Tamborenea

Centro de Investigaciones en Bionanociencias, CIBION
Polo Científico Tecnológico, Conicet

Fecha de defensa: 31/03/2015

*“Ni teoría, ni demostración
ni razón, ni fundamento,
que sea el Amor, la Vida y el tiempo...”*

Contenido

Motivación.....	1
1. Introducción	4
1.1 Fluorescencia molecular	4
1.1.1 Absorción	5
1.1.2 Relajación vibracional.....	6
1.1.3 Relajación electrónica	6
1.1.4 Tiempo de vida media de fluorescencia	7
1.1.5 Rendimiento de fluorescencia	7
1.1.6 Intensidad de fluorescencia	8
1.1.7 Cruce de sistemas	8
1.1.8 Fosforescencia	9
1.1.9 Emisión intermitente (blinking)- saturación por tripletes	9
1.1.10 Mediciones de tiempo de vida media de fluorescencia por conteo fotones individuales correlacionados en el tiempo	10
1.1.11 Fotoblanqueo	11
1.1.12 Quenching	12
1.1.13 Efecto de la temperatura	12
1.2 Nanopartículas Metálicas	14
1.2.1 Plasmones superficiales	14
1.2.2 Plasmones superficiales localizados	16
1.2.3 Absorción y dispersión de luz	16
1.2.4 Modelado y cálculo teórico de resonancias plasmónicas	17
1.2.5 Campo cercano	19
1.2.6 Acoplamiento plasmónico	20
1.2.7 Generación de calor por medio de nanopartículas metálicas	20
1.2.8 Campo de temperatura alrededor de una nanopartícula calentada plasmónicamente	21
1.2.9 Potencia de calentamiento de NPs	21
1.2.10 Perfil de temperaturas	22
1.2.11 Calculo de temperatura para partículas de estructuras arbitrarias	23
1.2.12 Transitorio de calentamiento	22

1.2.13 Efectos colectivos	24
1.3 Interacción de nanopartículas metálicas con fluoróforos	25
2. Reducción de fotoblanqueo controlada por efecto Purcell	29
2.1 Fotoestabilidad y efecto Purcell	29
2.2 Nanoestructuras híbridas: Origamis de ADN, fluoróforos y AuNP	33
2.2.1 Origamis de ADN	33
2.2.2 Ubicación de NPs y fluoróforos con precisión nanométrica mediante origamis de ADN	37
2.2.3 Preparación de muestras	39
2.3 Demostración experimental del efecto Purcell sobre el número total de fotones emitidos	39
2.3.1 Detección de fluorescencia de moléculas individuales	39
2.3.2 Clasificación de poblaciones y tiempo de vida	40
2.3.3 Cambio en la intensidad de fluorescencia en presencia de AuNP	45
2.3.4 Total de fotones emitidos antes del fotoblanqueo	47
2.4 Conclusiones y perspectivas	49
2.5 Materiales y Métodos	51
2.5.1 Síntesis de origamis	51
2.5.2 Marcación de nanopartículas	53
2.5.3 Preparación de superficies	54
2.5.4 Preparación de muestras	55
2.5.5 Sistema de adquisición	55
2.5.6 Análisis de tiempo de vida de fluorescencia	56
2.5.7 Distribuciones de tamaño de partículas esféricas	57
2.5.8 Simulaciones numéricas	58
3. Modulación fototérmica de fluorescencia por calentamiento plasmónico	60
3.1 Sondas fluorescentes modulables.....	60
3.1.1 Sondas híbridas modulables por calentamiento plasmónico	61
3.2 Caracterización de fluoróforos y nanopartículas para la construcción de una sonda modulable	63
3.2.1 Nanopartículas de oro	63
3.2.2 Dependencia de la temperatura de la fluorescencia de AlexaFluor 532 y AlexaFluor 546	65

3.3 Campo de temperaturas alrededor de nanopartículas	67
3.3.1 Cálculos del campo de temperaturas	67
3.3.2 Efecto sobre la intensidad de fluorescencia	71
3.4 Modulación fototérmica defluorescencia por calentamiento plasmónico	73
3.4.1 Detalles del arreglo experimental	74
3.4.2 Mediciones sobre aglomerados de AuNRs	75
3.4.3 Mediciones de AuNRs individuales	78
3.5 Aumento de contraste por modulación de fluorescencia	82
3.5.1 Prueba de los algoritmos en imágenes simuladas	83
3.5.2 Prueba de algoritmos sobre imágenes adquiridas	87
3.6 Conclusiones y perspectivas	89
3.7 Materiales y métodos	90
3.7.1 Limpieza de cubreobjetos	90
3.7.2 Funcionalización de cubreobjetos	91
3.7.3 Marcación de NPs con fluoróforo para experimentos en gota	92
3.7.4 Detalles del arreglo experimental	92
3.7.5 Determinación del tamaño del haz de calentamiento	93
3.7.6 Espectroscopías	94
3.7.7 Simulaciones del campo de temperaturas generado por AuNRs	94
4. Biosensado por reducción fototérmica de fluorescencia	96
4.1 Inmunoensayos, descripción y relevancia	96
4.2 Principio de funcionamiento del sensado por reducción fototérmica de fluorescencia	99
4.3 Componentes del ensayo y dispositivo de medición	100
4.4 Determinación de parámetros esenciales del sensor por simulaciones	101
4.5 Reducción selectiva de fluorescencia	102
4.6 Ensayo de biosensado sandwich	107
4.7 Conclusiones y perspectivas	109
4.8 Materiales y métodos	110
4.8.1 Preparación y análisis de muestras	110
4.8.2 Descripción del dispositivo experimental	111
4.8.3 Marcación y cuantificación de sitios activos por NP	111
4.8.4 Preparación y análisis de muestras	110

5. Conclusiones y perspectivas	114
Apéndice	117
Acrónimos	123
Bibliografía	124
Agradecimientos	137

Motivación

Desde la introducción del término fluorescencia en el año 1852 por el físico irlandés Sir George Gabriel Stokes, en un trabajo donde demostraba que el fenómeno consistía en la absorción de luz seguida de emisión de luz de mayor longitud de onda, infinidad de trabajos se han volcado, a lo largo de los años a comprender la naturaleza de la fluorescencia¹⁻⁶ y sus aplicaciones tecnológicas⁷⁻¹⁰.

El éxito de la fluorescencia como herramienta para estudiar estructuras y dinámicas de la materia o de sistemas vivos, proviene principalmente de tres factores: i) provee una enorme sensibilidad; es posible detectar la luz emitida por una sola molécula, ii) brinda señales específicas a través del marcado dirigido con especies fluorescentes y de la dependencia de la fluorescencia con las propiedades locales del microentorno, y iii) de su capacidad de proveer información espacial y temporal con alta resolución^{11,12}.

A pesar de que la fluorescencia es una técnica muy poderosa, tiene sus restricciones impuestas por propiedades de los fluoróforos o del medio en el cual se intenta medir. En ciertos casos los fluoróforos presentan una limitada eficiencia cuántica de fluorescencia o una foto-degradación (photobleaching) rápida. La fotodegradación es particularmente perjudicial para todas las mediciones basadas en fluorescencia ya que limita el número total de fotones que puede emitir un fluoróforo, y en consecuencia la cantidad de información que puede proveer. En la obtención de imágenes limita la relación señal-fondo y en técnicas de súper-resolución limita la resolución espacial alcanzable.

En otros casos sucede que el mismo medio u otros componentes de la muestra son auto-fluorescentes e impiden la detección clara de las señales de los marcadores. Es común que en estudios donde se desea obtener información de procesos a nivel de unas pocas moléculas, estas contribuciones de fondo entorpezcan la medición. Por ejemplo, en la microscopía de fluorescencia de células biológicas aún se encuentran casos donde, para lograr diferenciar una señal del fondo, es necesario aumentar la intensidad de excitación, a costa de aumentar la presencia de otras marcas endógenas¹³ e incrementar la fotodegradación.

En esta tesis se investigaron estrategias para manipular el proceso de fluorescencia mediante nanopartículas metálicas ubicadas en la vecindad nanométrica de las moléculas fluorescentes. La motivación en todas las investigaciones fue doble: avanzar el conocimiento sobre esta posibilidad de modificar la fluorescencia y por otro lado obtener mejoras o modificaciones que permitan nuevas aplicaciones.

Un lector nuevo en este campo podría preguntarse cómo es posible que una nanopartícula metálica tenga influencia sobre procesos moleculares de absorción y emisión de luz. Pues

bien, las nanopartículas metálicas interactúan fuertemente con la luz a través de oscilaciones colectivas de sus electrones de conducción, denominadas resonancias plasmónicas. Cuando estas resonancias son excitadas, se generan campos eléctricos evanescentes en la superficie de las nanopartículas que pueden tener intensidades varias veces mayores o menores que la de la luz incidente. Esto modifica entonces la probabilidad de que la molécula cercana absorba un fotón, es decir la probabilidad de excitar fluorescencia. La distribución particular de campo eléctrico cerca de las nanopartículas depende de las características del modo resonante. A su vez, la excitación de cada modo requiere una cierta polarización del campo incidente con respecto a la geometría de la nanopartícula.

La emisión de fluorescencia involucra la emisión de un fotón al campo lejano. Este fotón puede también interactuar con la nanopartícula. De modo recíproco a lo que sucede con la excitación, la emisión de fluorescencia de una molécula en la vecindad de una nanopartícula metálica puede verse aumentada o suprimida. La interacción en emisión dependerá de la orientación molecular y de los modos resonantes disponibles a la energía del fotón de fluorescencia. Esto puede además redireccionar la emisión molecular cuando el acople es eficiente.

Interesados por explorar la influencia en la emisión, en los años 70 se realizaron los primeros estudios sobre interacción entre superficies metálicas y fluoróforos^{14,15}. En estos trabajos pioneros se intentó explicar sin éxito a partir de los campos reflejados, los efectos observados sobre el tiempo de vida de fluorescencia y la intensidad detectada. Estos reportes abrieron las puertas a numerosos estudios tanto experimentales como teóricos sobre dipolos oscilantes y superficies metálicas¹⁶⁻¹⁸. Actualmente esta interacción está completamente comprendida.

En los últimos años se han producido, además, grandes avances en el campo de la nanotecnología, incluyendo la exploración de nuevas nanoestructuras metálicas de propiedades ópticas fácilmente adaptables. Esto hizo que la manipulación de procesos en la escala nanométrica se volviera más accesible.

Una de las aplicaciones que más ha impulsado el avance de este campo ha sido la dispersión Raman amplificada en superficie (SERS)^{19,20}, que utiliza el campo evanescente en la superficie de la nanoestructura, para amplificar la débil, pero específica señal Raman de moléculas. Sin embargo esta no ha sido la única aplicación. La utilización de interacciones entre metales y fluoróforos posee, entre otros, el gran potencial de aumentar la capacidad de detección de moléculas únicas fluorescentes.

Dada la versatilidad tanto de las partículas metálicas como de las sondas fluorescentes, las posibles combinaciones de propiedades han abierto un campo de exploración que incluye desde investigaciones básicas²¹⁻²³ hasta aplicaciones en sensado²⁴⁻²⁷, adquisición de imágenes^{28,29}, medicina³⁰⁻³², entre otros.

Siendo este un campo de gran actualidad, el presente trabajo se ha centrado en estudiar posibilidades de manipular la fluorescencia de moléculas por medio de nanopartículas

metálicas, y posibles aplicaciones. Se investigó por un lado la posibilidad de reducir la fotodegradación mediante un aumento controlado de la probabilidad de emisión de fotones de fluorescencia. La motivación en este caso fue obtener un mayor número de fotones de cada molécula. Por otro lado se investigaron aspectos de una influencia más indirecta, a través de calentamiento local producido a través de absorción de luz en las nanopartículas metálicas. Este último aspecto se investigó con el objetivo de obtener sondas modulables, que puedan proveer un mayor contraste en imágenes, y un nuevo método de sensado molecular.

1

Introducción

En esta introducción general se hace un compendio de conceptos físicos y fisicoquímicos necesarios para la lectura y comprensión del resto de la tesis. Asimismo se define gran parte de la nomenclatura usada. Los conceptos se presentan en forma básica y se proveen referencias para el lector que desee profundizarlos. Luego cada capítulo tiene su introducción donde se profundizan estos conceptos y se presentan otros, para ubicar cada parte del trabajo en su contexto particular.

1.1 Fluorescencia molecular

La fluorescencia es un proceso en el que una sustancia absorbe luz, para luego emitir luz de igual o menor energía¹¹. A nivel molecular, la energía proveniente del fotón absorbido excita un electrón a un orbital de mayor energía. En el proceso de decaimiento electrónico al orbital fundamental, la energía se libera en la forma de un fotón. En general, las moléculas poseen modos vibracionales de energías menores, pero no despreciables, en comparación a las involucradas en las transiciones electrónicas. Entre los eventos de absorción y emisión, la molécula puede perder energía a través de vibraciones. Este proceso se denomina relajación vibracional intramolecular y es responsable de que el fotón emitido pueda ser de menor energía al absorbido.

En la figura 1.1 se esquematiza el fenómeno de fluorescencia y se presentan las escalas temporales de los procesos moleculares involucrados en fluorescencia. La energía de los estados fundamental S_0 y excitado S_1 se grafican en función de una coordenada molecular simbólica, que representa conformaciones moleculares (la representación de superficies de potencial vs. coordenadas atómicas no es trivial para moléculas de más de 2 átomos).

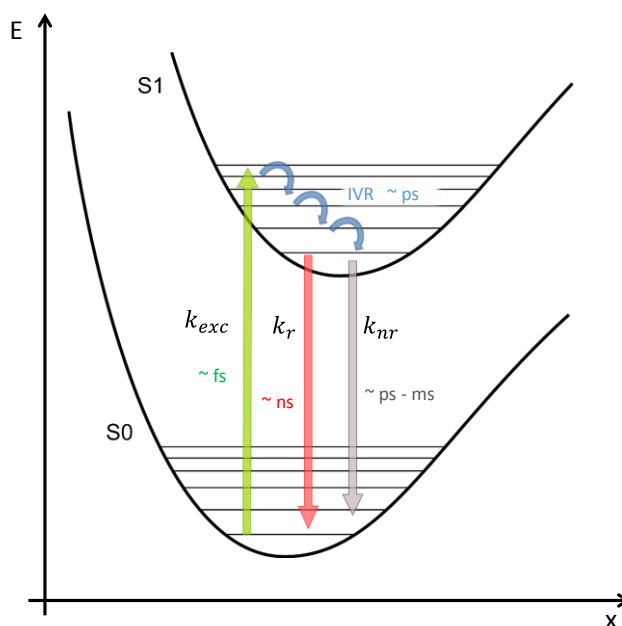


Figura 1.1 Descripción de dos niveles de la fluorescencia molecular. S_0 y S_1 representan los estados singletes fundamental y excitado, respectivamente. Los niveles están localizados verticalmente en un eje esquemático de energías (E). El eje horizontal representa una coordenada de conformaciones moleculares. .

La energía de estos orbitales posee una “escalera vibracional” de energías, representada por las líneas horizontales; es decir, la energía de un electrón en cada orbital varía dependiendo del modo vibracional en que se encuentre la molécula.

1.1.1 Absorción

La población de estados vibracionales excitados a temperatura ambiente es, de acuerdo a la distribución de Boltzmann, despreciable. Se puede considerar entonces que antes de la absorción del fotón, la molécula se encuentra en el nivel basal vibracional de S_0 .

El movimiento electrónico es típicamente mucho más rápido que el movimiento de los núcleos. La excitación de un electrón ocurre en femtosegundos (fs), prácticamente de modo instantáneo con respecto a las vibraciones moleculares que poseen períodos de centenas de fs a picosegundos (ps). En consecuencia, para que un fotón pueda ser absorbido, el estado vibracional basal de S_0 debe compartir la misma geometría molecular que algún nivel vibracional de S_1 , a la energía del fotón; esto es lo que se denomina una transición vertical. La excitación ocurre desde el estado vibracional basal de S_0 hacia uno o varios estados vibracionales de S_1 . La probabilidad relativa de cada transición hacia los distintos estados vibracionales de S_1 define el espectro de absorción de la molécula.

Se define la tasa de excitación electrónica k_{exc} a partir de la absorción de un fotón. Si se considera un conjunto de moléculas en solución, es posible determinar la sección eficaz de

absorción σ a partir de mediciones de absorbancia¹¹. En estas condiciones se puede calcular una tasa de excitación promedio como

$$k_{exc} = \sigma I \quad (1.1)$$

donde I es la irradiancia (potencia por unidad de área, W/m^2). Tanto I como σ deben considerarse en el mismo rango de longitudes de onda.

Si se considera el proceso en una molécula, las transiciones electrónicas tienen asociadas un dipolo de transición, cuya orientación es fija con respecto a la estructura molecular. La absorción puede considerarse como la interacción entre dicho dipolo y el campo eléctrico en la posición de la molécula. La tasa de excitación será proporcional a la intensidad de campo eléctrico paralela al dipolo de transición:

$$k_{exc} \propto |\mu \cdot E|^2 \quad (1.2)$$

1.1.2 Relajación vibracional

En general, estados de mayor energía se corresponden a distancias interatómicas mayores. En la figura 1.1, esto se representa con el estado S1 desplazado hacia valores mayores de x , con respecto a S0. Por este motivo, una transición vertical desde el estado vibracional basal de S0, dejará típicamente a la molécula en algún estado vibracional excitado de S1. Seguidamente la molécula termaliza al estado vibracional basal de S1, en el proceso denominado relajación vibracional intramolecular (IVR, intramolecular vibrational relaxation) que ocurre en un tiempo del orden de los ps.

1.1.3 Relajación electrónica

Para decaer al estado electrónico fundamental, la molécula debe perder una cantidad mayor de energía. Existen dos caminos para que la molécula libere la energía extra y regrese a su estado electrónico fundamental: de forma radiativa, es decir con la emisión de un fotón, o de forma no-radiativa.

El decaimiento radiativo ocurre desde el estado vibracional basal de S1, hacia uno o varios estados vibracionales de S0. La probabilidad relativa de estas transiciones define el espectro de emisión de fluorescencia. La tasa de decaimiento radiativo se denomina k_r y la regla de oro de Fermi expresa los factores que la controlan:

$$k_r = \left[\frac{\langle i|H|f \rangle^2}{\hbar^2} \right] \rho(\nu) \quad (1.3)$$

El primer factor se compone de la interacción entre el estado inicial $\langle i|$ correspondiente a la molécula excitada en ausencia de fotones y el estado final $\langle f|$ correspondiente a la

molécula relajada más un fotón, a través del Hamiltoniano H . Este factor describe el solapamiento de funciones de onda entre los estados inicial y final, e.d. una cualidad intrínseca de la molécula para su interacción con la radiación. El segundo factor, la densidad de estados fotónicos $\rho(\nu)$, es extrínseco a la molécula y da cuenta de los estados disponibles para la existencia de un fotón en el medio.

El decaimiento no-radiativo ocurre mediante vibraciones moleculares y colisiones con moléculas del entorno. La tasa de decaimiento no-radiativo se denomina k_{nr} .

1.1.4 Tiempo de vida media de fluorescencia

Los caminos de decaimiento radiativo y no-radiativo son independientes. En consecuencia, la tasa de decaimiento total está dada por la suma de $k_r + k_{nr}$. Se define como tiempo de vida media de fluorescencia τ al tiempo de residencia promedio en el estado excitado:

$$\tau = \frac{1}{k_r + k_{nr}} \quad (1.4)$$

El tiempo de vida media de fluorescencia impone el de límite $1/\tau$ a la tasa máxima de excitación, denominada de saturación.

Para las moléculas orgánicas el tiempo de vida puede rondar entre las décimas de picosegundos a los cientos de nanosegundos¹¹, y es una característica de cada fluoróforo, por lo que puede ser utilizado como medida para diferenciar especies.

1.1.5 Rendimiento de fluorescencia

La competencia entre decaimiento radiativo y no-radiativo determina la probabilidad de una molécula de decaer emitiendo un fotón, que se denomina rendimiento de fluorescencia:

$$Q_r = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} = k_r \tau \quad (1.5)$$

Alternativamente si se considera un ensamble de moléculas, Q_r define qué fracción de moléculas retorna en cada ciclo de excitación al estado fundamental S_0 emitiendo fotones.

Se denomina fluoróforos a las sustancias que poseen rendimientos de fluorescencia apreciables, típicamente mayores al 1%.

1.1.6 Intensidad de fluorescencia

A tasas de excitación por debajo del límite de saturación, la intensidad de fluorescencia I_F emitida por una molécula está dada por:

$$I_F = k_{exc} Q_r \quad (1.6)$$

1.1.7 Cruce entre sistemas

Hasta aquí se consideraron ciclos de excitación y decaimiento electrónicos sin cambios de espín, es decir dentro del sistema de singletes (S_0 - S_1). Sin embargo es posible que el electrón excitado cambie su espín dejando a la molécula en un estado excitado triplete T_1 . Este proceso se denomina cruce entre sistemas (ISC, inter-system crossing) y su tasa de ocurrencia se denomina k_{isc} (figura 1.2).

Para que el cruce entre sistemas pueda ocurrir, es necesario que i) exista algún mecanismo que permita desacoplar los espines electrónicos, como por ejemplo acoplamiento spin-órbita, y ii) que S_1 y T_1 posean estados vibracionales que compartan la misma energía y geometría molecular.

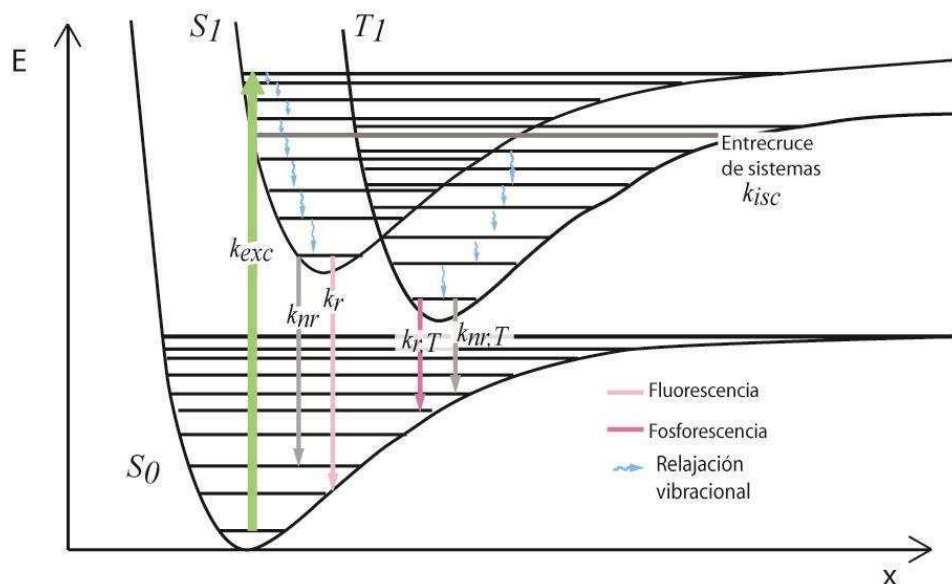


Figura 1.2 Descripción de dos niveles de la fluorescencia molecular. S_0 y S_1 representan los estados singletes fundamental y excitado, respectivamente, mientras que T_1 es el estado triplete. En gris se representa una energía para la cual podría existir entrecruzamiento.

Dado que el proceso de cambio de espín es en general poco probable, todas las transiciones singlete-triplete son mucho más lentas que las transiciones S0-S1^{11,33}. Esto significa que una molécula típicamente i) realice muchos ciclos de excitación-decaimiento entre singletes antes de pasar a T1, y ii) que los tiempos de vida media de los tripletes sean mucho más largos que los de singletes, típicamente en el rango de los microsegundos a fracciones de segundos.

En rigor, k_{ISC} debe incluirse en los cálculos de τ y Q_r , pero para el caso de fluoróforos, es correcto despreciar k_{ISC} frente a la suma de $k_r + k_{nr}$.

1.1.8 Fosforescencia

Análogamente al decaimiento desde S1, el decaimiento desde T1 puede ocurrir de modo no-radiativo o radiativo. La emisión de fotones desde T1 se llama fosforescencia. Se define el rendimiento de fosforescencia Q_p :

$$Q_p = \frac{k_{ISC}}{(k_r + k_{nr} + k_{ISC})} \frac{k_{r,T}}{(k_{r,T} + k_{nr,T})} \quad (1.7)$$

Las sustancias fosforescentes son aquellas que poseen rendimientos apreciables de fosforescencia.

1.1.9 Emisión intermitente (blinking) – saturación por tripletes

Cuando se observa la emisión de fluorescencia de una única molécula, las excursiones a T1 pueden evidenciarse directamente como interrupciones en la emisión. Este efecto es conocido como *blinking* o parpadeo³⁴. Analizando la estadística de los períodos de emisión y no emisión en distintas condiciones es posible obtener todas las tasas de transición involucradas^{35,36}.

Otra consecuencia de los períodos de no-emisión es que la máxima intensidad de fluorescencia alcanzable se limita a valores menores que los predichos por el tiempo de vida media de fluorescencia³⁶.

$$I_{F,sat} = \frac{k_r}{2 + \left(\frac{k_{ISC}}{k_{r,T} + k_{nr,T}} \right)} \quad (1.8)$$

Este fenómeno se conoce como saturación por tripletes.

1.1.10 Mediciones de tiempo de vida media de fluorescencia por conteo de fotones individuales correlacionados en el tiempo

Si se considera un ensamble de fluoróforos excitado con un pulso de luz, una cantidad de moléculas $[A^*]$ pasarán al estado S1 por absorción de fotones. La velocidad de despoblación del estado excitado, puede ser descrita por la ecuación:

$$-\frac{d[A^*]}{dt} = (k_r + k_{nr})[A^*]$$

Integrando esta ecuación y se obtiene:

$$[A^*] = [A^*]_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \quad (1.9)$$

Donde $[A^*]_0$ es la concentración de moléculas excitadas a tiempo cero y τ el tiempo de vida del estado excitado, que está dado por (1.4).

El conteo de fotones individuales correlacionados en el tiempo (TCSPC- *Time Correlated Single Photon Counting*)³⁷ es una técnica para medir curvas de decaimiento de fluorescencia desarrollada por Bollinger y Thomas³⁸ en los años 60 y ampliamente aplicada desde entonces. TCSPC se basa en excitar fluoróforos con pulsos, detectar fotones individuales de fluorescencia y computar su tiempo de arribo con respecto al pulso anterior de excitación.

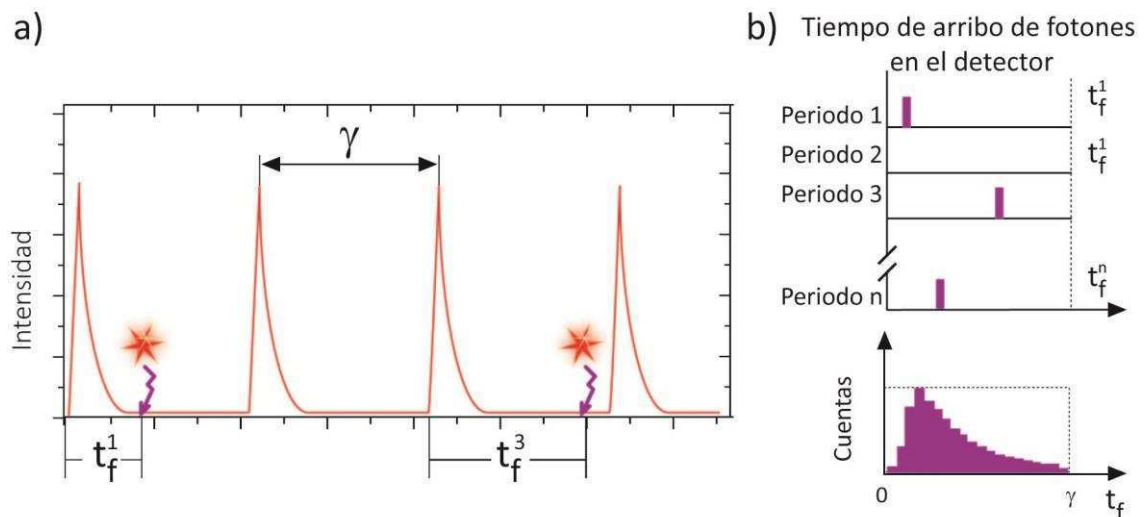


Figura 1.3 Principio de conteo de fotones individuales correlacionados en el tiempo. a) Las curvas representan los pulsos de excitación y las flechas el tiempo de arribo de un fotón luego de ser excitado t_f^i . Dadas las condiciones de excitación también existen periodos donde no se registran eventos. b) La curva de decaimiento de fluorescencia es determinada a partir del histograma conformado por los tiempos de arribo detectados t_f .³⁹

Para una correcta medición deben cumplirse las siguientes condiciones: i) el tiempo entre pulsos (γ) debe ser varias veces más largo que el tiempo de vida media de fluorescencia (figura 1.3 a), de modo de asegurar que la molécula decaiga a su estado fundamental entre pulsos, ii) la duración de los pulsos debe ser corta con respecto al tiempo de vida media de fluorescencia para poder observar correctamente el decaimiento, y iii) la intensidad de fluorescencia debe ser suficientemente baja, de manera que la probabilidad de detectar dos fotones entre pulsos sea despreciable³⁴.

Bajo estas condiciones es posible computar, cada vez que se detecta un fotón, el tiempo transcurrido desde el último pulso de excitación. La curva de decaimiento puede ser obtenida realizando un histograma de los tiempos de arribo detectados, t_f (figura 1.3, b)).

1.1.11 Fotoblanqueo

Otra posibilidad para una molécula foto-excitada es utilizar la energía extra para cruzar barreras de potencial para alguna transformación química. Se denomina fotoblanqueo al proceso en el que un fluoróforo sufre una alteración fotoquímica que lo deja inactivo en términos de fluorescencia. Una molécula fotoblanqueada ya no absorbe y/o no emite luz en el rango de trabajo⁴⁰.

Si se observa la emisión de fluorescencia de moléculas individuales, el fotoblanqueo se evidencia como una interrupción abrupta de la emisión, que se diferencia del blinking por ser permanente. La ocurrencia de una reacción fotoquímica de fotoblanqueo es un fenómeno estocástico. En consecuencia, la intensidad de fluorescencia de un ensamble de moléculas decae exponencialmente en el tiempo a medida que más y más fluoróforos se fotoblanquean (figura 1.4).

El fotoblanqueo limita el número de ciclos de excitación-relajación que una molécula puede realizar, y en consecuencia el número de fotones de fluorescencia que puede entregar. Este fenómeno suele ser poco deseado ya que limita la información obtenible a partir de mediciones de fluorescencia, como microscopía, espectroscopía, sensores, ensayos, experimentos de seguimiento (tracking) de moléculas únicas o para algunas técnicas de superresolución, como STED⁴¹, entre otros.

Si bien en general es un efecto negativo, se ha sabido aprovechar para diseñar algunas técnicas exitosas, como la recuperación de fluorescencia luego del fotoblanqueo (FRAP)⁴²⁻⁴⁴, o microfotólisis de fluorescencia⁴⁵.

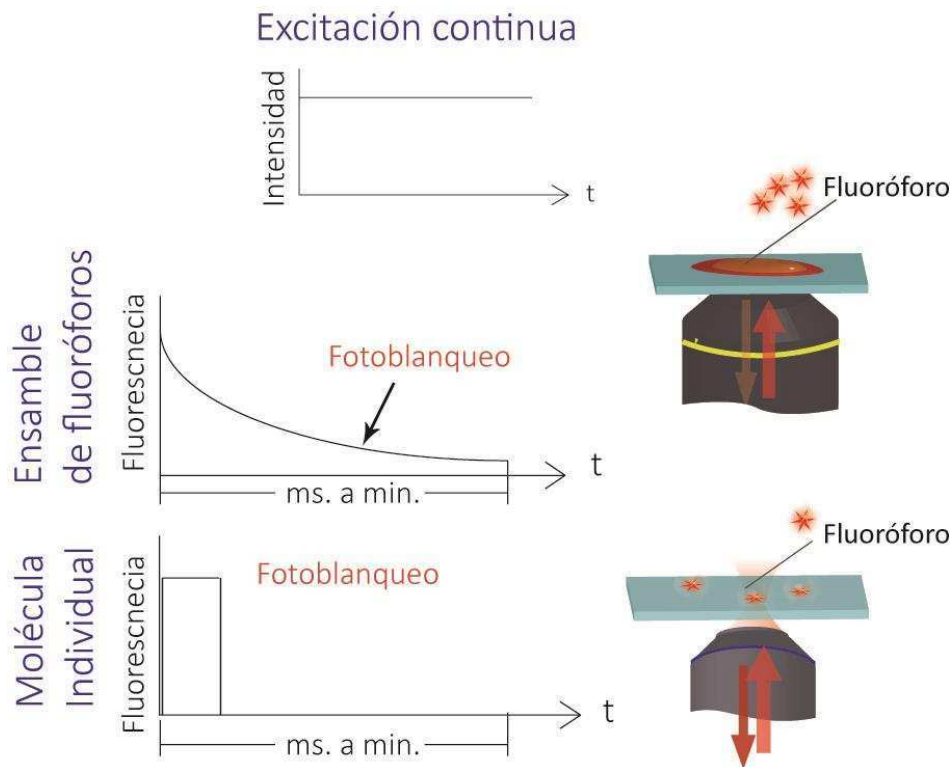


Figura 1.4 Fotoblanqueo bajo excitación constante, la intensidad de fluorescencia de un ensamble de moléculas decae continuamente en el tiempo. En el caso de una única molécula, el fotoblanqueo se evidencia por una interrupción abrupta de la emisión.

1.1.12 Quenching

Se denomina *quenching* a la disminución de Q_r debido a la interacción con un agente externo, casi siempre debido a un aumento exclusivo de k_{nr} . El *quenching* puede ocurrir por diferentes mecanismos, mediante colisiones, o por transferencia de energía desde el estado excitado a otra molécula o material.

Una molécula en su estado fundamental también puede formar complejos no fluorescentes con moléculas presentes en la solución, produciendo una disminución en la señal, aunque no suele llamarse quenching a este tipo de interacciones.

1.1.13 Efecto de la temperatura

Las transiciones electrónicas involucradas en el proceso de fluorescencia dependen de la temperatura, debido a procesos intramoleculares, a interacciones con las moléculas del entorno o a cambios en las propiedades del solvente. El efecto global de la temperatura sobre la fluorescencia puede ser variado.

Un comportamiento general consiste en el aumento de k_{nr} a medida que aumenta la temperatura. Todos los procesos de decaimiento no-radiativos relacionados con la agitación térmica (colisiones con las moléculas del solvente, vibraciones intramoleculares, rotaciones, etc.) son más eficientes a altas temperaturas¹¹. Al igual que un “quencheo” se produce una disminución simultánea de Q_r y τ .

Por otro lado, el proceso de fluorescencia puede ser influenciado indirectamente por varias propiedades del solvente, las cuales a su vez dependen de la temperatura^{46,47}, como por ejemplo la polaridad⁴⁸, pH⁴⁹ y la viscosidad⁵⁰. Por ejemplo al aumentar la temperatura, la viscosidad disminuye, reduciendo la rigidez de la estructura química del fluoróforo. Típicamente cuando un fluoróforo es menos rígido su eficiencia cuántica disminuye⁵¹ y su espectro de emisión sufre un corrimiento al rojo⁵². Un solvente polar es capaz de estabilizar el estado excitado, y correr el espectro de emisión hacia al rojo. Asimismo, un aumento de temperatura dilata al solvente y reduce dicha estabilización, dando lugar a un corrimiento del espectro de emisión al azul (corrimiento termocrómico)^{53,54}.

Si bien se entienden los comportamientos y se observan tendencias claras para familias de fluoróforos, resulta casi imposible predecir el comportamiento de una molécula particular frente a cambios de temperatura. Esto se debe a la gran cantidad de variables que pueden afectar la respuesta de un fluoróforo ante la temperatura, algunas produciendo efectos contrarios. En general esta dependencia se mide experimentalmente para cada molécula y en cada medio.

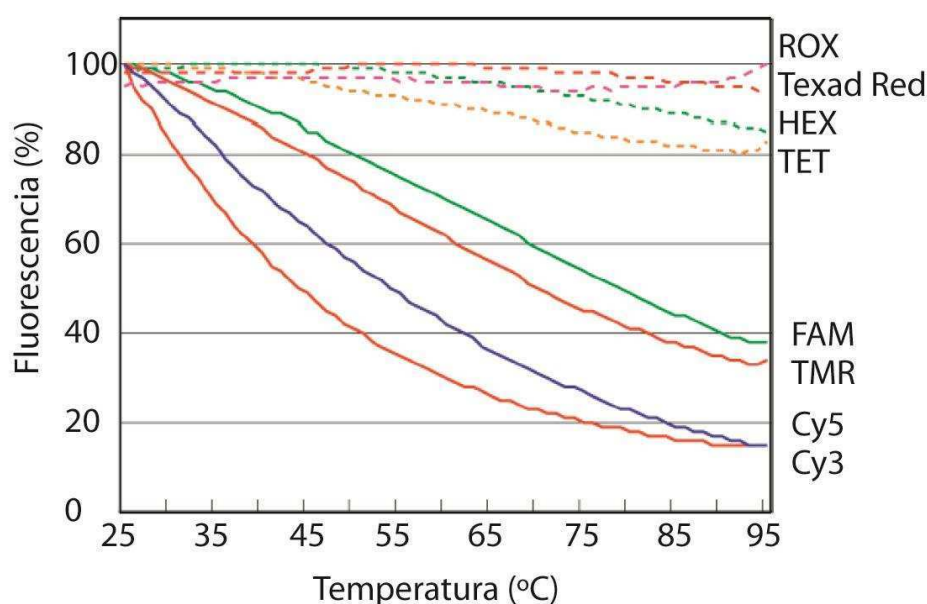


Figura 1.5 Efecto de la temperatura en la intensidad de fluorescencia de fluoróforos. Los fluoróforos TET, HEX, ROX y Texas red no presentan un cambio significativo, mientras que FAM y FMR presentan una disminución moderada pero constante con la temperatura. Cy3 y Cy5 manifiestan un detrimento marcado de su fluorescencia al aumentar la temperatura. Figura extraída del artículo de Marras⁵⁵.

En la figura 1.5 se presenta a modo de ejemplo la respuesta ante cambios de temperatura de la intensidad de fluorescencia de ocho fluoróforos comúnmente utilizados⁵⁵. Se observa como algunos prácticamente mantienen su intensidad constante (Texas Red) mientras otros decaen hasta un 80% a 90°C respecto a su señal a temperatura ambiente.

1.2 Nanopartículas Metálicas:

Las nanopartículas metálicas (NPs), en particular de plata (Ag) y oro (Au), han atraído especial atención debido a sus propiedades ópticas dependientes del tamaño y forma. Desde el pionero trabajo de Faraday en 1857⁵⁶, donde realizó un estudio sistemático de la síntesis y colores del oro coloidal, se han publicado cientos de trabajos científicos sobre la síntesis, modificación, propiedades y ensamblado de NPs de casi cualquier forma y tamaño^{31,57-61}. En la figura 1.6 se presentan algunos ejemplos de NPs de distintas geometrías y sus respectivos espectros de extinción.

Estas propiedades ópticas están determinadas por la interacción colectiva de los electrones de conducción con la radiación en el rango visible e infrarrojo⁶² cercano (vis-NIR), y dependen fuertemente de la composición, la forma y el tamaño de las nanopartículas, como así también de las propiedades ópticas del entorno.

1.2.1 Plasmones superficiales

En presencia de un campo eléctrico los electrones de conducción de un metal se desplazan de su posición de equilibrio. Los núcleos positivos, al ser mucho más masivos se desplazan mucho más lentamente y pueden considerarse estáticos. Este fenómeno es el responsable de que a nivel macroscópico sea usual considerar que el campo eléctrico no penetra en los metales; los electrones desplazados hacia o desde la superficie generan una polarización superficial que apantalla al campo en el seno del metal. A nivel microscópico existe una región donde sí penetra el campo, denominada longitud de penetración.

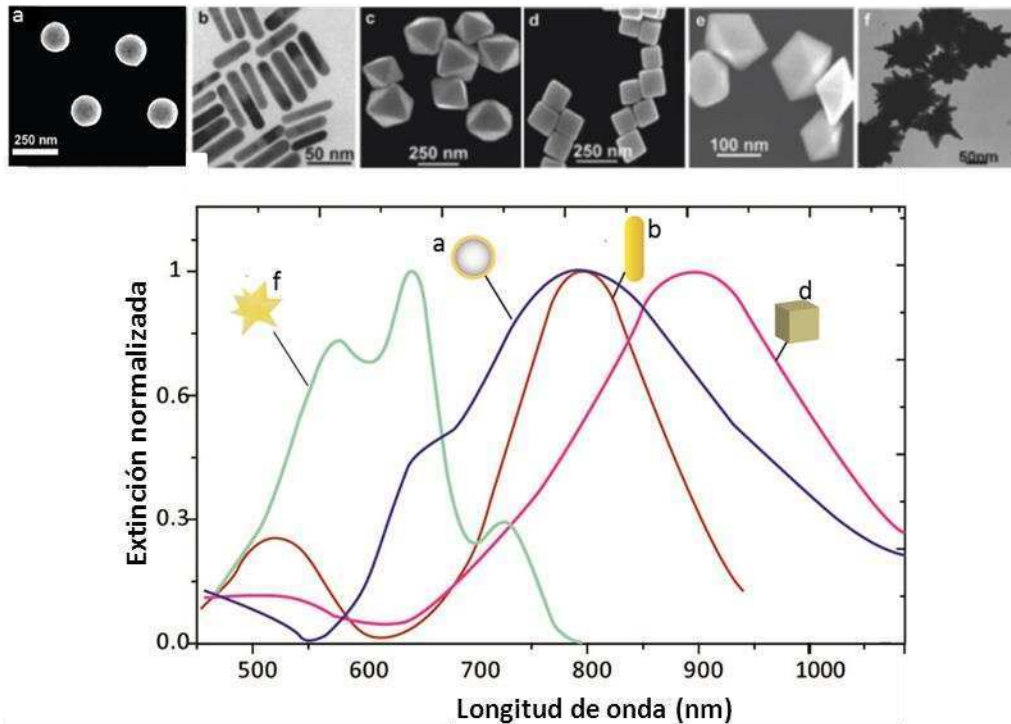


Figura 1.6 Panel Superior: Imágenes de microscopía electrónica que ilustran la gran diversidad de morfologías posibles de nanopartículas de oro. a-f) nanopartículas coloidales sintetizadas utilizando métodos químicos de nucleación y crecimiento⁶³. **Panel Inferior:** Espectros de extinción para geometrías particulares, a) Cáscaras de oro⁶⁴ b) Nanocilindros de oro⁶⁵, d) nano-cajas⁶⁶, f) Nano estrellas de oro⁶⁷.

Conjuntamente con el desplazamiento electrónico se establece una fuerza que impulsa a los electrones hacia sus posiciones de equilibrio alrededor de los núcleos⁶⁸. Si el campo eléctrico es estático, se llega a una separación de equilibrio. En cambio si el campo eléctrico es variable en el tiempo, se produce un movimiento oscilatorio colectivo de electrones que para el caso de metales posee típicamente frecuencias de resonancia en el rango óptico. Esta oscilación colectiva y resonante de electrones superficiales se denomina plasmón superficial. El término plasmón surgió para denominar al cuanto fundamental de energía de esas oscilaciones⁶⁹, pero hoy en día se lo usa más que nada para referirse a las resonancias en sí mismas. La mayoría de los efectos “plasmónicos”, y en particular los involucrados en este trabajo pueden ser tratados clásicamente.

Si se excita un plasmón superficial con radiación de la frecuencia de resonancia, se produce un acoplamiento entre las ondas electromagnéticas de la luz, y las ondas mecánicas de movimiento electrónico. La luz mueve a los electrones, y los electrones irradian luz. Este acoplamiento mecánico-electromagnético se denomina en general polaritón. En el caso en que la onda mecánica es un plasmón, se llama plasmón-polaritón. Si se tratara de oscilaciones de los núcleos, como puede suceder en un cristal iónico por ejemplo, se lo llama fonón-polaritón. Muchas veces por simplicidad se usa simplemente el

término plasmón, y se obvia polaritón. En este trabajo trataremos exclusivamente con plasmones-polaritones ya que siempre serán excitados con luz.

Los plasmones superficiales son ondas propagantes. Su distancia de propagación es limitada por pérdidas (absorción) en el metal. Típicamente los plasmones superficiales en Au o Ag se propagan algunas longitudes de onda de los plasmones correspondientes, lo que equivale a longitudes de algunos pocos micrómetros hasta algunas decenas de micrómetros, dependiendo del metal y la longitud de onda de la luz usada.

1.2.2 Plasmones superficiales localizados

En el caso de que el metal se encuentre estructurado geoméricamente en dimensiones comparables a la distancia de propagación de los plasmones superficiales, surgen nuevas condiciones de resonancia. En el caso de nanopartículas, la frecuencia de resonancia de los plasmones superficiales dependerá fuertemente de la forma. De modo análogo a una cavidad, a ciertas frecuencias los plasmones no podrán sostenerse debido a interferencias destructivas, mientras que para otras frecuencias se generaran fuertes resonancias por interferencia constructiva de plasmones superficiales.

Otro efecto de tamaño cuando en algún sitio las dimensiones de la nanopartícula son menores que la longitud de penetración. En ese caso las resonancias plasmónicas pueden verse modificadas por efectos de volumen.

En general, a los plasmones en nanopartículas se los denomina plasmones superficiales localizados (LSPR, localized surface plasmon resonance)⁷⁰.

En la figura 1.7 a) se muestra esquemáticamente la resonancia plasmónica de una nanopartícula esférica, y en la figura 1.7 b) el campo eléctrico asociado, en este caso dipolar.

1.2.3 Absorción y dispersión de luz

Los plasmones dan origen a una gran absorción y dispersión de luz a la frecuencia de resonancia. En resonancia, la amplitud de movimiento electrónico es máxima, lo cual da origen simultáneamente a una máxima absorción por pérdidas óhmicas en el metal, y a una máxima dispersión de luz. Esto se evidencia claramente por ejemplo en el espectro de extinción. Para el caso de AuNP esféricas en agua, la resonancia ocurre entre 520 y 580 nm, dependiendo del tamaño (figura 1.7 c y d).

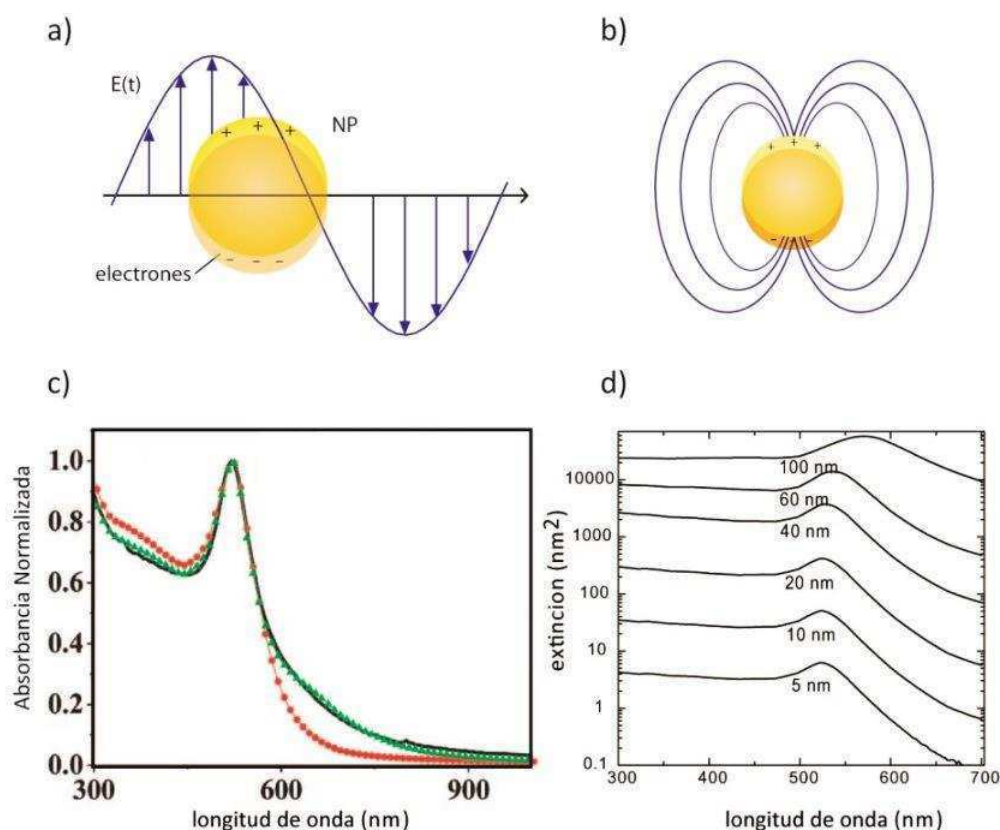


Figura 1.7 a) Representación esquemática del movimiento electrónico en un plasmón superficial en una nanopartícula esférica. b) Líneas de campo asociadas, que en el caso de la esfera pequeña poseerá el patrón de un dipolo. c) Comparación de espectros de resonancia calculadas por la aproximación de Mie (círculos rojos) y Gans-Mie (círculos verdes) con respecto a espectros de absorción medido (línea negra) en agua para una AuNP de radio promedio 7 nm⁷¹. d) Espectros de extinción calculados para distintos tamaños de nanopartículas esféricas de oro.

1.2.4 Modelado y cálculo teórico de resonancias plasmónicas

Es importante notar que toda la descripción microscópica de plasmones no es necesaria para calcular las propiedades ópticas de nanopartículas o sistemas de nanopartículas. Todas las propiedades, campo cercano y campo lejano, pueden modelarse resolviendo las ecuaciones de Maxwell. Los efectos de resonancias plasmónicas quedan incluidos en la función dieléctrica del metal. Si bien en general es necesaria una solución numérica, para ciertas geometrías simples o bajo ciertas aproximaciones, es posible encontrar una solución analítica.

Para el caso de NPs más pequeñas que la longitud de onda de la luz, la aproximación de Rayleigh, donde se desprecian contribuciones mayores que la dipolar (también conocida como aproximación dipolar o cuasi-estática), permite estimar LSPRs mediante una fórmula

sencilla y parámetros conocidos. Bajo esta aproximación, la polarizabilidad de pequeñas NPs está dada por

$$\alpha(\lambda) = 4\pi\epsilon_0 R^3 \left| \frac{\epsilon(\lambda) - \epsilon_m(\lambda)}{\epsilon(\lambda) + 2\epsilon_m(\lambda)} \right| \quad (1.11)$$

Donde ϵ_0 es la permitividad del vacío, R es el radio de la partícula, ϵ_m y $\epsilon = \epsilon' + i\epsilon''$ son la permitividades relativas del medio circundante (considerada real, es decir un medio sin absorción) y de la partícula, respectivamente⁷⁰. Ambas permitividades dependen de la frecuencia.

Las secciones eficaces de dispersión y absorción quedan definidas como:

$$\begin{aligned} \sigma_{abs} &= \frac{k}{\epsilon_0} \text{Im}(\alpha) \\ \sigma_{sca} &= \frac{k^4}{6\pi\epsilon_0^2} |\alpha|^2 \end{aligned} \quad (1.12)$$

En este modelo surge la condición de resonancia, dado por el denominador de la ecuación (1.12), que se minimiza cuando $\epsilon' = -2\epsilon_m$. Esto permite explicar el origen de los distintos colores de soluciones de nanopartículas pequeñas de distintos metales.

Sin embargo, obviamente, este modelo falla en que no da cuenta de la dependencia espectral con el tamaño de las partículas, que se observa experimentalmente.

Para partículas de forma esférica, la teoría de Mie^{72,73} ofrece un modelo analítico completo como solución a este problema. Mie resuelve las ecuaciones de Maxwell en coordenadas esféricas y provee expresiones exactas para las secciones eficaces de absorción y dispersión, para cualquier partícula esférica (figura 1.7, c y d).

Para calcular el espectro de partículas esferoides alargadas, es necesario tener en cuenta la orientación con respecto al campo oscilante. Gans derivó una expresión para el coeficiente de extinción σ_{ext} , que se conoce comúnmente como extensión de la solución de Mie, o teoría de Gans-Mie⁷⁴.

Basado en estas ecuaciones, se han realizado varios estudios sobre la dependencia de la posición del plasmón con respecto a la relación de aspecto^{73,75,76}. En la figura 1.8 se presentan algunos resultados medidos concordantes con la teoría.

Sin embargo, para modelar NPs de geometrías más complicadas es necesario recurrir a métodos numéricos para resolver las ecuaciones de Maxwell. Con el desarrollo de las computadoras, este tipo de métodos han tomado especial importancia y hoy en día es posible modelar prácticamente cualquier situación experimental. Entre los métodos más populares y exitosos se destacan la aproximación por dipolos discretos (DDA), el método de diferencias finitas en el tiempo (FDTD)⁷⁰ y el método de elementos de contorno (BEM)⁷⁷.

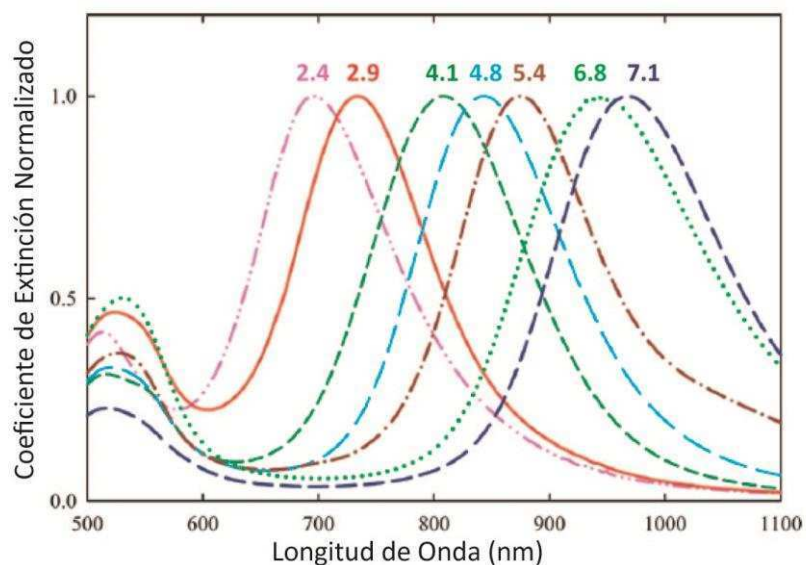


Figura 1.8 Espectros de extinción normalizados de 7 muestras distintas de nanocilindros de oro en agua, cuya relación de aspecto se detalla en los máximos de cada curva. Los espectros se normalizaron por el valor tomado en el máximo de cada curva.⁷⁸

La posibilidad de poder predecir las propiedades ópticas de distintas NPs y sistemas de NPs, facilita el diseño de estructuras que posean características ópticas acordes a las necesidades de cada experimento. Esta versatilidad ha hecho aún más creciente el interés en la fabricación de nuevas nanoestructuras^{58,79}.

1.2.5 Campo cercano

Los plasmones producen también un fuerte impacto tanto en la respuesta del campo cercano de las AuNPs^{80,81}. Se entiende como campo cercano a las componentes evanescentes del campo eléctrico sobre la superficie de las NPs. Estos campos no se propagan y son indetectables en el campo lejano, sin embargo dominan las interacciones ópticas entre nanopartículas y con moléculas colocadas a distancia más pequeñas que la longitud de onda de la luz⁷⁷.

La posibilidad de adaptar el campo cercano en resonancias plasmónicas, mediante la composición, el tamaño y la forma de nanopartículas metálicas, permite “manipular” la luz en la nanoescala. Colocando por ejemplo, sondas fluorescentes en las inmediaciones de las nanopartículas es posible excitar selectivamente fluoróforos en regiones mucho más pequeñas que la longitud de onda de luz^{82,83}, o redireccionar la emisión de fluoróforos^{84,85}. En este contexto, la interacción entre nanopartículas y fluoróforos se ha utilizado e investigado intensivamente en los últimos años⁸⁶⁻⁸⁸.

1.2.6 Acoplamiento plasmónico

Si dos NPs se encuentran suficientemente cerca, es posible que los plasmones de cada una de ellas interactúen, creando modos LSPR acoplados; la carga superficial de una NP polariza a la vecina y vice-versa. Las frecuencias de resonancia de las NPs acopladas dependen fuertemente de la configuración y la distancia entre ellas, presentando corrimientos espectrales, generalmente al rojo, con respecto a las NPs individuales⁸⁹.

Por otro lado, el campo eléctrico asociado se ve intensificado y localizado en la región inter-partícula con respecto al campo de partículas aisladas (figura 1.9 a, b)⁷⁰.

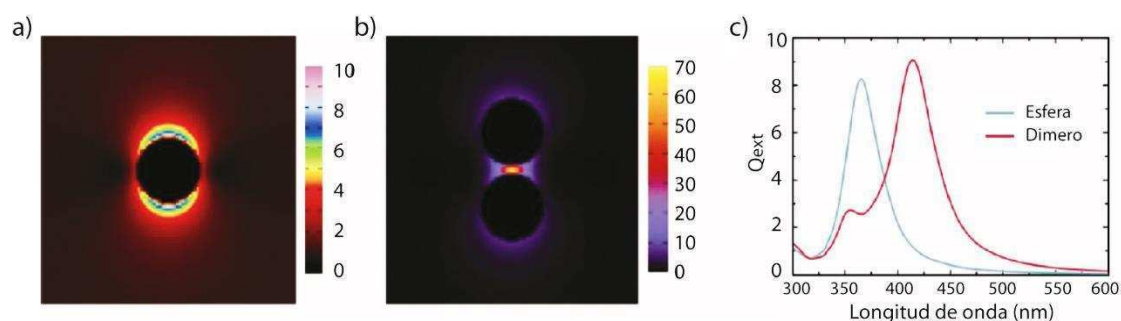


Figura 1.9 a,b) Mapas de intensidad de campo eléctrico normalizado por la intensidad de campo incidente, alrededor de una NP esférica de plata con $D=25\text{nm}$ (a) de un par de partículas del mismo diámetro separadas 5nm (b). El campo incidente se encuentra polarizado a lo largo del eje mayor de dímero (verticalmente). c) Espectro de extinción de una NP esférica y del par de NPs mostradas en a) y b). Los cálculos se realizaron utilizando la Teoría Generalizada de Multipartículas de Mie.

1.2.7 Generación de calor por medio de nanopartículas metálicas

Las NPs metálicas son fluoróforos muy ineficientes, con valores de Q_r del orden de 10^{-6} . En consecuencia, prácticamente toda la energía absorbida es transformada en calor. La conversión de la energía de un fotón en energía térmica dentro de un NP metálica puede ser resumida en tres procesos subsecuentes. En primer lugar, luego de la absorción de un fotón, los electrones se ponen en movimiento dando lugar a una resonancia plasmónica que termaliza rápidamente ($\sim 100\text{fs}$) a una distribución de Fermi-Dirac⁹⁰. Inmediatamente después, tiene lugar la termalización electrón-fonón, que ocurre en una escala temporal de algunos picosegundos^{91,92}. En este punto, la NP se encuentra internamente en equilibrio térmico a una temperatura uniforme, pero no en equilibrio con el medio que la rodea, que aún permanece a temperatura ambiente. Finalmente la difusión térmica desde la NP caliente al medio, sucede en escalas temporales considerablemente más largas en

comparación con los procesos anteriores. De esta forma la NP se enfría a costa de calentar al medio. El tiempo de este proceso de la capacidad calorífica y de la conductividad térmica del medio, y se encuentra aproximadamente entre una a varias centenas de 100 ps⁹³.

En esta descripción simplificada no se han considerado el solapamiento y competencia de los mecanismos de enfriamiento, como sí sucede en la realidad. Sin embargo, la gran diferencia de escalas temporales entre ellos, permite identificar a grandes rasgos, dos regímenes posibles de calentamiento de una NP^{90,93}, según se use para calentar una iluminación continua o de pulsos cortos en relación al tiempo de transferencia de calor al medio^{94,95}.

Bajo iluminación continua el calor generado por la absorción de un fotón, es transferido al medio, y luego de un periodo transitorio, se genera un campo de temperaturas estacionario. Si bien la transferencia de calor al medio circundante tiene lugar en unos cientos de ps, la formación de un perfil estacionario de temperaturas requiere tiempos considerablemente mayores, por ejemplo para una NP en agua del orden de algunos 100 ns.

Si en cambio la iluminación es pulsada, con pulsos del orden de los tiempos característicos de la transferencia de calor, la NP se calienta y se enfría, antes que el medio pueda calentarse. En este caso la energía es disipada en forma de ondas acústicas locales, que se propagan de la NP al medio, y finalmente se disipan en forma de calor. Incluso, para pulsos de mayor energía, podrían suceder fenómenos como la cavitación y la formación de burbujas. La descripción de la termodinámica en las vecindades de NPs metálicas excitadas con iluminación pulsada, es un problema que se investiga activamente en la actualidad^{96,97}.

1.2.8 Campo de temperatura alrededor de una nanopartícula calentada plasmónicamente

1.2.8.1 Potencia de calentamiento de NPs

La potencia absorbida (y por lo tanto liberada) por una NP puede ser expresada a partir de la sección eficaz de absorción σ_{abs} ,

$$Q = \sigma_{abs} I \quad (1.15)$$

Donde I es la irradiancia de la luz incidente (potencia por unidad de área), que dependerá de la configuración particular del experimento (tamaño del haz de excitación, potencia de la luz de excitación).

A nivel microscópico la generación de calor también puede ser derivada de la densidad de potencia ($q(\mathbf{r})$) dentro de la NP, e integrándola en el volumen de la NP $Q = \int q(\mathbf{r}) d\mathbf{r}$.

Considerando un calentamiento originado por efecto Joule, la densidad de potencia queda expresada como⁹⁸:

$$q(\mathbf{r}) = \frac{1}{2} \text{Re}[\mathbf{J}(\mathbf{r}) \cdot \mathbf{E}(\mathbf{r})] \quad (1.16)$$

Donde $\mathbf{J}(\mathbf{r})$ es la amplitud compleja de la densidad de corriente dentro de la NP, que a su vez puede ser expresada como $\mathbf{J}(\mathbf{r}) = i\omega\mathbf{P}$, con $\mathbf{P} = \varepsilon_0\varepsilon(\omega)\mathbf{E}$. Entonces, se puede reescribir (1.16) como:

$$q(\mathbf{r}) = \frac{\omega}{2} \text{Im}(\varepsilon_0\varepsilon(\omega)) |\mathbf{E}(\mathbf{r})|^2 \quad (1.17)$$

Por lo tanto la generación de calor es directamente proporcional al cuadrado del campo eléctrico dentro del metal.

En la práctica existen dos maneras de calcular la potencia Q emitida por la NP. En aquellos casos donde es posible conocer la sección eficaz de absorción (como en el caso de NPs esféricas, por ejemplo, utilizando las ecuaciones 1.11 y 1.12), Q puede ser estimado utilizando la ecuación 1.15. Sin embargo, para situaciones donde sea imposible determinar experimentalmente σ_{abs} será necesario recurrir a cálculos computacionales, bien para determinar σ_{abs} o para obtener $\mathbf{E}(\mathbf{r})$.

1.2.8.2 Perfil de temperaturas

A diferencia de la potencia de calentamiento de las NPs, que es un problema definido por la interacción entre la NP y la radiación, la determinación de la distribución de temperaturas en el espacio se basa únicamente en la resolución de la ecuación de calor:

$$\rho(\mathbf{r})c(\mathbf{r}) \frac{\partial T(\mathbf{r},t)}{\partial t} = \nabla k(\mathbf{r})\nabla T(\mathbf{r},t) + Q(\mathbf{r},t) \quad (1.18)$$

Donde, \mathbf{r} y t son las coordenadas espaciales y el tiempo, respectivamente. $T(\mathbf{r},t)$ es la temperatura local, y $\rho(\mathbf{r})$, $c(\mathbf{r})$ y $k(\mathbf{r})$ son la densidad, el calor específico y la conductividad térmica del medio en que se encuentra la NP, respectivamente.

Considerando el estado estacionario la ecuación se ve simplificada a:

$$\begin{aligned} \nabla k(\mathbf{r})\nabla T(\mathbf{r}) &= -Q(\mathbf{r}) && \text{dentro de la NP} \\ \nabla k(\mathbf{r})\nabla T(\mathbf{r}) &= 0 && \text{fuera de la NP} \end{aligned} \quad (1.19)$$

Nuevamente, la limitación para resolver este sistema analíticamente dependerá de la geometría de la partícula. Para el caso más sencillo de una partícula esférica de radio R inmersa en agua, y con $Q = \sigma_{abs}I$, es posible resolver la ecuación diferencial, obteniendo:

$$T_{NP} = \frac{Q}{4\pi R k_{h_2o}} = \frac{\sigma_{abs} I}{4\pi R k_{h_2o}} \quad r < R$$

$$\Delta T(r) = \frac{\sigma_{abs} I}{4\pi r k_{h_2o}} \quad r > R \quad (1.20)$$

Si bien la densidad de potencia de calentamiento $q(\mathbf{r})$ de una partícula podría no ser uniforme, en especial para NPs de geometrías más complejas, la temperatura en el equilibrio es en general uniforme dentro de la NP debido a la rápida termalización interna en comparación con la transferencia de calor al medio.

1.2.8.3 Cálculos de temperatura para partículas de estructuras arbitrarias.

Para obtener la solución del campo de temperaturas producido por una partícula de geometría arbitraria, es necesario recurrir a soluciones numéricas para resolver la ecuación de calor. Sin embargo, si se conoce el coeficiente de absorción de la partícula, es posible aproximar a $q(\mathbf{r})$ por una fuente puntual y retomar entonces las soluciones 1.20⁹⁹.

Definiendo un radio equivalente R_{eq} , como el radio de una esfera de igual volumen de la partícula a estudiar, de manera de conservar la simetría esférica del problema, el campo de temperaturas para una estructura arbitraria se define como:

$$\Delta T(r) = \frac{\sigma_{abs} I}{4\pi r k_{h_2o}} \quad r > R_{eq} \quad (1.21)$$

Y se considera la temperatura dentro de la esfera constante.

1.2.8.4 Transitorio de calentamiento

Un parámetro que resulta de relevancia para los estudios de termoplasmónica, es el tiempo necesario para alcanzar la distribución de temperaturas del estado estacionario cuando una NP es sometida a una excitación continua.

Durante el periodo transitorio la distribución de temperaturas está gobernada por la ecuación de calor dependiente del tiempo 1.18. Dado que la difusividad térmica de los metales es muy alta, la escala del tiempo transitorio queda a menudo definida únicamente por la difusividad térmica del medio, que es generalmente acuoso o aire. Bajo estas condiciones, el tiempo característico τ_{T^0} , definido como el tiempo necesario para alcanzar la mitad de la temperatura máxima en la superficie de la NP⁹⁸ se puede expresar como:

$$\tau_{T^0} \approx R^2 \frac{\rho \cdot c}{k} = \frac{R^2}{\alpha} \quad (1.22)$$

Donde α es la difusividad térmica ($m^2 s^{-1}$) del medio alrededor de la NP.

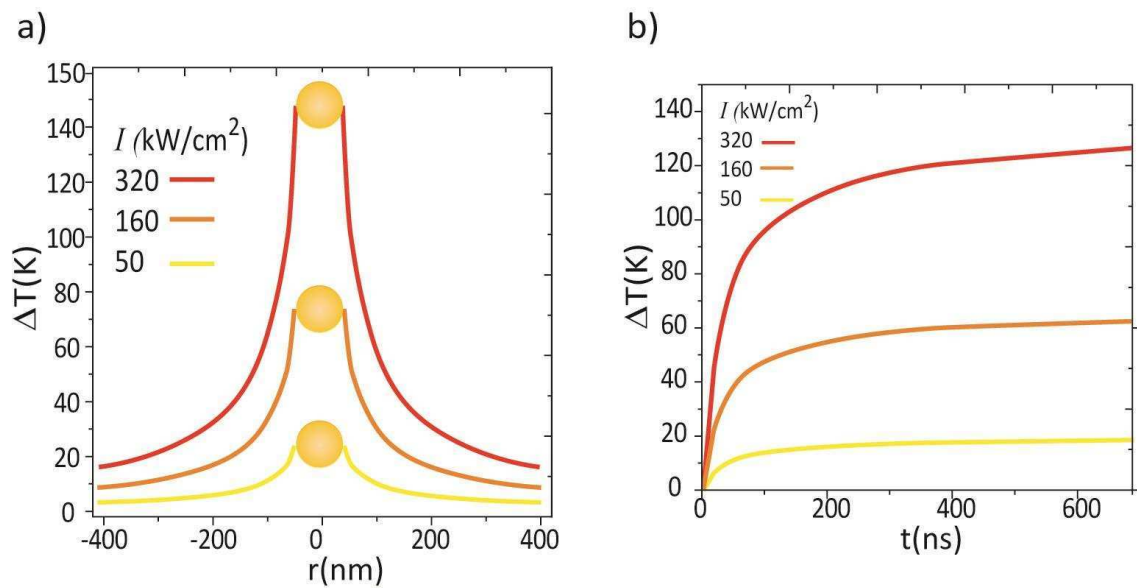


Figura 1.10 Calentamiento del agua debido a NP de oro de 80nm de diámetro, iluminada a la longitud de onda del LSPR (532nm) con tres irradiancias distintas. a) Perfiles de temperaturas. b) temperatura de la superficie de la NP en función del tiempo, desde que se comienza a iluminar la NP.

La figura 1.10 a), muestra los perfiles de temperatura estacionarios cuando se ilumina una NP de oro de 80 nm con distintos niveles de irradiancia a 532 nm, y la figura 1.10 b) la temperatura en la superficie de la NP en función del tiempo. Puede observarse incluso para la irradiancia más elevada que el campo de temperaturas es despreciable más allá de los 400 nm y con un τ_{79} menor que $0.1\mu s$.

1.2.8.5 Efectos Colectivos

Los modelos descritos anteriormente, se ajustan a NPs individuales. Si varias NPs se encuentran a distancias de menores que la necesaria para disipar el calor generado por cada una, se produce una acumulación de calor en las regiones entre NPs y el aumento de temperatura es considerablemente mayor al que se obtiene con NPs aisladas.

Este efecto acumulativo en el calentamiento que es el resultado de la suma de los flujos de calor de cada NP, y puede ser descrito por la ecuación de calor (1.8). La fuente de calor en este caso, debe escribirse como la suma de las fuentes individuales¹⁰⁰ $Q(\mathbf{r}) = \sum_i Q_i(\mathbf{r})$, donde Q_i es la potencia absorbida por la partícula i .

Por otro lado, de haber acoplamiento plasmónico entre las partículas, el sistema poseerá frecuencias de resonancias y modos distintos a las NPs individuales. Como se describió en la sección 1.2.6, esto depende fuertemente de la disposición y la distancia inter-partículas. Por esta razón la disipación total de calor puede aumentar o disminuir

dependiendo no solo de la longitud de onda sino también de la polarización de la luz incidente con respecto al arreglo de NPs. Las distancias de separación entre NPs necesarias para acoplamiento electromagnético son mucho menores que las necesarias para acumular calor.

1.3 Interacción de nanopartículas metálicas con fluoróforos

En líneas generales, las tasas de todas las transiciones involucradas en el proceso de fluorescencia pueden ser alteradas por la presencia de una nanoestructura metálica. Esto se representa en la figura 1.11 donde se esquematizó un diagrama de Jablonski modificado en presencia de una NP.

La tasa de excitación k_{exc} es modificada por cambios (aumento o reducción) en la intensidad del campo eléctrico local. Por ejemplo, bajo condiciones de resonancia plasmónica¹⁰¹, la intensidad del campo eléctrico en la interfaz metal/ dieléctrico (medio) puede ser aumentada varios órdenes de magnitud en algunas regiones. Este incremento depende de la geometría, la constante dieléctrica del material y de la frecuencia de radiación.¹⁰² Es importante notar que distintos modos resonantes (p.e. dipolar, cuadrupolar, etc.) producen intensificación y reducción del campo local en distintas regiones.

Por otro lado la presencia de una NP puede modificar la relajación de una molécula afectando tanto su tasa radiativa k_r como su tasa no radiativa k_{nr} de decaimiento.

El aumento o disminución de k_r va de la mano de las variaciones en la densidad de estados fotónicos producidos por la presencia de la NP, que dependen de la distancia de separación y de la orientación relativa entre el fluoróforo y la NP^{103,104}.

A su vez, k_{nr} se ve modificado debido a que el metal introduce canales de decaimiento electromagnético no radiativos adicionales, que comprenden tanto la excitación de modos evanescentes en el metal, como transferencia directa de energía desde el estado excitado de la molécula al metal¹⁰⁵⁻¹⁰⁷. Estos canales de de-excitación sumados a los intrínsecos de la molécula, pueden reducir la eficiencia cuántica de fluorescencia, e incluso a distancias pequeñas ($< \lambda/30$), pueden *quenchear* la emisión por completo¹⁰³.

Numerosos trabajos se han enfocado en demostrar experimentalmente como el *quenching* y el tiempo de vida de un fluoróforo ubicado en la cercanía de una NP varía con la distancia a ella¹⁰⁸⁻¹¹⁰. En particular, en un trabajo realizado en colaboración con el grupo de Tinnefeld¹¹¹ se observa como para una NP esférica de 10 nm, el efecto se torna despreciable más allá de los 30 nm (figura 1.12 a y b).

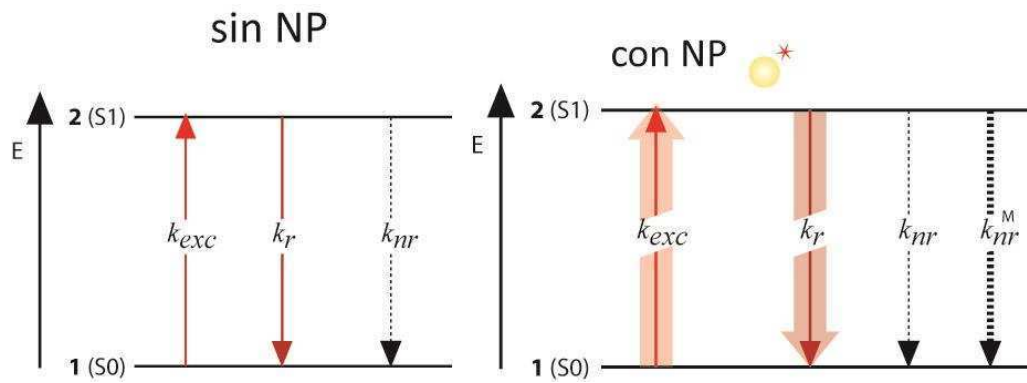


Figura 1.11 Representación del diagrama de Jablonski modificada en presencia de nanopartículas. Las flechas más gruesas indican la posibilidad de un incremento o decremento en las tasas de emisión y excitación debido a la interacción entre los fluoróforos y el campo plasmónico.

Otro trabajo del grupo de Novotny²², por ejemplo, se enfoca en evidenciar los dos efectos competitivos generados por la cercanía de las NPs estudiando la transición continua entre el *quenching* y el aumento de la fluorescencia en presencia de partículas de plata y oro. En la figura 1.12 c) se grafica el aumento de fluorescencia medido de un fluoróforo con orientación radial frente a una NP de plata, en función de la distancia. Se observa un cambio de comportamiento para distancias menores de 5nm.

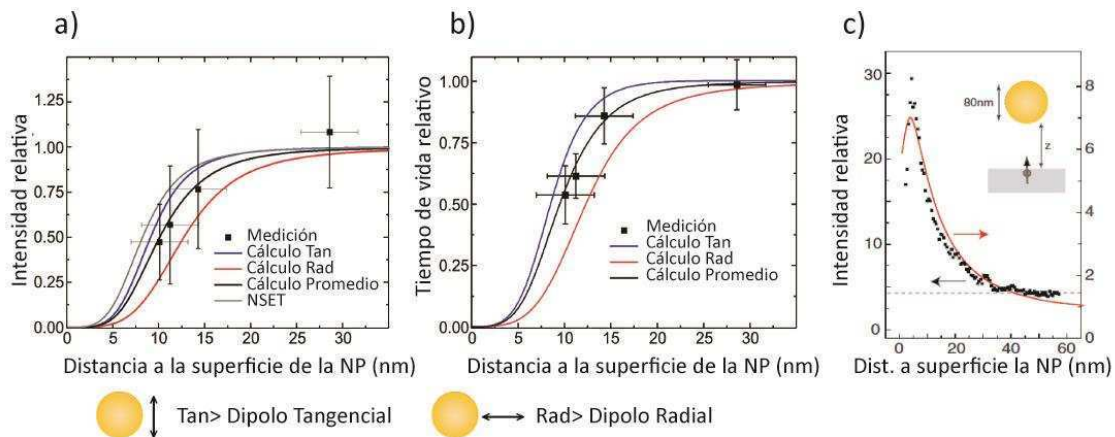


Figura 1.12 a) Cambio relativo en la intensidad de fluorescencia y b) en el tiempo de vida como función de la distancia entre un fluoróforo (ATTO 647N) y una AuNP esférica de 10 nm. Los cuadradas negros representan los valores experimentales. Las curvas sólidas son cálculos para un dipolo tangencial (azul), radial (rojo) y el promedio para un dipolo rotante¹¹¹. c) Modificación en la fluorescencia como función de la distancia partícula-fluoróforo. La señal se normalizó por la fluorescencia detectada cuando la partícula se encuentra suficientemente lejos (ca. 500nm).²².

En resumen, y para dar cuenta de la complejidad de esta interacción se puede decir que las nano-estructuras pueden generar los siguientes efectos sobre las moléculas fluorescentes dependiendo de su ubicación y orientación:

- Modificar el campo eléctrico local a través de las resonancias plasmónicas, que resulta en una modificación en la tasa de excitación k_{exc} ¹¹²
- El proceso de emisión es alterado ya que la nanoestructura puede mediar la emisión afectando la constante de decaimiento radiativa k_r ²⁸
- Los canales de decaimiento no radiativo también pueden ser amplificados por transferencia de energía a los modos oscuros de la nanoestructura metálica²¹.

Dada las diversas posibilidades que se abren al poder combinar estos efectos variando distancias, tamaños, formas de NPs con distintos fluoróforos, se han publicado numerosos trabajos tanto modelando el efecto^{5,35,108} como aplicándolo a distintos campos de la ciencia, desde medicina^{31,113,114}, biosensado^{24,46,86,115,116}, nanoantenas^{23,110,117}, microscopías de superresolución^{29,118,119}, entre otros.

2

Reducción de fotoblanqueo controlada por efecto Purcell

En este capítulo se presenta un estudio cuantitativo del fotoblanqueo de moléculas individuales ubicadas en la vecindad nanométrica de nanopartículas de oro (AuNP), que permite demostrar cómo la presencia de NP en la cercanía del fluoróforo logra aumentar sustancialmente el número total de fotones emitidos, dependiendo del tamaño de la NP.

2.1. Fotoestabilidad y efecto Purcell

Es habitual describir la calidad de un fluoróforo por su sección eficaz de absorción y por su rendimiento cuántico Q_r . Sin embargo, el número total de fotones que un fluoróforo puede emitir es un parámetro más importante, ya que determina cuanta información será posible obtener de una medición de fluorescencia. La cantidad de fotones totales que un fluoróforo pueda emitir está limitado por el fotoblanqueo.

El fotoblanqueo, más conocido por su nombre en inglés *Photobleaching*, es la alteración fotoquímica de un fluoróforo que lo deja incapaz de fluorescer de manera permanente (ver introducción 1.1.11). El modelo más simple para describir el fotoblanqueo involucra un sistema de 3 estados según se presenta en la figura 2.1: un estado fundamental singlete S_0 , un estado excitado S_1 y un estado apagado B.

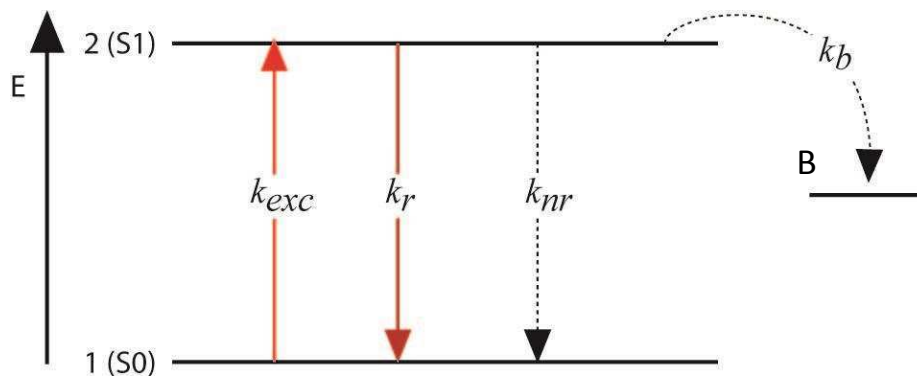


Figura 2.1 Esquema de 3 niveles electrónicos involucrados en el proceso de fluorescencia molecular: S0, estado fundamental, S1, estado excitado, y B estado oscuro al que decae la molécula al fotodegradarse.

Un fluoróforo que ha sido excitado a S1 tiene únicamente tres posibilidades de, *i*) emitir un fotón con una determinada tasa de decaimiento radiativa, k_r , *ii*) relajarse al estado fundamental, pero esta vez por procesos que no involucran la emisión de un fotón, con una tasa de decaimiento no radiativo k_{nr} , o *iii*) fotoblanquearse con una constante de bleaching k_b y caer en un estado oscuro irreversible.

Bajo estas condiciones entonces, la eficiencia de emisión Q_r :

$$Q_r = \frac{k_r}{k_r + k_{nr} + k_b} \quad (2.1)$$

Por definición los fluoróforos son moléculas para las que el proceso de emisión de fluorescencia es relativamente eficiente, y suelen emitir una gran cantidad de fotones antes de fotoblanquearse. Es decir, la molécula realizará numerosos ciclos de excitación-relajación antes de sufrir una reacción de fotoblanqueo. En este caso, k_b es mucho menor que $(k_r + k_{nr})$, por lo que es habitual ignorar a k_b en cálculos de Q_r (como en la ecuación 1.5).

Análogamente la eficiencia de fotoblanqueo Q_b está dada por:

$$Q_b = \frac{k_b}{k_r + k_{nr} + k_b} \quad (2.2)$$

Y el número total de fotones emitidos N por una molécula antes de fotoblanquearse está dado por la relación entre las eficiencias de blanqueo y de emisión:

$$N = \frac{Q_r}{Q_b} = \frac{k_r}{k_b} \quad (2.3)$$

Es importante notar que N no depende de la tasa de excitación k_{exc} ni del k_{nr} , como ya había sido observado por Hirschfeld¹²⁰ en su trabajo del 76, sino únicamente de las tasas radiativas y de blanqueo. Por ejemplo, aumentar la tasa de excitación k_{exc} solo hará que

los N fotones sean emitidos rápidamente. Si en cambio el fluoróforo es quencheado por algún agente externo, como por ejemplo temperatura, aumentando el k_{nr} , se emitirán N fotones de todas formas, solo que en un período de tiempo más largo.

La importancia de la ecuación 2.3 radica en que a partir de ella, es posible analizar las dos vías posibles para obtener más fotones de una molécula: o bien reduciendo k_b , o bien aumentando k_r . La primera alternativa consiste entonces en controlar la tasa de la/s reacción/es fotoquímica/s, y ha sido el enfoque más explorado. Por medio de modificaciones químicas, es posible modificar las características del estado fundamental y/o excitado de los fluoróforos, de manera de disminuir la constante de fotoblanqueo k_b . Por medio de estas estrategias se ha logrado sintetizar numerosas familias de fluoróforos más resistentes al fotoblanqueo¹²¹⁻¹²³. Otra alternativa para reducir k_b consiste en modificar el medio, de manera de proteger el fluoróforo. Por ejemplo, es usual que las reacciones involucradas en el proceso de fotoblanqueo involucren la reacción con oxígeno. Utilizando soluciones supresoras de oxígeno se pueden reducir considerablemente la tasa de fotoblanqueo¹²⁴⁻¹²⁸.

La segunda alternativa para obtener más fotones de una molécula consiste en aumentar la constante de decaimiento radiativo k_r . Este es en un enfoque más físico, y no había sido explorado en detalle hasta el momento de este trabajo. Este método físico está basado en la regla de oro de Fermi que brinda una expresión general para el decaimiento radiativo:

$$k_r = \left[\frac{\langle i|H|f \rangle^2}{\hbar^2} \right] \rho(\nu) \quad (2.4)$$

La regla de oro de Fermi tiene dos factores, el primero se compone de la interacción entre el estado inicial $\langle i|$ correspondiente a la molécula excitada en ausencia de fotones y el estado final $\langle f|$ correspondiente a la molécula relajada más un fotón, a través del Hamiltoniano H . Modificar este factor requiere de modificaciones químicas a los estados S0 y S1 de las moléculas; es de hecho posible obtener moléculas con mayor o menor k_r mediante modificaciones químicas. El segundo factor en la regla de oro de Fermi, y el de relevancia para el presente trabajo es la densidad de estados fotónicos $\rho(\nu)$, a la frecuencia de emisión ν . La presencia de $\rho(\nu)$ en la ecuación (2.4) da cuenta que el estado final involucra la generación de un fotón, y para que este pueda existir se necesitan estados disponibles. Como ejemplo extremo para visualizar este efecto puede considerarse una molécula excitada dentro de una cavidad ideal, que solo permite la existencia de fotones con energías $n \cdot h\nu$. La molécula solo podrá emitir en una de las frecuencias permitidas, y si sus estados moleculares no coinciden con las frecuencias permitidas por la cavidad, nunca decaerá.

Una mayor densidad de modos fotónicos a la frecuencia y polarización correcta facilitará al fluoróforo excitado un decaimiento radiativo más rápido. Este hecho fue demostrado por primera vez por Purcell, quien observó que pequeñas partículas metálicas podían aumentar el k_r a radiofrecuencias¹²⁹. Por su parte, en 1974, Drexhage¹³⁰ fue el

primero en demostrar que el decaimiento espontáneo de complejos metálicos luminiscentes se modifica al estar en cercanía de un espejo metálico. Los metales son particularmente interesantes en este aspecto. Sus electrones de conducción pueden seguir las variaciones del campo eléctrico en el rango óptico y generar modificaciones de la densidad de estados fotónicos. Se ha avanzado enormemente en el entendimiento de este fenómeno, discerniendo entre contribuciones radiativas y no-radiativas en los cambios producidos en el tiempo de decaimiento. En particular se ha enfocado el estudio de metales nano-estructurados, ya que presentan resonancias electrónicas (plasmónicas) en el rango óptico, lo cual deriva en influencias más marcadas en las transiciones involucradas en la fluorescencia. En este contexto se han investigado films delgados, NP coloidales y estructuras fabricadas de modo “*top-down*”^{34,103,110,131–135}.

La mayor cantidad de estos estudios se han abocado a investigar cambios en el tiempo de decaimiento, como así también las posibilidades de incrementar la intensidad de fluorescencia⁸⁸ y la direccionalidad de la emisión⁸⁵. Llamativamente, a pesar de la relevancia fundamental y tecnológica, muy pocos trabajos se han dedicado a estudiar el efecto de la densidad de estados fotónicos sobre el número total de fotones emitidos.

Enderlein¹⁷ postuló la posibilidad de obtener un mayor número de fotones incrementando k_r en un trabajo teórico considerando una molécula cercana a una superficie metálica. Desde dicha propuesta teórica hasta la fecha, sólo un puñado de experimentos han sido reportados en esta dirección y ninguno ha sido cuantitativo, posiblemente por el hecho de que una investigación experimental cuantitativa de este fenómeno no es trivial. Por un lado requiere gran control sobre la geometría y el entorno del fluoróforo a nivel nanométrico (posición molécula-nanoestructura, y composición del entorno molecular). Por otro lado, para obtener valores confiables del número total de fotones emitidos es necesario medir trabajosamente distribuciones, ya que los procesos de decaimiento son estocásticos.

Se ha reportado una disminución del fotoblanqueo de sondas fluorescentes en la vecindad de islas de films de plata¹³⁶, como así también se encontraron evidencias que apoyan la teoría de Enderlein en estudios sistemáticos con monocapas de fluoróforos a distancias controladas de films delgados de oro¹³⁷. Recientemente se demostró que fluoróforos incorporados a una nanocáscara de oro se vuelven considerablemente más resistentes al fotoblanqueo¹³⁸, y que fluoróforos adsorbidos a dímeros de NPs de plata pueden emitir una cantidad sustancialmente mayor de fotones antes fotoblanquearse¹³⁹.

En el trabajo presentado en este capítulo, con el fin de estudiar el efecto de las AuNP sobre las constantes de decaimiento de un fluoróforo, se utilizaron estructuras de ADN autoensambladas (origamis de ADN) para lograr colocar fluoróforos individuales a una separación de 8 nm de la superficie de AuNPs de 20, 40 y 80 nm de diámetro. Gracias a la precisión nanométrica en la geometría de los origamis de ADN, es posible contrastar fielmente los resultados experimentales con cálculos electromagnéticos y así corroborar el aumento Purcell de la fotoestabilidad.

Este trabajo se realizó en colaboración con el grupo del Prof. Dr. Philip Tinnefeld, y en particular con el Dr. Guillermo Acuña en la *Technische Universität Braunschweig (NanoBioSciences Group, Institute for Physical and Theoretical Chemistry, Technische Universität Braunschweig)*.

2.2 Nanoestructuras Híbridas: Origamis de ADN, fluoróforos y AuNP

2.2.1 Origamis de ADN

Una cadena polimérica simple de ADN está compuesta por una serie de unidades moleculares llamadas nucleótidos. Estas unidades están formadas por un azúcar, un grupo fosfato y una base nitrogenada, que puede variar dependiendo de la especie aromática que la componga. Las bases se conocen como (A) adenina, (G) guanina, (C) citosina y (T) timina¹⁴⁰.

Típicamente el ADN se presenta en la naturaleza en forma de doble hélice compuesta por dos cadenas complementarias apareadas entre sí. Las cadenas se unen por enlaces de tipo puente hidrógeno y debido a la polaridad de las bases, son complementarias únicamente A-T y C-G. De esta forma se definen dos cadenas complementarias que se alinearán de forma antiparalela, es decir una cadena orientada de 3' a 5', mientras que la otra está orientada de 5' a 3' a lo largo de la primera (Figura 2.2). 3' y 5' representan los grupos 3' hidroxilos y 5' fosfato del fin de cadena, respectivamente.

Estas dobles cadenas pueden ser desensamblarse (desnaturalizarse) en sus cadenas simples a una cierta temperatura por encima de la ambiente. Se define la temperatura de fusión del ADN doble cadena, como la temperatura a la que la mitad de las bases se encuentran apareadas, mientras que la otra mitad se ha desapareado. Esta temperatura de desnaturalización puede medirse experimentalmente como así también puede ser predicha teóricamente¹⁴¹. Debido a las características especiales que presenta esta macromolécula, múltiples investigaciones se han volcado a comprender sus funciones relacionadas a sus posibles estructuras^{142,143}. En torno a esto se ha desarrollado la nanotecnología de estructuras de ADN, donde cada cadena de ADN es considerada un bloque estructural, conectándose entre sí por apareamiento de bases, conformando un objeto nanométrico enteramente de ADN.

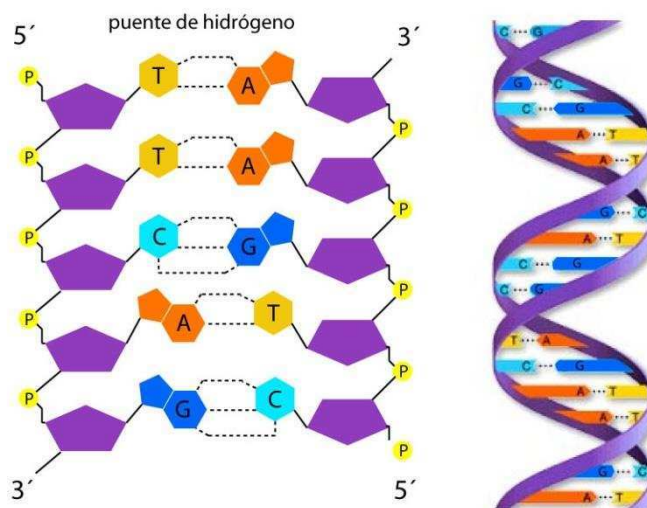


Figura 2.2 Representación esquemática de ADN. a) Esquematación de oligonucleótidos formados por un azúcar (pentágono violeta), un fosfato (círculos amarillos) y una base (A, T, G, C) conformando una cadena orientada y apareada con su complementaria por puentes hidrógeno. b) Ilustración de una doble hélice de ADN.

La técnica que se propuso inicialmente para acoplar estos bloques consistía en continuar una doble hélice con algunas bases desapareadas. Si dos bloques poseen bases desapareadas complementarias, estos se unirán. Si bien por medio de este método es posible conformar incluso estructuras de ADN tridimensionales, interconectando múltiples cadenas de ADN en las posiciones apropiadas¹⁴⁴, las estructuras posibles resultan limitadas y sumamente dificultosas de diseñar¹⁴⁵.

Recién 15 años después que Nadrian Seeman¹⁴⁴ desarrollara el primer objeto de ADN en tres dimensiones, Paul Rothemund¹⁴⁶ sugirió la técnica de origamis de ADN (Figura 2.3 esquematiza ambas técnicas), que permite crear una variedad mayor de nanoestructuras. En esta técnica, no se combinan hélices de ADN, sino que las estructuras se logran a partir del plegado de un ADN viral de cadena simple. El plegamiento del ADN viral se consigue mediante la utilización de pequeñas cadenas de ADN complementario, denominadas “grampas”. Gracias a que es posible predecir la temperatura de desnaturalización del ADN, combinando estos oligonucleótidos cortos con una cadena de ADN circular, basta someterlos a un ciclado de temperatura indicado para que el sistema evolucione a su equilibrio, dando lugar a la nanoestructura prediseñada.

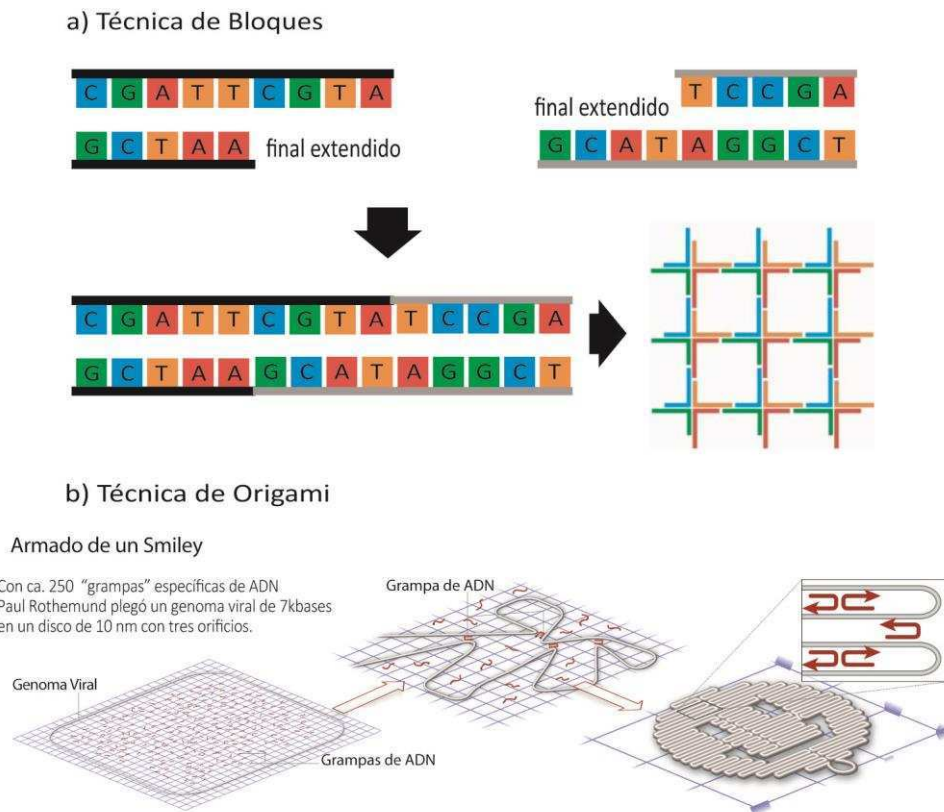


Figura 2.3 Esquemización de técnicas para fabricación de nanoestructuras de ADN. a) Técnica de bloques, se representan dos cadenas de ADN en 2D con finales extendidos complementarios entre sí. Se esquematiza cómo se armaría un cuadrado por este método¹⁴⁷. b) Técnica de Origami propuesta por Rothemund para el armado de un emoticón. Se utiliza un genoma viral y un exceso de grampas que reaccionarán en los sitios complementarios del ADN viral, plegándolo en el diseño final (adaptado de¹⁴⁵).

De esta forma es posible obtener estructuras de centenas de nm con una resolución espacial de 3 nm, que es la distancia cubierta por una vuelta de hélice de doble cadena. En su primer paper, Rothemund demostró la posibilidad de fabricar múltiples formas bidimensionales, como emoticones, triángulos, rectángulos, etc., con un 90% de eficiencia por reacción de autoensamblado.

En el 2009, la técnica se expandió también a objetos tridimensionales, desde cajas (figura 2.4 c)¹⁴⁸, hasta objetos altamente complejos (figura 2.4 d)¹⁴⁹.

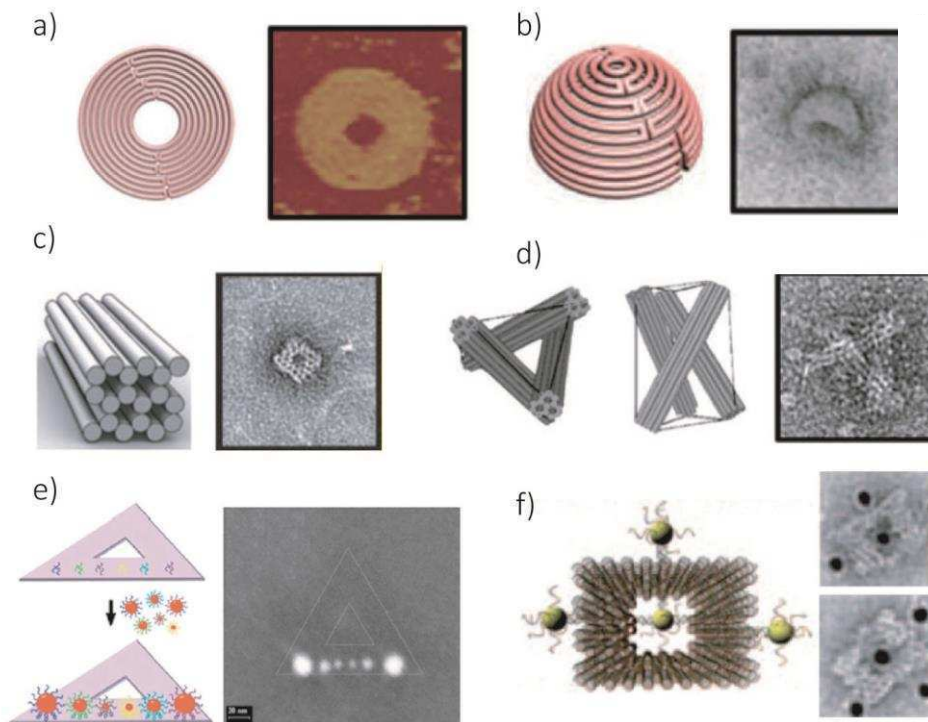


Figura 2.4 Ejemplos de patrones diseñados por la técnica de origamis de ADN. a) Estructura 2D curva, b) estructura 3D curva, c y d) construcciones 3D a partir de multicapas de ADN. e y f) Origamis decorados con partículas de oro marcadas con secuencias complementarias, ubicadas específicamente en estructuras bi- (e) y tri-(f) dimensionales. Adaptación de [45]¹⁵⁰.

A medida que aumenta el tamaño y la complejidad del origami, encontrar las “grampas” necesarias para el ensamblado se torna no trivial. Para diseñar la estructura se cuenta con programas de libre acceso como el caDNAno (www.cadnano.org). Este programa permite diseñar la estructura acomodando las hélices de ADN por medio de una interfaz gráfica.

Considerando el diámetro de cada hélice aproximadamente 3 nm, es posible predecir el diámetro total de la estructura. Una vez que se ha definido la posición de las hélices, se asigna un número de bases por cada una de ellas de manera de obtener el largo final de la estructura. El largo de cada hélice está definido como $l = N_{ADN} \times 0,34 \text{ nm}$, donde N_{ADN} es el número total de pares de base por hélice (es decir 0.34 nm corresponde a la distancia entre dos pares de base adyacentes). El tamaño estará limitado por el total de bases disponible en el ADN viral que se utilice para el plegado. Una vez definidos estos parámetros, automáticamente se define la cantidad y qué grampas serán necesarios para armar el origami.

2.2.2 Ubicación de NPs y fluoróforos con precisión nanométrica mediante origamis de ADN

Los origamis de ADN abren nuevas posibilidades para la fabricación bottom-up de nanoestructuras funcionales^{111,151-154}. Para esto se incluyen “cadenas de captura”. Estas cortas cadenas simples de ADN no actúan como “grampas”, sino que se unen a sitios específicos del origami mediante una parte de su secuencia, dejando la parte restante disponible para la unión de otra cadena única de ADN. Esto permite ubicar en sitios específicos del origami otros componentes previamente funcionalizados con la secuencia correcta de ADN. En la figura 2.4 e) y f) se presentan algunos ejemplos de nanoestructuras reportadas.

En el presente trabajo se usaron origamis de ADN para ubicar nanopartículas de oro de distintos tamaños, y fluoróforos orgánicos, con posición relativa controlada a nivel nanométrico. Esta es una tecnología que brinda gran versatilidad para la fabricación de nano-estructuras con propiedades optoelectrónicas adaptables.

En este trabajo se utilizaron dos origamis de ADN diseñados por el grupo del Prof. Dr. Tinnefeld y sintetizados según el procedimiento propuesto por Rothemund. En ambos casos se usó como base un ADN viral de 7 kilobases. La primera estructura consistió de un rectángulo (figura 2.5 a), similar al que fue usado en la primera colaboración entre nuestros grupos¹⁴⁶. Se agregaron algunas cadenas modificadas con biotina en el extremo 5', con el fin de facilitar la inmovilización de los origamis sobre sustratos con neutravidina. Además, en el centro del rectángulo se colocó una cadena marcada con el fluoróforo ATTO647N. Este rectángulo fue utilizado únicamente para ensayos de tipo control ya que es una estructura conocida bidimensional y ampliamente utilizada por el grupo^{111,155-158}.

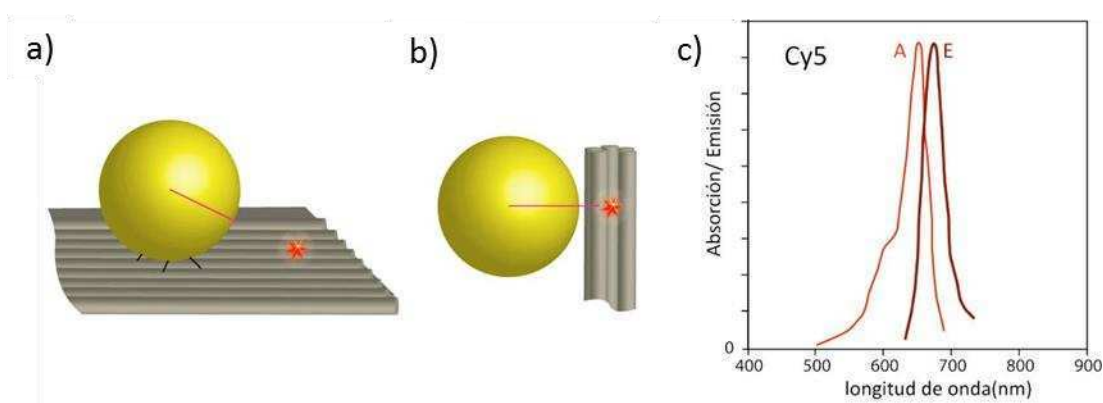


Figura 2.5 Diseño del Origami para estudio de fotoblanqueo por efecto Purcell. a) Esquema de la ubicación relativa entre la AuNP y la molécula de Cy5 en el origami rectángulo, y b) en el origami torre. c) Espectro de absorción y fluorescencia del Dye seleccionado Cy5.

La segunda estructura fue una “torre” que se construyó con el fin de facilitar la ubicación de un fluoróforo a una distancia fija de la superficie de NPs de distintos tamaños (figura 2.5 b). La estructura está compuesta por 66 hélices de ADN colocadas de forma vertical (una vista superior se puede ver en la figura 2.6 a)). El eje principal está compuesto por 12 hélices de ADN (hélices de 0 a 11 de la figura), de las cuales las 6 centrales sobresalen 18 nm sobre el resto (hélices de 0 a 5). Finalmente el resto de las hélices (12-65) conforman tres estructuras lineales en la base que le otorgan estabilidad a la estructura. El fluoróforo, en este caso Cy5 (espectro de absorción/emisión en figura 2.5 c), se incorporó aproximadamente en el centro de las seis hélices a una altura de 122 nm. Dos grampas de la hélice 4 y 5 a una altura de ca. 122nm, fueron extendidas con una cadena de captura de secuencia 3'-15A-5', complementaria a la cadena Thiol-5'-15T-3' con la que fueron funcionalizadas las NPs de oro.

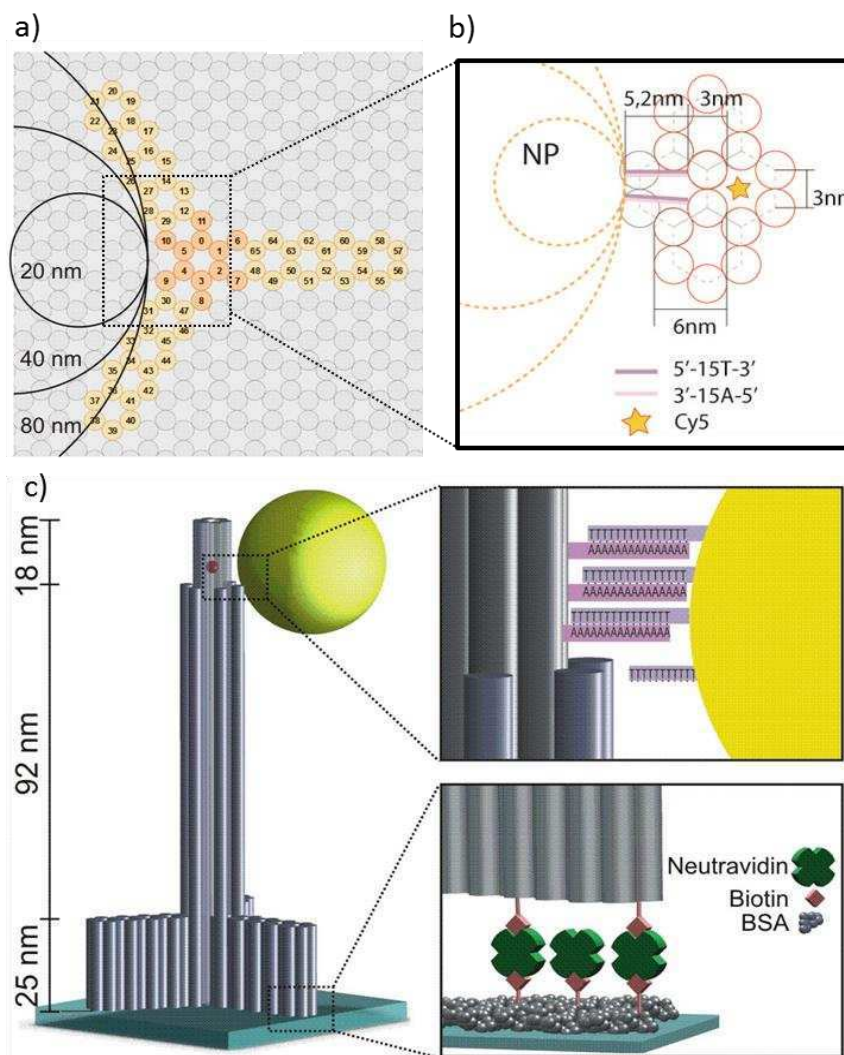


Figura 2.6 a) Vista superior del origami torre donde se muestran las 66 hélices que conforman el tronco principal (naranja) y la base (amarillo). Los círculos esquematizan el tamaño de las AuNPs en escala. b) Se esquematizan los tamaños de las piezas (olígos y hélices) a partir de los cuales se determinó la distancia fluoróforo-AuNP. c) Esquema del pilar de origami de ADN (gris) marcado con Cy5 (rojo) inmovilizado sobre una superficie de vidrio.

Finalmente se agregan al extremo 5' de 8 grampas ubicadas en la base del origami, una biotina en cada una, que facilitará la fijación de la muestra (figura 2.6 c recuadro). Basado en la geometría del origami, y el diámetro de cada hélice se ha estimado la distancia entre el fluoróforo y la superficie de la AuNP aproximadamente 8 nm para todos los tamaños de partículas (distancias, figura 2.6 b). La lista de grampas y secuencias modificadas para este origami se presentan en el apéndice al final del trabajo.

2.2.3 Preparación de muestras

Las estructuras de ADN se inmovilizan sobre una superficie de vidrio previamente funcionalizada con biotina-estreptavidina. La solución se deja reaccionar logrando un recubrimiento de la superficie de aproximadamente un origami por μm^2 , de manera que sea posible realizar estudios de microscopia de molécula única. Una vez que el origami se encuentra inmovilizado, se agrega a la solución NPs de 20, 40 u 80nm funcionalizadas con Thiol-5'-15T-3' según protocolo. Las NPs se unen a la cadena complementaria presente en el origami. Este pegado secuencial evita el agregado de múltiples origamis a una misma NP⁸⁸.

Otra ventaja de este método es la posibilidad de controlar la eficiencia del pegado de AuNPs, controlando la concentración y el tiempo de incubación de las AuNPs, de manera de preservar un número de pilares sin NPs como referencia, lo cual permite evaluar el comportamiento del fluoróforo en presencia y ausencia de NPs en una misma muestra.

2.3 Demostración experimental del efecto Purcell sobre el número total de fotones emitidos

2.3.1 Detección de fluorescencia de moléculas individuales

La adquisición de imágenes de intensidad de fluorescencia y tiempo de vida, fueron realizadas con un microscopio confocal con escaneo de muestra. Para la excitación se utilizó un láser a 640 nm pulsado con polarización circular. La fluorescencia fue separada espectralmente de la excitación por medio de filtros de interferencia apropiados y fue detectada por un fotodiodo de avalancha y un módulo de conteo de fotones únicos correlacionados en el tiempo (TCSPC).

En las mediciones, se obtuvo en primer lugar una imagen de una región de la muestra donde se localizan las estructuras de ADN marcadas con Cy5 (figura 2.7 a). Debido a su tamaño menor al poder de resolución del microscopio, las estructuras de ADN y NPs aparecen como señales limitadas por difracción. Luego la muestra es movida secuencialmente de manera de colocar el foco sobre cada uno de los puntos donde se detectó un fluoróforo, y de una por vez se mide la emisión de fluorescencia en el tiempo

hasta el fotoblanqueo. Sólo se tomaron en cuenta aquellas mediciones donde el apagado ocurrió en un único salto, de manera de asegurarse que se trató de la medición de una única estructura. Una vez apagada la fluorescencia se esperó aproximadamente el doble de tiempo que estuvo encendida, para asegurarse que no se trata de un evento de “parpadeo” (blinking). El fluoróforo Cy5 fue especialmente seleccionada por dos motivos: tener blinking despreciable^{6,136} y ser razonablemente lábil al fotoblanqueo (figura 2.7, b)). Esta última característica es necesaria para poder medir en un tiempo razonable, el gran número de moléculas que se necesita para obtener información estadísticamente confiable. Se obtuvieron 250 mediciones de emisión de moléculas únicas, por cada una de las muestras.

Cada traza de fluorescencia medida es analizada de manera de obtener su intensidad promedio, el número total de fotones emitidos y el tiempo de vida media de fluorescencia (figura 2.7 c). El número total de fotones detectados es en todos los casos sólo una fracción constante del número total de fotones emitidos, debido a la eficiencia de colección y detección del microscopio. De aquí en adelante se utilizará N para referirse al número total de fotones detectados. Para más detalles sobre las muestras y la adquisición ver “materiales y métodos”.

2.3.2 Clasificación de poblaciones y tiempo de vida

Gracias a que el pegado de NPs se controló de manera que no fuese total, cada muestra contiene una fracción considerable de estructuras sin NPs pegadas, lo que posibilita la toma de datos de referencia en cada experimento. El primer desafío entonces radica en lograr distinguir ambas poblaciones de datos y determinar si cada molécula de Cy5 medida se encontraba o no en presencia de una AuNP.

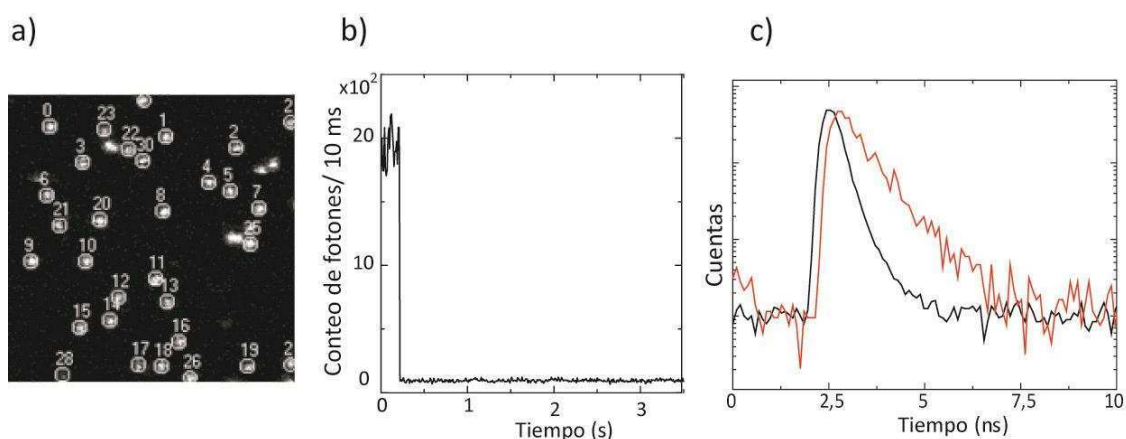


Figura 2.7 a) Imagen confocal de 10x10 μm obtenida de una muestra con pilares de ADN marcados con Cy5. b) ejemplo de traza temporal de emisión de Cy5. c) Dos tiempos de vida típicos medidos sobre una muestra con AuNP de 40 nm.

La presencia de una AuNP a 8 nm de distancia, hace que un fluoróforo experimente un campo eléctrico de excitación diferente, como así también que el tiempo de vida media de fluorescencia se vea modificado⁷⁰.

Lo más sencillo sería poder diferenciar las poblaciones a partir de la intensidad de fluorescencia, que es el dato que se adquiere inmediatamente en la medición sin necesidad de un mayor análisis. Sin embargo, si se grafica la distribución de intensidades medidas en cada muestra (figura 2.8), se observa que no es posible distinguir dos poblaciones. Si bien hay un comportamiento diferenciado entre ensayos con partículas de cada tamaño, no es posible distinguir dos poblaciones bien separadas. Esto se debe a que las variaciones de intensidad de fluorescencia producidas por la NP dependen de tanto de modificaciones en la excitación como en las tasas de decaimiento (ecuación 1.6). La tasa de excitación depende del campo eléctrico en la posición del fluoróforo. Y este a su vez presentará fuertes variaciones frente a pequeñas inclinaciones de la estructura de ADN con respecto a la superficie. Estas inclinaciones del origami han sido observadas y estudiadas previamente¹⁵⁷.

El otro parámetro que podría ser utilizado para diferenciar las poblaciones, es el tiempo de vida de fluorescencia. En la figura 2.9 se muestran las distribuciones de tiempo de vida obtenidas en cada muestra. En todos los casos se distinguen claramente observaron dos poblaciones con tiempos de vida media bien diferentes: una población con el tiempo de vida típico de Cy5 (aproximadamente 1 ns), y otra población con un tiempo de vida de fluorescencia más corto. En principio el único factor presente en cada muestra que podría generar un cambio en el comportamiento del fluoróforo dentro de la misma muestra, son las AuNP.

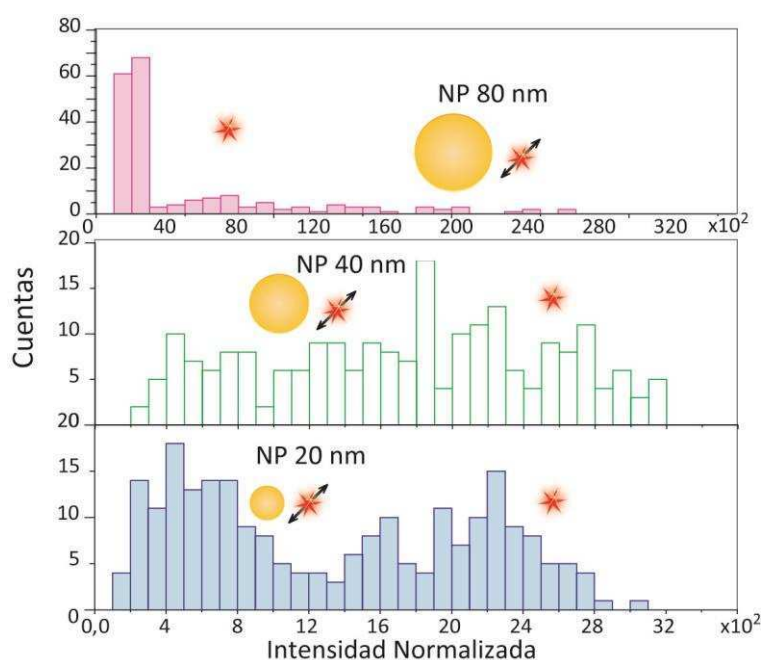


Figura 2.8 Histogramas de intensidad de fluorescencia medidos para las muestras de origamis de ADN con Cy5 y AuNPs de cada tamaño.

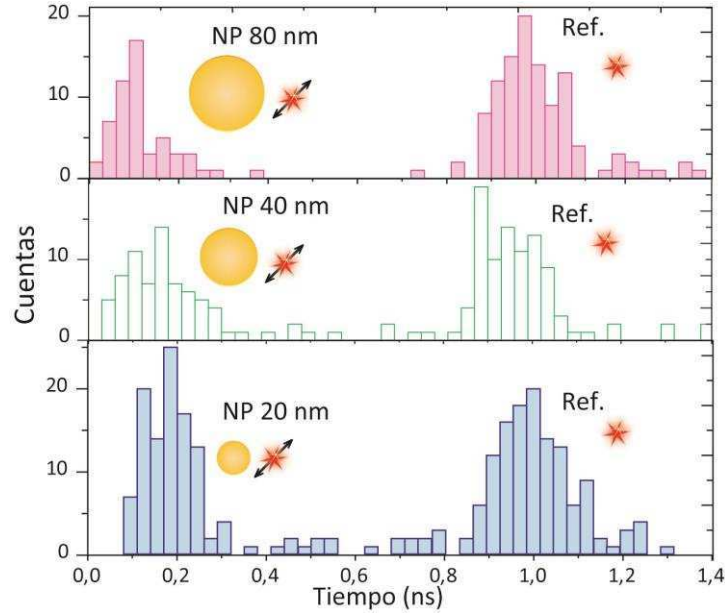


Figura 2.9 Histogramas de tiempo de vida medidos para las muestras de origamis de ADN con Cy5 y AuNPs de cada tamaño.

Para corroborar que efectivamente los dos poblaciones de tiempo de vida de fluorescencia cambian se deben a la presencia de la NP, se contrastaron los datos con cálculos. Para el caso de un fluoróforo en la cercanía de una AuNP, es posible resolver numéricamente el problema, ya que se conocen los parámetros principales del sistema (tamaño y material de la NP, distancia al fluoróforo, longitud de onda de excitación). Para el modelo, la AuNP es considerada una esfera de oro del tamaño nominal de la NP. El fluoróforo por su parte es modelado como un dipolo de 1,5 nm (prácticamente puntual) oscilando a la frecuencia de 448THz, correspondiente con el pico de emisión del fluoróforo Cy5 (669nm). Ambos, la NP y el dipolo puntual se consideran inmersos en agua. La respuesta del sistema es obtenida resolviendo numéricamente las ecuaciones de Maxwell en 3D con un algoritmo de diferencias finitas en dominio temporal (*finite difference time domain, FDTD, Microwave Studio, Computer Simulation Technology, Darmstadt, Alemania, cálculos realizados en conjunto con el Dr. Guillermo Acuña*).

Como se describe en Taminiau et al.¹⁵⁹ estos cálculos permiten obtener los cambios de k_r y k_{nr} con presencia de la AuNP con respecto a la situación sin AuNP k_r^0 :

$$\frac{k_r}{k_r^0} = \frac{\iint P(\varphi, \theta) d\varphi d\theta}{\iint P^0(\varphi, \theta) d\varphi d\theta} \quad (2.5)$$

$$\frac{k_{nr}^M}{k_r^0} = \frac{P_{abs}}{\iint P^0(\varphi, \theta) d\varphi d\theta} \quad (2.6)$$

Donde $P(\varphi, \theta)$ y $P_0(\varphi, \theta)$ son la potencia angular emitida por el sistema AuNP-dipolo y por el sistema de referencia del mismo dipolo en agua, respectivamente. Los ángulos φ y θ

son los ángulos azimutal y polar usualmente usados en coordenadas esféricas, y la integral es realizada sobre todo el espacio. Los valores de $\iint P d\Omega$ y $\iint P_0 d\Omega$ no son relevantes en sí mismos, ya que dependen de la fuerza del emisor (en la simulación correspondería al tamaño y corriente del dipolo), de la misma manera que el valor de k_r depende de la especie de fluoróforo utilizada. El dipolo considerado en las simulaciones no tiene pérdidas internas, por lo que corresponde a una moléculas con $k_{nr}=0$. Computando la potencia absorbida en el metal, P_{abs} , se obtiene k_{nr}^M .

Estos coeficientes fueron calculados para diámetros de esferas de oro entre 20 y 80nm y para dipolos orientados en la dirección tangencial y radial con respecto a la superficie de la esfera (ver figura 2.10). Es importante considerar estas dos orientaciones ya que poseen comportamientos muy distintos y son la base para calcular cualquier orientación intermedia. En los experimentos, los fluoróforos pueden rotar libremente. Esta situación corresponde a un promedio dado por 2/3 de un dipolo orientado tangencialmente + 1/3 de un dipolo orientado radialmente¹⁰³.

A partir de los parámetros obtenidos de las ecuaciones 2.5 y 2.6 puede obtenerse el cambio en el tiempo de vida media de fluorescencia para un fluoróforo ideal con eficiencia de fluorescencia intrínseca $Q_r^0 = 1$. Para obtener el cambio relativo en el tiempo de vida media $\frac{\tau_{NP}}{\tau_0}$ de un fluoróforo real con $Q_r^0 < 1$, se utiliza el formalismo propuesto por Bharadawaj y Novotny²¹:

$$\frac{\tau_{NP}}{\tau_0} = \frac{1/Q_r^0}{(k_r/k_r^0) + (k_{nr}^M/k_r^0) + (1-Q_r^0/Q_r^0)}, \quad (2.7)$$

Para estos cálculos se consideró $Q_r^0=0,28$, como ha sido reportado por Cy5¹⁶⁰.

En primer lugar se realizaron cálculos para la geometría nominal, es decir considerando NPs perfectamente esféricas del tamaño nominal y una estructura de ADN perfectamente rígida con la geometría predicha por el plegado teórico del ADN (figura 2.6), lo cual implica una separación entre la NP y el fluoróforo de aproximadamente 8 nm. Como se puede ver en la figura 2.10, los cálculos para una separación de 8 nm reproducen la tendencia pero no la magnitud del cambio de tiempo de vida observado experimentalmente.

Existen varios factores que pueden dar origen a esta divergencia entre los cálculos y los experimentos, los cuales se evaluaron de a uno a la vez. Primeramente, se consideró la posibilidad de que el dato de $Q_r^0 = 0,28$ obtenido de la literatura no sea exacto (a pesar de estar reportado de mediciones conjuntas de tiempo de vida con valores de 1 ns, igual que en nuestro caso). Esto se descartó debido a que para reproducir los valores de tiempo de vida experimentales se requiere que Q_r^0 tome valores de 0,7 o mayores, demasiado alejados de cualquier valor reportado para Cy5^{136,161}. El siguiente factor es el tamaño y forma de las AuNPs. Se sabe que las AuNPs no son perfectamente esféricas y que poseen una distribución de tamaños. Pero como se puede ver de las relativamente pequeñas diferencias entre los efectos producidos por AuNPs de 20, 40 y 80, esto puede descartarse

también; un cambio de 4 veces en el radio de la NP produce diferencias en la tasa de decaimiento de poco más de un 10%.

La última posibilidad es que la distancia de separación entre la NP y el fluoróforo no sea exactamente la predicha por el plegado teórico del ADN. Para evaluar esta posibilidad se realizaron cálculos considerando distancias de separación de 8, 7, 6, y 5 nm. Este rango fue definido considerando pequeñas variaciones a la geometría del origami debido a una posible deformación al unirse la NP (figura 2.6). Como puede verse en la figura 2.10 el tiempo de vida medido se corresponde con las simulaciones para una molécula ubicada entre 5 y 6 nm de distancia con respecto a la AuNP. Es notable la sensibilidad de las mediciones de tiempo de vida a la separación con el metal; un cambio de tan solo 3 nm se refleja en una modificación de hasta un 65% en el tiempo de vida del fluoróforo.

De estos datos se concluye entonces que estas dos poblaciones, cuyos tiempos de vida difieren entre sí en más de un 70% se corresponden con las muestras con AuNP y sin AuNP (referencia), y son fácilmente clasificables a partir del tiempo de decaimiento que presenten. Asimismo se puede concluir que la distancia de separación fluoróforo-AuNP se encuentra unos 2 o 3 nm por debajo de lo predicho por la estructura del origami de ADN.

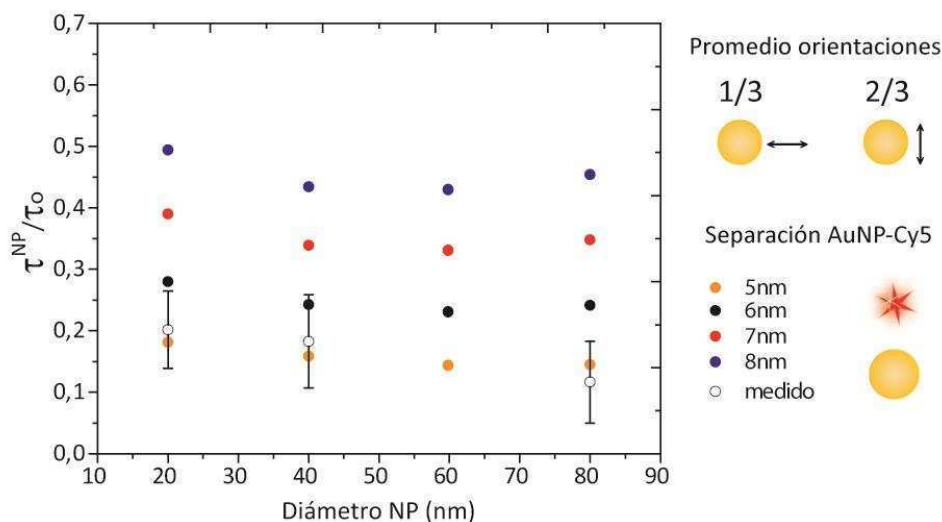


Figura 2.10 Modificación del tiempo de vida media de fluorescencia ($\frac{\tau_{NP}}{\tau_0}$) producido por una AuNP para un fluoróforo que puede rotar libremente. Los datos experimentales son para AuNPs de 20, 40 y 80 nm. Las barras de error representan la propagación del $\pm 2\sigma$ estimado del ajuste de las distribuciones de tiempo de vida medido. Los cálculos se realizaron para 20, 40, 60 y 80 nm, y para distancias de separación entre la AuNP y el fluoróforo de 5, 6, 7 y 8 nm. La situación de libre rotación se computo sumando 1/3 de la respuesta de un dipolo radial + 2/3 de la de uno tangencial)

2.3.3 Cambios en la Intensidad de fluorescencia en presencia de AuNP

Una vez clasificadas las poblaciones, se puede analizar las distribuciones de intensidad de los fluoróforos en presencia y ausencia de NPs. En la figura 2.11 se presenta la intensidad de cada molécula en función de su tiempo de vida media, para las moléculas medidas en cada ensayo. Las intensidades fueron normalizadas por el promedio de la población de referencia de cada muestra. La referencia de cada una presenta una distribución de intensidades de fluorescencia similar. Las intensidades en presencia de NP son diferentes dependiendo del tamaño de la NP. Cuando se encuentran cerca de AuNPs de 20 nm, el fluoróforo emite en promedio con una intensidad un 30% menor a la referencia. Sin embargo las NPs de 40 nm generan un pequeño aumento en la intensidad, mientras que las de 80nm producen un fuerte aumento de 3 a 20 veces en la intensidad de la referencia. Estos resultados se encuentran en concordancia con trabajos anteriores⁸⁸.

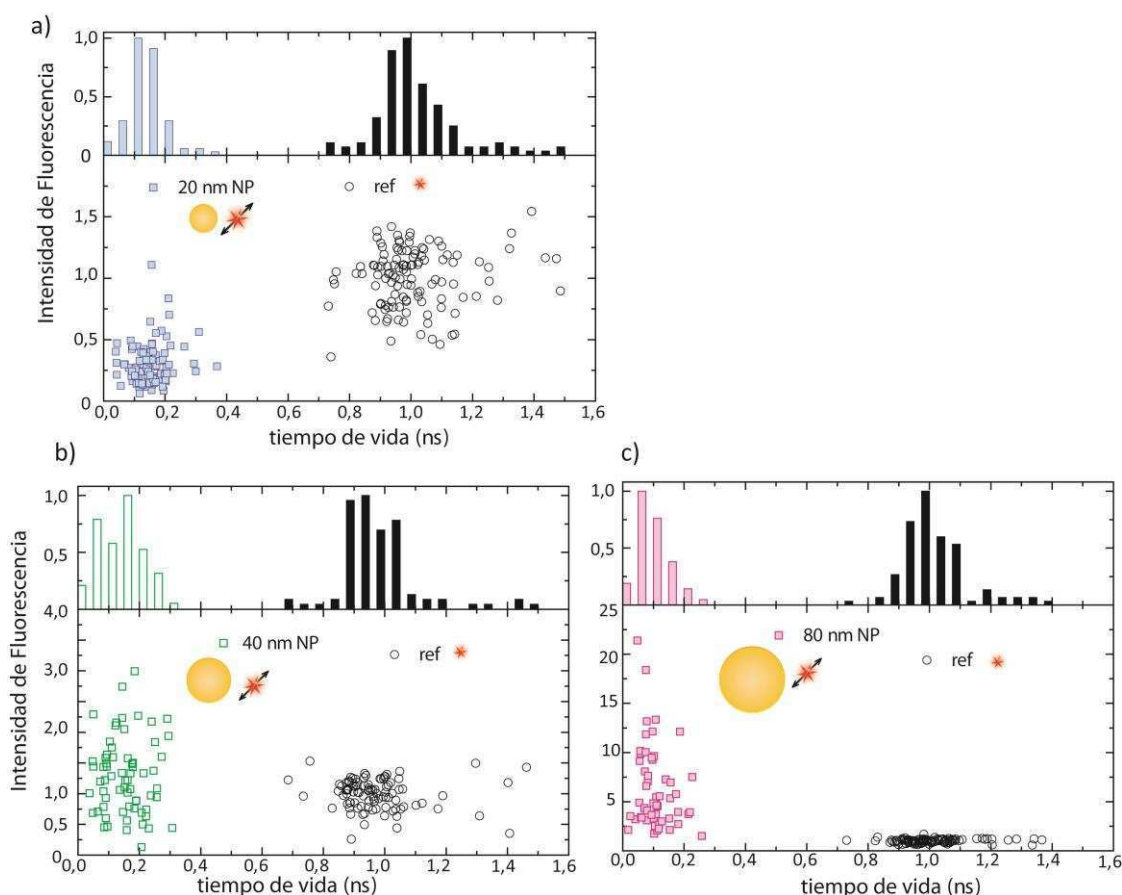


Figura 2.11 Paneles superiores: Histogramas de tiempo de vida de fluorescencia normalizados para las muestras con AuNPs de 20 a), 40 b) y 80 c) nm de diámetro. Se distingue una población con un tiempo de vida promedio de 1ns correspondiente al ADN-Cy5 sin AuNP y otra con tiempos de vida más cortos correspondiente a ADN-Cy5 con una AuNP adherida. Paneles inferiores: gráficos de dispersión de intensidad de fluorescencia vs. tiempo de vida. Los valores de intensidad de fluorescencia fueron normalizados al valor medio obtenido en la referencia.

El ancho de la distribución de intensidad está dado por dos efectos que hacen variar la intensidad de excitación. En primer lugar hay una distribución relacionada con las posibles orientaciones con respecto a la normal del substrato con las que podría quedar el pilar al adherirse a la superficie de vidrio, y en consecuencia a la polarización del campo incidente¹⁵⁷. El otro efecto está asociado a la distribución normal de tamaños y formas que posee cada lote de partículas^{88,162}. Por otro lado, los cambios en intensidad no pueden ser únicamente asignados a cambios en la excitación, ya que la eficiencia de emisión Q_r también se ve modificada, debido a que las AuNPs producen modificaciones tanto en k_r como en k_{nr} . A partir de los cálculos se observa que la eficiencia cuántica relativa $\frac{Q_r}{Q_r^0}$, varía entre 0.3 y 0.8 dependiendo el tamaño de la partícula.

Utilizando la misma estrategia utilizado para calcular las variaciones de tiempo de vida, es posible modelar también la variación de intensidad de fluorescencia esperada en presencia de una AuNP:

$$\frac{I}{I^0} = \frac{k_{exc}}{k_{exc}^0} \cdot \frac{Q_r}{Q_r^0} \quad (2.9)$$

donde se utilizaron los superíndices cero, para referir a la situación del fluoróforo libre. En la figura 2.12 se presenta los valores calculados de I/I^0 para distancias de separación de 5, 6, 7 y 8 nm, junto a los datos medidos.

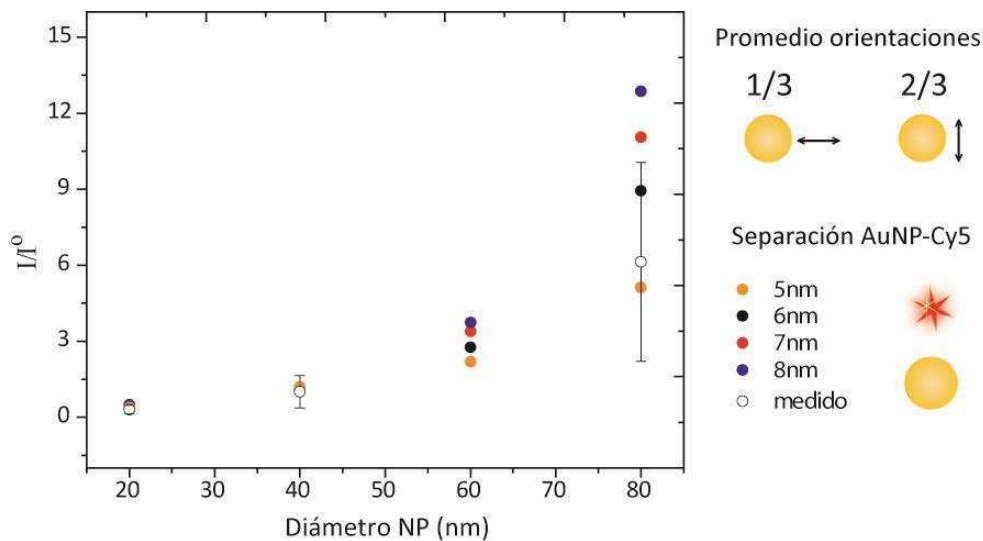


Figura 2.12 Variación de intensidad de fluorescencia producida por una AuNP, experimental y calculada, para varios diámetros de AuNPs y distancias de separación entre el fluoróforo y la AuNP. Las barras de error representan la propagación del $\pm 2\sigma$ estimado del ajuste de las distribuciones de fluorescencia medidas.

Los datos medidos se ajustan a las simulaciones con diferencias menores del 10% con respecto al promedio calculado. Las barras de error (de hasta un 60%), están relacionadas con el ancho de las distribuciones ($\pm 2\sigma$), que son consecuencia de los factores previamente descritos. Si bien para las NP de 20 y 40 la intensidad de fluorescencia presenta cambios menores del 10% al modificar la separación AuNP-Cy5, para las NP de 80nm la distancia de separación produce efectos apreciables. Al igual que para las mediciones de tiempo de vida media de fluorescencia, la concordancia mejor entre cálculos y experimentos se da para distancias de separación de entre 5 y 6 nm.

2.3.4 Total de fotones emitidos antes del fotoblanqueo

El fotoblanqueo es un proceso estocástico debido a una o múltiples reacciones fotoquímicas que dan por resultado una tasa promedio k_b . El número total de fotones emitidos por cada fluoróforo individual es una variable que sigue una distribución exponencial. La probabilidad de que la molécula x emita n fotones estará dada por:

$$P(N_x = n) = \frac{1}{N} e^{-n/N} \quad (2.8)$$

Donde N es el promedio poblacional un gran número de moléculas del número total de fotones emitidos hasta el fotoblanqueo.

En este sentido, observar comportamientos individuales, como por ejemplo, el número máximo de fotones emitidos por una molécula particular, no brinda información alguna. Por ejemplo, incluso en la población de referencia es posible encontrar una molécula que emita una gran cantidad arbitraria de fotones, muy por encima del promedio, simplemente por pertenecer a la cola asintótica de la distribución exponencial.

Para investigar cambios en la fotoestabilidad se requiere una medición correcta de N , y para ello es necesario medir el número total de fotones emitidos por un gran número de moléculas y ajustar su distribución por (2.8).

En la figura 2.13 se presentan las distribuciones del número total de fotones n colectados de cada población de fluoróforos, normalizadas y en escala logarítmica. Como primera observación, se puede notar que todas las distribuciones son mono-exponenciales confirmando que cada población diferenciada por su tiempo de vida de fluorescencia corresponde a una única población en términos de fotoblanqueo. Esto es fundamental para poder aplicar la ecuación (2.8) y obtener de manera confiable un número promedio de fotones emitidos N .

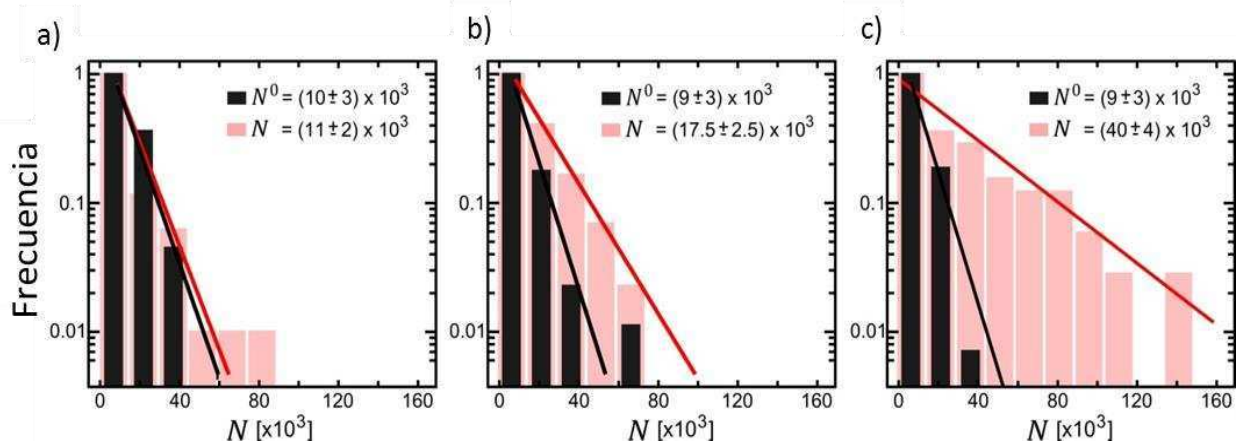


Figura 2.13 Histogramas normalizados de número total de fotones emitidos n por Cy5 en la muestra con AuNPs de 20 (a), 40 (b) y 80 (c) nm de diámetro. Cada histograma graficado en escala logarítmica se ajustó por una exponencial simple (rectas). En la leyenda se muestra el promedio de número de fotones obtenido de los ajustes $N \pm 2\sigma$.

Se observa que en todas las muestras, la población de referencia posee un valor medio de aproximadamente 9000 fotones totales detectados. En el caso de los fluoróforos de los origami con AuNPs de 20 nm, la distribución es estadísticamente indistinguible de la referencia. A medida que el diámetro de las AuNPs aumenta a 40 y 80 nm, el promedio de número de total de fotones emitidos aumenta a aproximadamente 17.500 y 40.000 fotones totales, es decir ca. 1,9 y 4,3 veces más con respecto a los fluoróforos libres.

El diseño particular del origami de ADN en forma de torre, mantiene a los fluoróforos en un ambiente molecular idéntico, independientemente de la presencia o no de una NP, o del tamaño de la misma. En consecuencia, es razonable asumir que k_b es constante en todas las mediciones y que los cambios en el número promedio de fotones emitidos solo puede deberse a una influencia electromagnética de las AuNPs.

Por último se realizó nuevamente una comparación entre los resultados experimentales y calculados ¹¹¹, con el fin de testear el mecanismo de Purcell para aumento de fotoestabilidad.

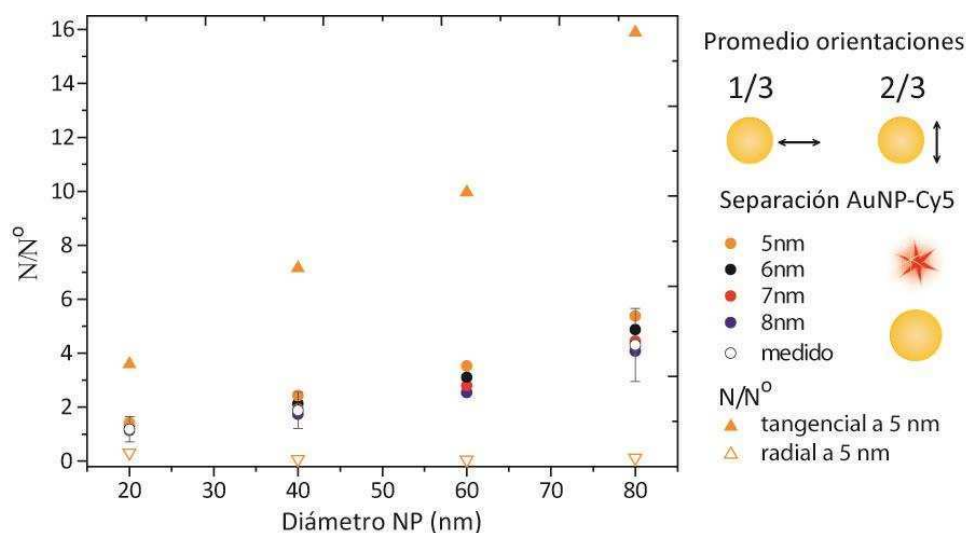


Figura 2.14 Comparación entre el cambio promedio de la tasa de decaimiento radiativo k_r/k_r^0 y el cambio en el número total de fotones emitidos N/N^0 , que se produce en presencia de una AuNP. Los cálculos son para distancias de separación de 5, 6, 7 y 8 nm. Para el caso de 5 nm se muestra también la modificación calculada para un dipolo radial y uno tangencial. Las barras de error de N/N^0 representan la propagación del $\pm 2\sigma$ estimado del ajuste de las distribuciones de N .

Si el mecanismo detrás de las variaciones en el número de fotones emitidos es el efecto Purcell, las variaciones en N deben ir de la mano de variaciones en k_r . Bajo la consideración que la tasa de fotoblanqueo no se vea modificada por la presencia de las NPs, se puede plantear:

$$\frac{N}{N^0} = \frac{k_r}{k_r^0} \cdot \frac{k_b^0}{k_b}, \quad k_b^0 = k_b \rightarrow \frac{N}{N^0} = \frac{k_r}{k_r^0}$$

En la figura 2.14 se grafican los valores experimentales de N/N^0 junto con los valores de k_r/k_r^0 calculados. La concordancia entre los cálculos y los resultados experimentales confirma que la mejora en la fotoestabilidad obtenida es consecuencia del aumento en k_r .

2.4 Conclusiones y Perspectivas

En este trabajo se ha logrado demostrar que el número total de fotones emitidos por un fluoróforo antes de fotoblanquearse puede ser controlado al modificar la densidad de estados fotónicos localmente. Esto se realizó ubicando nanopartículas de oro de 3 tamaños distintos, en la vecindad nanométrica de un fluoróforo. Se observó que la fotoestabilidad depende fuertemente del tamaño. AuNPs de 20 nm producen un efecto despreciable, mientras que las de 80 nm logran que el fluoróforo emita hasta 4 veces más fotones antes de fotoblanquearse.

Los auto-ensamblados de ADN resultaron ser una estrategia excelente para sintetizar una gran cantidad de nano-objetos híbridos conteniendo fluoróforos y partículas metálicas en una geometría bien definida. Esta gran precisión en la geometría, posibilita la comparación cuantitativa de resultados experimentales con cálculos. Es necesario considerar las posibles desviaciones geométricas de las nanoestructuras al momento de contrastar los cálculos con los experimentos. Si bien estas simulaciones son precisas soluciones de las ecuaciones de Maxwell, los valores que arrojen pueden depender significativamente de la geometría del sistema. Se analizaron las variaciones que produce la cercana AuNP en el tiempo de vida media de fluorescencia, la intensidad de emisión y el número total de fotones emitidos. Las variaciones en tiempo de vida media resultaron ser extremadamente sensibles a la separación fluoróforo-AuNP, y permitieron determinar que dicha distancia fue de 5 nm, con un error menor a 1 nm.

El modelado teórico, confirma que la variación en el número de fotones emitidos producida por la presencia de las AuNPs es igual a la variación producida en la tasa de decaimiento radiativo. Esto confirma que el mecanismo por efecto Purcell para el control de la fotoestabilidad y abre las puertas a la exploración de nuevos esquemas con nanoestructuras híbridas capaces de manipular las fotoestabilidad de fluoróforos y otras reacciones fotoquímicas.

Asimismo, este método provee una forma de determinar cambios en la tasa de decaimiento radiativo, que combinada con los tiempos de vida medidos, posibilita calcular el resto de las tasas fotofísicas involucradas en el proceso de fluorescencia.

La tasa de decaimiento radiativo de un fluoróforo ubicado en la vecindad de un NP metálica, puede ser aumentada aún más que en este trabajo, optimizando distancias, controlando orientaciones relativas y condiciones de resonancia. Por ejemplo, en un sistema análogo al usado en este trabajo, pero que permitiera fijar la orientación molecular en la dirección radial con respecto a la AuNP, se obtendría un aumento de 15 veces en el número total de fotones, en lugar de 4, para la AuNP de 80 nm (figura 2.14). Cabe destacar, que dado que la tasa no radiativa no afecta el número de fotones emitidos, aún en situaciones en que el fluoróforo se encuentra suprimido (*quenching*) se deberían detectar más fotones antes del fotoblanqueo de la sonda.

2.5 Materiales y Métodos

2.5.1 Síntesis de Origamis

Las hebras de ADN para las “grampas” modificadas y sin modificar (según la tabla 2.1) fueron adquiridas en MWG (Munich, Alemania) y en IBA (Göttingen, Alemania) a una concentración de 100 μ M, se utilizaron sin necesidad de previas purificaciones. Los origamis de ADN se forman a una relación molar de 1:30 de ADN viral a grampas sin modificar, y con 1:100 entre ADN viral y grampas modificadas. El ADN viral utilizado para el plegado fue amplificado y purificado de cepas de *Escherichia Coli* K91 infectadas con el virus M13mp18 (Biolabs, England).

El origami de ADN fue diseñado con el software de libre acceso caDNAno (www.cadnano.org)¹⁴⁸. Para el plegado del ADN se utilizó un buffer con 12mM MgCl₂ + 5mM Tris + 1mM EDTA (pH 7.9 a 20°C). El tiempo de plegado para el pilar fue de 3 días, mientras que para el rectángulo fue tan sólo de 15 horas. El autoensamblado por hibridación térmica se realizó en un termociclo (MasterCycler Personal, Eppendorf, Alemania). A modo de ejemplo se presenta en la figura 2.15¹⁴² un esquema del plegado y termociclado para formar un origami rectangular de ADN.

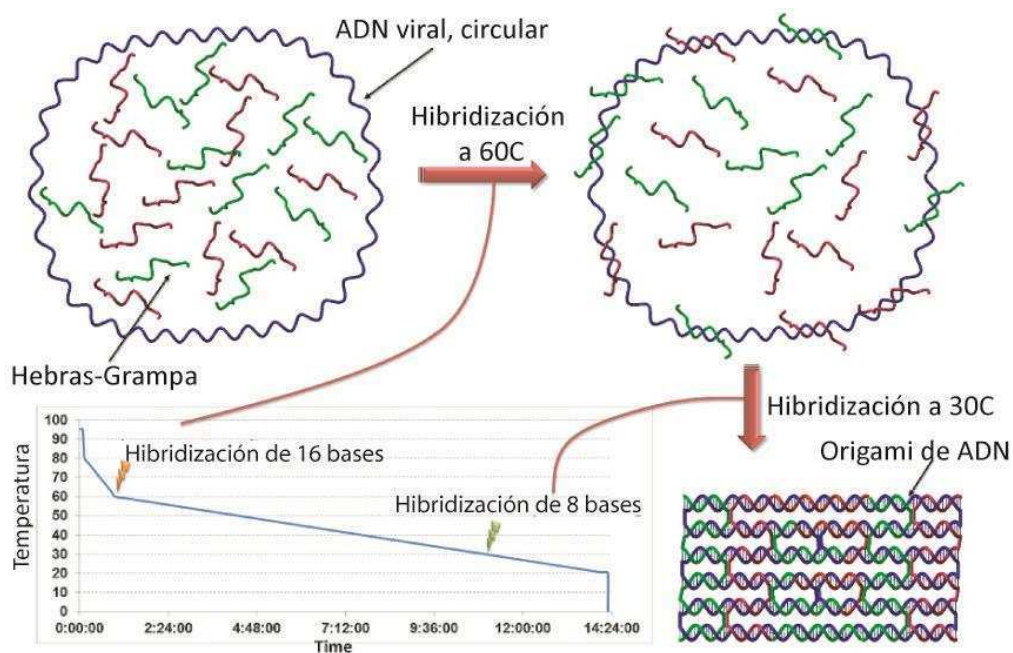


Figura 2.15 Representación del plegado de ADN para la formación de un origami rectangular. La mezcla de ADN viral con exceso de grampas se hace reaccionar a bajo un termociclado controlando tiempos y temperaturas de manera que las grampas se unen paulatinamente hasta lograr el plegado más estable correspondiente al origami diseñado.

Una vez sintetizado el origami, se filtró la solución para la extracción del exceso de hebras de ADN según el siguiente protocolo.

Protocolo 2.1

- Colocar 100µl de muestra de origami plegado en un filtro Amicon Ultra 100K (Amicon Ultra-0.5 ml Centrifugal Filters, 100.000 MWCO) y completar con TAE 1X + MgCl₂ 12.5 mM
- Centrifugar a 14 krcf por 5 minutos a 4°C
- Descartar el buffer y rellenar con la solución de TAE
- Repetir dos veces
- Colocar el filtro dado vuelta en un eppendorf limpio y recuperar la solución concentrada centrifugando 3 minutos a 800 rcf a 4°C.
- Conservar en heladera hasta su uso

En la figura 2.16 se presentan imágenes de AFM tomadas del origami rectangular y del pilar. Al tratarse de una estructura tridimensional, la imagen del pilar dependerá de la orientación adoptada al depositarse sobre la mica. La imagen se tomó en modo tapping en aire.

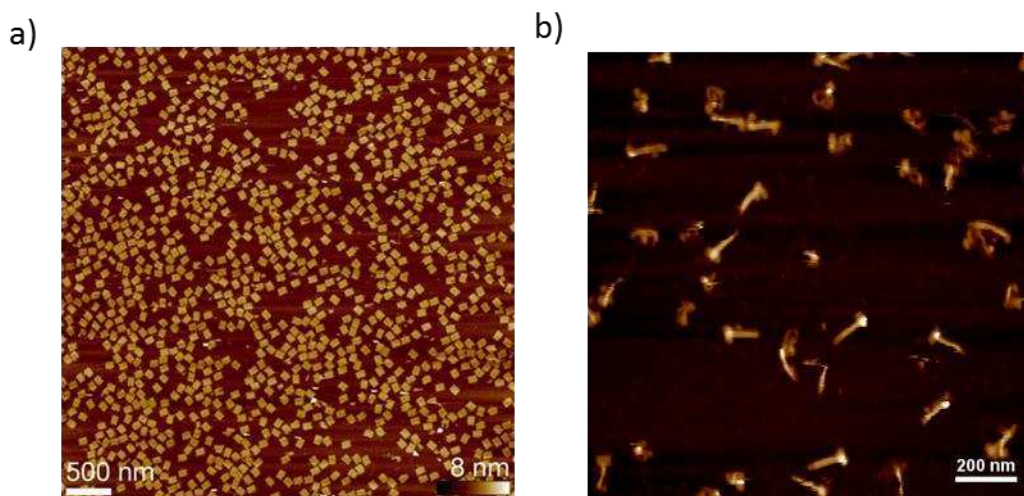


Figura 2.16 Imágenes de AFM tomadas en modo tapping y en aire de los origamis de ADN utilizados a) rectángulos, b) pilares. Imágenes tomadas por Enrico Pibiri (Tinnefeld Group, TU Braunschweig, Alemania) sobre los origamis sintetizados.

2.5.2 Marcación de Nanopartículas

Las partículas esféricas de oro (BBI, Escocia) en solución acuosa, fueron funcionalizadas con un oligonucleótido T15 de ADN, VBC Biotech (www.vbc-biotech.com) con el extremo 5' modificado con un thiol, siguiendo el protocolo descrito a continuación y puesto a punto por el grupo del Dr. Tinnefeld.

Todos los elementos utilizados para la funcionalización de las AuNPs deben ser cuidadosamente lavados de manera de evitar que impurezas en la solución provoquen el agregado del coloide.

Colocar 1 ml de solución de AuNP de densidad óptica 1, del tamaño requerido en un vial de vidrio. Colocar un buzo magnético y dejar en agitación durante todo el proceso.

Protocolo 2.2

- Agregar oligonucleótidos desprotegidos (considerar el agregado previo de TCEP en caso de no traer los oligonucleótidos adquiridos). Las cantidades corresponden a oligonucleótidos en concentración 100 μ M

Partículas	Au20	Au40	Au60	Au80	Au100
Volumen [μ l]	48	24	15,5	11,5	11,5

- Incubar en agitación durante toda la noche
- Agregar Tween20 10% (Sigma) y dejar actuar como mínimo 15 minutos.
- Agregar 10 μ l de soluciones P8709 y P8584 (Sigma-Aldrich) y dejar nuevamente 15 minutos

Agregado paulatino de sal. Es necesaria una cantidad mínima de sal para que los oligonucleótidos se encuentren en condiciones biológicas y por lo tanto puedan adherirse a la superficie de la NP. Sin embargo los coloides tienden a agregarse a concentraciones elevadas de sal. Por esta razón, es necesario realizar el agregado de sal de forma paulatina, para que las NPs logren estabilizarse luego de cada paso. Se llevará la solución a una concentración final de 700mM de NaCl, agregando de 25mM hasta los 100mM finales, y luego en pasos de 50mM hasta llegar a la concentración final.

A modo de ejemplo, para 2 ml de AuNP, se deben realizar 27 pasos en intervalos de tiempo no menores a 10 minutos. En los primeros 4 pasos se agregarán 19 μ l de 2M NaCl y 0.1% Tween20, mientras que en los siguientes 23 se debe agregar de a 38 μ l.

- Incubar toda la noche

Filtrado y redispersión

- Centrifugar las partículas 10 min a 20°C a 4krf. Reducir este tiempo y la velocidad para las partículas más grandes
- Descartar el sobrenadante y transferir la solución de AuNPs a un filtro Amicon Ultra 100K (Amicon Ultra-0.5 ml Centrifugal Filters, 100.000 MWCO) y completar si es necesario con PBS 1X + NaCl 100mM
- Centrifugar 10 minutos a 5krf a 20°C, descartar el buffer y rellenar con PBS 1X + NaCl 100mM
- Repetir el filtrado 2 veces más
- Vaciar el contenido del filtro dándolo vuelta sobre un eppendorf limpio y centrifugar 2 minutos a 4krf
- Conservar en heladera hasta su utilización

2.5.3 Preparación de Superficies

Las muestras de origami para las mediciones de fluorescencia fueron inmovilizadas en cámaras Labtek (Nunc™ Lab-Tek™ II Chamber Slide™ System), según el siguiente protocolo.

Protocolo 2.3

- Cargar la superficie de cada cámara a utilizar colocando HF 0.1%v/v durante 1 minuto
- Lavar con PBS 1X cuatro veces.
- Mezclar 1ml de BSA 1mg/ml con 500µl de BSA-biotina 1mg/ml (estas cantidades se pueden modificar según la población de origami que se requiera)
- Agregar 300 µl de la solución anterior en cada cámara e incubar toda la noche
- Lavar 3 veces con PBS 1X
- Agregar a 350 µl de PBS 1X, 50 µl de neutravidina 1mg/ml
- Colocar 100 µl en cada cámara
- Dejar incubar 30 minutos
- Lavar 3 veces con PBS 1X

2.5.4 Preparación de muestras

Se realiza una dilución 1:100 de origamis filtrados en PBS 1x + MgCl₂ 12.5 mM. Se coloca 100 µl de solución por cámara Labtek funcionalizada y se deja reaccionar hasta tener la densidad de estructuras deseada (ca. 1 origami/ µm²). Los origamis se pegarán a la estreptavidina de la superficie desde las hebras extendidas con biotina, es decir, desde su base. La densidad de estructuras se puede ir monitoreando observando la fluorescencia del dye incorporado al origami. Una densidad óptima es obtenida en ca. 10 minutos para los cuadrados y ca. 20 y 30 minutos para los pilares.

La superficie se limpia del exceso de ADN con PBS 1X. Para marcar los origamis con AuNP, se prepara un dilución en PBS 1x+NaCl 700mM, a partir del concentrado obtenido luego de filtrarlas. Esta dilución debe quedar entre 1 y 2 O.D. Las AuNP se agregan a cada Labtek con origami fijado y se dejan reaccionar hasta obtener la eficiencia de marcado buscada. Para el caso de las partículas de 20 nm el tiempo normal de pegado es de aproximadamente 6 horas, mientras que para las más grandes se requiere de una noche. La eficiencia de marcado se verifica realizando mediciones de puntos brillantes al azar y estudiando su tiempo de vida.

Dado que tanto la funcionalización como el plegado del pilar de ADN puede fallar, se utiliza el rectángulo como método de control para verificar las condiciones de las partículas o del origami. Dado que el rectángulo es un origami sencillo de obtener y largamente estudiado, difícilmente falle al sintetizarlo. Por ello si a una muestra de pilares no se pegan las partículas, por ejemplo, se recurre al rectángulo. Si el mismo grupo de partículas se pegan a éste, será necesario chequear el estado del origami. Si en cambio las partículas no se pegan al rectángulo, entonces es probable que la funcionalización de su superficie no sea óptima o se encuentren agregadas. En este sentido siempre se trabaja con una muestra de origamis rectangulares como control así no sean necesarios para el ensayo en sí.

2.5.5 Sistema de adquisición

La fluorescencia de moléculas únicas fue medida en un microscopio confocal construido a partir de un microscopio invertido (IX71, Olympus) adaptado (esquemización en figura 2.17). Se utilizó con un objetivo de inmersión en aceite de 1.4 de apertura numérica (100x/NA1.4, UPLSAPO100XO). El fluoróforo Cy5 fue excitado a 640nm con un diodo láser pulsado a 80Mhz (LDH-D-C-640, Picoquant), con una potencia de 1µW en la pupila del objetivo. La polarización circular del láser se logró combinando un polarizador lineal y una lámina de cuarto de onda. El haz es dirigido a la muestra por medio de un filtro dicróico (Dualband z532/633, AHF).

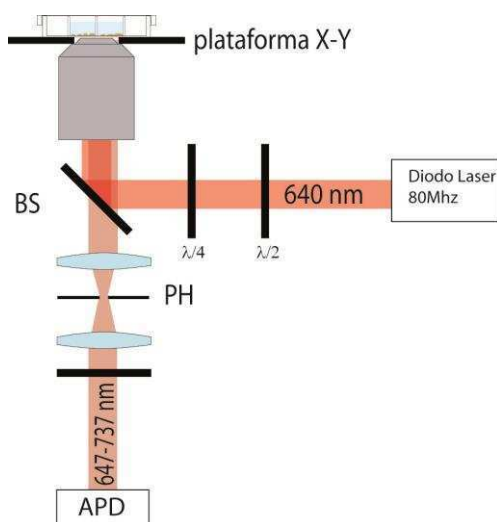


Figura 2.17: Esquema del dispositivo experimental. BS: espejo dicróico, L: Lentes, APD: fotodiodo de avalancha.

La superficie con los origamis de ADN inmovilizados es escaneada con un nanoposicionador piezoeléctrico (P-517.3CL, Physik Instrumente). Con este mismo posicionador, las moléculas seleccionadas a partir de la imagen, son colocadas en el foco para el análisis resuelto en el tiempo. La fluorescencia resultante es colectada por el mismo objetivo, enfocada en un pinhole de $50\mu\text{m}$ y separada de la excitación con dos filtros (bandpass ET 700/75m, AHF; RazorEdge LP647, Semrock). La señal es detectada por un módulo de conteo de fotones individuales (t-SPAD 100, Picoquant) y una tarjeta de PC para conteo de fotones individuales correlacionados en el tiempo (SPC-830, Becker&Hickl). Los datos crudos son procesados por un software desarrollado particularmente por el grupo del Dr. Tinnefeld en la plataforma (figura 2.18) Labview (LabView2009, National Instruments).

2.5.6 Análisis de tiempo de vida de fluorescencia

Los decaimientos de tiempo de vida fueron ajustados por función monoexponencial convolucionada con la respuesta experimental del instrumental (IRF) utilizando una rutina armada en IgorPro (Wavemetrics). La respuesta del instrumental fue medida sobre una muestra de nanopartículas de 80 nm dispersas sobre un cubreobjetos. El ancho de la IRF (FWHM=650 ps) será entonces quien limite la resolución temporal del instrumento para medir decaimientos.

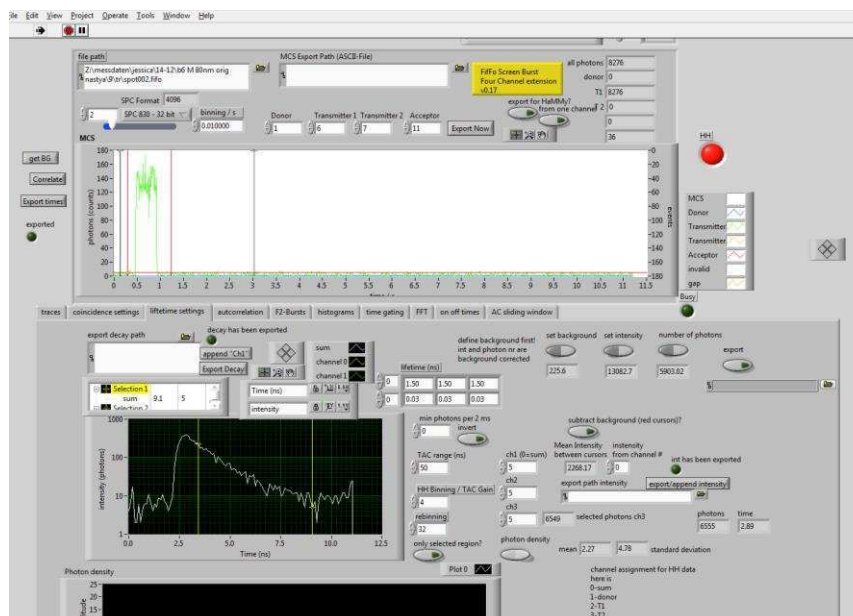


Figura 2.18: Impresión de pantalla de programa para análisis de traza desarrollado en LabView. En el panel superior se presenta una traza típica de Cy5, y en el panel inferior el decaimiento de tiempo de vida para la sonda estudiada.

2.5.7 Distribuciones de Tamaños de Nanopartículas Esféricas

La distribución de tamaños de partículas de 20, 40 y 80 nm de diámetro, ha sido previamente estudiada y determinada por el grupo del Dr. Tinnefeld¹⁶³. En la figura 2.19¹⁶³ se presentan imágenes obtenidas por microscopía de barrido electrónico. Las distribuciones medidas fueron:

20nm: (19.4 ± 1.7) nm, (figura 19 a)

40nm: (43.5 ± 4.6) nm, (figura 19 b)

80nm: (80.1 ± 7.4) nm, (figura 19c)

En las imágenes se puede observar que para algunos casos hay una desviación de la geometría esférica.

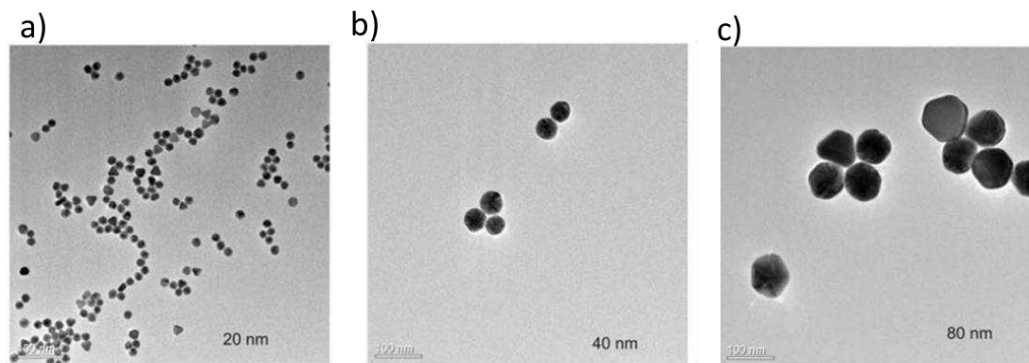


Figura 2.19 Imágenes de TEM de las AuNP, a) 20nM, b) 40nM, c) 80nM.

2.5.8 Simulaciones Numéricas

Las simulaciones numéricas se realizaron con un programa comercial de FDTD (*finite difference time domain, FDTD, Microwave Studio, Computer Simulation Technology, Darmstadt, Alemania*). Los cambios relativos de los decaimientos radiativos y no radiativos, como así también los cambios de intensidad fueron obtenidos siguiendo la ref. ⁽²²⁾, modelando el fluoróforo por un dipolo con una orientación definida (tangencial o radial a la superficie de la AuNP). Se computa la potencia total irradiada en el campo lejano y disipada por el objeto metálico y es normalizada por la potencia total irradiada en el campo lejano, en ausencia de la AuNP. Para estos cálculos se consideró como eficiencia cuántica intrínseca de Cy5 0,28. Todas las simulaciones se realizaron con agua como medio, simulando las condiciones del buffer. Sin embargo los efectos que pudieran surgir como resultado de la interfaz del vidrio, desviaciones de las geométricas de las partículas (que no sean perfectamente esféricas), la distribución de orientaciones posibles del origami de ADN, o la posibilidad que la AuNP no esté unida de todos los sitios de anclaje, no han sido contempladas.

3

Modulación fototérmica de fluorescencia por calentamiento plasmónico

En este capítulo se presenta la investigación de un método novedoso que combina propiedades de fluoróforos y nanopartículas metálicas para crear una sonda de fluorescencia modulable. Se realizaron experimentos que aumentan gradualmente el nivel de control. Primero en muestras de aglomerados AuNRs, luego variando la potencia del haz de calentamiento y finalmente en grupos pequeños de AuNRs. Se definieron los parámetros relevantes tanto de fluoróforos como de las NPs, y su posible campo de aplicación.

3.1 Sondas fluorescentes modulables

Debido a su carácter no invasivo, la microscopía óptica es el método de elección para la investigación de procesos celulares. En particular las modalidades basadas en fluorescencia han tenido grandes avances en los últimos años, incluyendo la detección de moléculas individuales y los métodos de super-resolución¹⁶⁴⁻¹⁶⁶. Estas técnicas permiten examinar con gran detalle aspectos de la estructura así como de trayectorias e interacciones en sistemas celulares y subcelulares.

Sin embargo, el desafío de poder observar y manipular las funciones celulares específicas en células vivas, tejidos y organismos continúa vigente. Una de las grandes limitaciones de esta técnica es el lograr discriminar la señal de interés de la autofluorescencia o de la marcación exógena o inespecífica¹³. Con este fin continuamente se están desarrollando sondas o proteínas fluorescentes en el rojo lejano, de manera de evitar la autofluorescencia celular que suele estar en el rango del verde. Estas sondas, sin embargo, suelen tener limitaciones de brillo y estabilidad. Otro enfoque más reciente

busca utilizar sondas modulables, de manera de realizar una detección tipo lock-in para amplificar la señal de la frecuencia modulada^{13,167}. Este enfoque, apunta a lograr especificidad de la modulación, de manera de poder filtrar y amplificar selectivamente la señal de fluorescencia deseada, aumentando la relación señal/fondo.

Los compuestos fotocromicos han tomado gran relevancia en este sentido, ya que resultan de gran interés para aplicaciones en microscopias de alta resolución. Estas sondas, tienen la capacidad de cambiar de un estado oscuro (no emisor) a un estado brillante (fluorescente), luego de ser irradiado a la longitud de onda de activación^{168,169}. Alternativamente, existen moléculas que mediante un cambio de conformación activado ópticamente, modifican radicalmente la longitud de onda de emisión, lo cual en la práctica cumple la misma función. El retorno al estado inicial puede darse térmicamente o mediante irradiación con otra longitud de onda. El tiempo característico del encendido/apagado en conjunto con la reversibilidad, e.d. número posible de ciclos de prendido apagado, determinará las posibles aplicaciones de estos fluoróforos. Por ejemplo, moléculas que puedan ser apagadas mediante luz y retornen al menos una vez (térmicamente o inducidas por luz) pueden ser útiles en microscopías de fluorescencia de super-resolución. Por otro lado, si a lo que se apunta es a aplicar detección lock-in, varios ciclos de prendido-apagado son necesarios. Si bien los compuestos fotocromicos presentan propiedades sumamente ricas y versátiles para mediciones de fluorescencia, no suelen ser de fácil preparación. Sus síntesis complejas hacen que sean comercialmente de difícil acceso.

Por otro lado, el uso de NPs metálicas, magnéticas y semiconductoras funcionalizadas con biomoléculas está siendo investigado extensivamente con el fin de visualizar y cuantificar interacciones biomoleculares. Incluso combinándolas con compuestos fotocromicos¹⁶⁹.

En este capítulo se desarrolla la investigación de un método novedoso que combina propiedades de fluoróforos y nanopartículas metálicas para crear una sonda de fluorescencia modulable.

3.1.1 Sondas híbridas modulables por calentamiento plasmónico

La hipótesis de trabajo de este capítulo consiste en que la fluorescencia de moléculas cercanas a NPs metálicas puede modularse térmicamente, mediante el calentamiento plasmónico de las NPs (figura 3.1) y que dicha modulación puede ser útil en esquemas de detección de fluorescencia de mayor sensibilidad y/o especificidad.

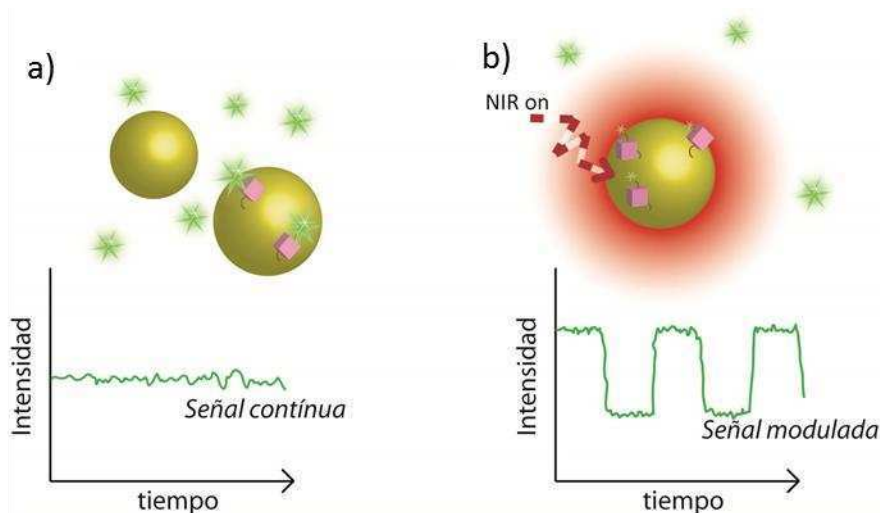


Figura 3.1 Utilización del calentamiento fototérmico para generar sondas modulables específicas. a) En ausencia de radiación fototérmica, estén los fluoróforos adheridos o no a la superficie de la NP, la señal de fluorescencia detectada será continua. b) Al irradiar la muestra con la luz de calentamiento (NIR on) se genera un campo de alta temperatura en el entorno nanométrico de las NPs, y una consecuente reducción de fluorescencia de las moléculas unidas a las NPs.

La mayor sensibilidad se obtiene del hecho que la señal de fluorescencia se modula a una frecuencia conocida, lo cual permite diferenciarla de otras contribuciones. La mayor especificidad se debe a que el calentamiento plasmónico de NPs genera un campo de temperaturas elevadas solo en el entorno nanométrico de las NPs.

El primer objetivo es entonces construir una sonda fluorescente híbrida que combine una NP metálica y fluoróforos sensibles a la temperatura. Existe una gran variedad tanto de NPs metálicas como de fluoróforos, por lo que es necesario identificar criterios que permitan una selección adecuada:

- 1- tiene que ser posible excitar la fluorescencia y calentar las NPs de manera independiente.
- 2- los fluoróforos deben ser sensibles a la temperatura.
- 3- se precisa una química de unión de fluoróforos a la superficie de las NPs

El primer criterio es el más limitante y fue el usado para seleccionar las NPs metálicas. Luego, se seleccionó un fluoróforo adecuado. Para unir los fluoróforos a las NPs se usó la interacción específica biotina-estreptavidina.

3.2 Caracterización de fluoróforos y Nanopartículas para la construcción de una sonda modulable

3.2.1 Nanopartículas de oro

Las nanopartículas metálicas más comunes y mejor caracterizadas son las nano-esferas de oro, las cuales poseen una única resonancia plasmónica ubicada en el centro del espectro visible, entre 520 y 550 nm dependiendo del diámetro. Además, el oro posee una absorción no despreciable a energías mayores que el LSPR debido a transiciones interbanda (ver figura 3.2 a). Dado que los fluoróforos más comunes absorben y emiten en el visible, las nano-esferas de oro no son adecuadas para modular fluorescencia mediante calentamiento plasmónico. Si se usa un fluoróforo cuya excitación se ubica hacia el azul de la LSPR, la excitación de fluorescencia estará acompañada de absorción y calentamiento indeseados en las NPs debido a las transiciones interbanda del oro. Además, la emisión del fluoróforo se solapará con la absorción de la NP, lo cual es una configuración eficiente para la transferencia de energía a la NP, quencheando la emisión de fluorescencia. Si en cambio se usa un fluoróforo cuya excitación se ubique hacia el rojo de la LSPR, el mismo haz de calentamiento estaría excitando al fluoróforo dado que los espectros de excitación poseen usualmente una cola no despreciable hacia el azul.

Esto indica que lo ideal para una excitación independiente de fluorescencia y de plasmones es usar NPs con resonancias ubicadas hacia el rojo de la emisión del fluoróforo. Dado que existe una enorme variedad de fluoróforos en el rango visible, aparecen como ideales para el calentamiento independiente NPs con LSPRs en el NIR (figura 3.2 b).

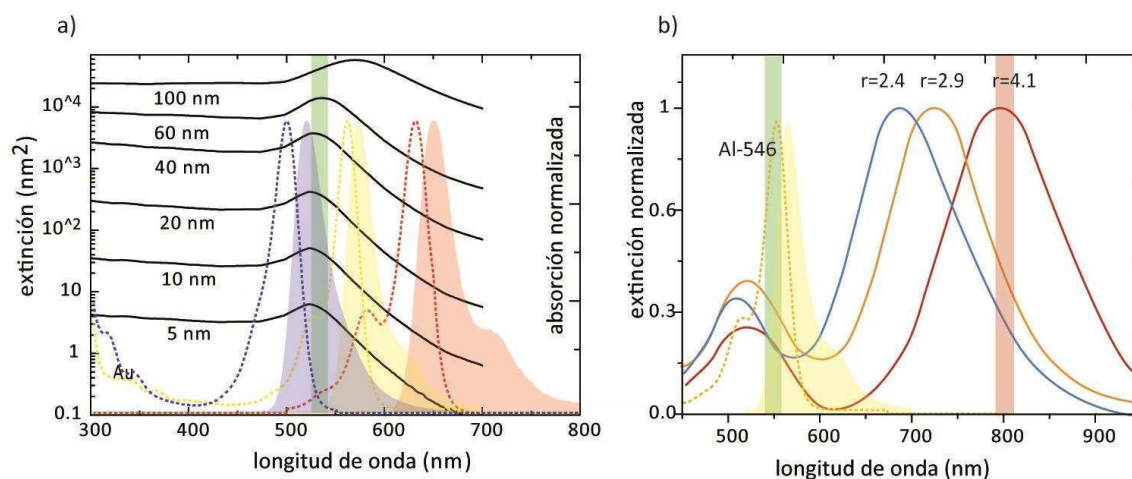


Figura 3.2 Comparación de espectros de absorción de NPs con espectros de fluoróforos comerciales. a) Espectro simulado de nanopartículas esféricas superpuesto con espectro de fluoróforos. Difícilmente se logra excitar un dye sin excitar el plasmón de la NP, y viceversa. b) Espectros simulados de AuNR respecto a fluoróforos comerciales.

Existen varias NPs con resonancias en el NIR, como por ejemplo nano-esferas huecas, nano-bipiramides, nano-estrellas, y nano-varillas^{64,66,79,170-172}. De todas ellas, las mejor caracterizadas y las que pueden obtenerse con mejor nivel de control dimensional son las nano-varillas de oro (gold nano-rods, AuNRs)^{65,76,152,173,174}.

Los AuNRs poseen dos LSPRs, una transversal que se ubica espectralmente alrededor de 530-550 nm y una longitudinal cuya posición espectral se ubica a mayores longitudes de onda y varía marcadamente dependiendo de la relación de aspecto^{174,175}. Variando las dimensiones de los AuNRs es posible ajustar la LSPRs longitudinal desde los 530 nm de la LSPR transversal hasta el NIR (figura 3.2 b). Esta flexibilidad permite diseñar combinaciones de fluoróforos y AuNRs donde la excitación de fluorescencia y el calentamiento plasmónico pueden efectuarse independientemente con dos longitudes de onda distintas.

Teniendo esto en cuenta se decidió usar AuNRs con relación de aspecto cercana a 4, y un fluoróforo que emita entre las dos resonancias del AuNRs, en el rango de 550 a 700. De esta manera usando la luz de 800 nm será posible generar el calentamiento de los AuNRs sin excitar fluorescencia. Y si bien la luz de excitación de fluorescencia, por ejemplo de 532 nm, puede ser absorbida por los AuNRs, la sección eficaz de absorción en el rango de la LSPR transversal es al menos 6 veces menor que en el rango de la LSPR longitudinal.

Se decidió trabajar con AuNR biotinizados comerciales (Nanopartz, USA) de 42x10nm ($\sigma = 3,8 \cdot 10^{-4} \mu m^2$, sección eficaz de absorción reportada por el fabricante) y de 100x25nm ($\sigma = 2,4 \cdot 10^{-3} \mu m^2$). En la figura 3.3 se presentan espectros de absorción e imágenes de microscopía electrónica de las AuNRs utilizados.

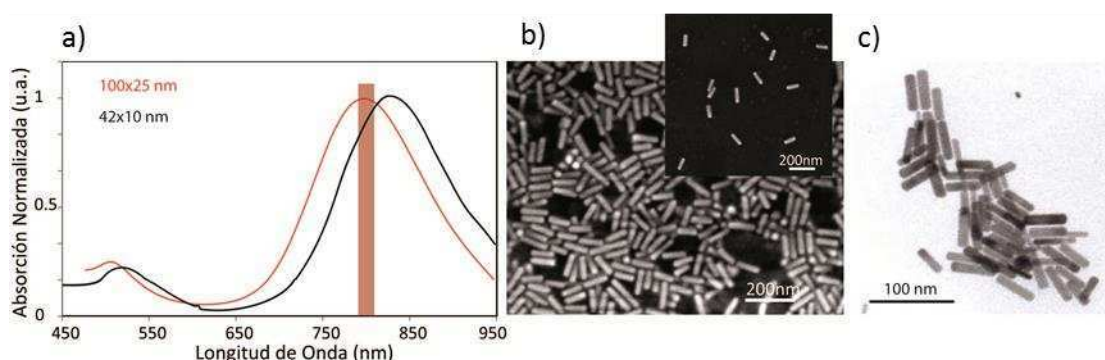


Figura 3.3 a) Espectro de absorción normalizado de AuNR de 100x25 (rojo) y de 42x10nm (negro). b). Imágenes de SEM (CMA, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA) de NP de 100x25nm. c) Imagen de TEM provista por el fabricante (Nanopartz) de partículas de 42x10nm.

3.2.2 Dependencia con la temperatura de la fluorescencia de AlexaFluor532 y AlexaFluor546

Se decidió trabajar con los fluoróforos AlexaFluor532 y AlexaFluor546 (Invitrogen), que poseen buenos rendimientos de fluorescencia, son solubles en agua y comercialmente disponibles modificados con biotina o unidos a estreptavidina, condición necesaria para la unión a los AuNRs y correctos controles. Ambos fluoróforos poseen emisión en el rango de 550 a 650 nm, y pueden excitarse a 532 nm.

En primer lugar se estudió la respuesta en solución de los fluoróforos seleccionados con la temperatura, ya que no se conocen reportes. Si bien la mayoría de las sondas fluorescentes poseen un rendimiento cuántico dependiente de la temperatura^{176,177}, ciertas moléculas presentan menor respuesta, o casi nula como es el caso de algunos perilenos. Si bien esto depende de múltiples factores, generalmente se encuentra relacionado con su rigidez estructural, de manera que las moléculas más rígidas suelen poseer una menor tasa de decaimiento no-radiativo¹², por lo que su rendimiento cuántico se ve menos alterado.

Se midió el espectro de emisión de AlexaFluor546 y AlexaFluor532 y su respuesta se comparó con la de Rodamina B, una sonda de referencia bien estudiada y reportada en la literatura^{178,179}.

Los espectros de emisión de fluorescencia fueron adquiridos con un espectrofotómetro (Cary 100 Varian, USA), y la temperatura se varió entre 20°C y 80°C utilizando un dispositivo termoeléctrico (Peltier). En la figura 3.2.3 se presentan los espectros medidos para AlexaFluor 532 y 546, para dos casos con $\Delta T^{\circ} = 0$ y $\Delta T^{\circ} = 40$ (donde ΔT° se definió como la diferencia de temperatura entre el estado final y el inicial, 20°C en este caso).

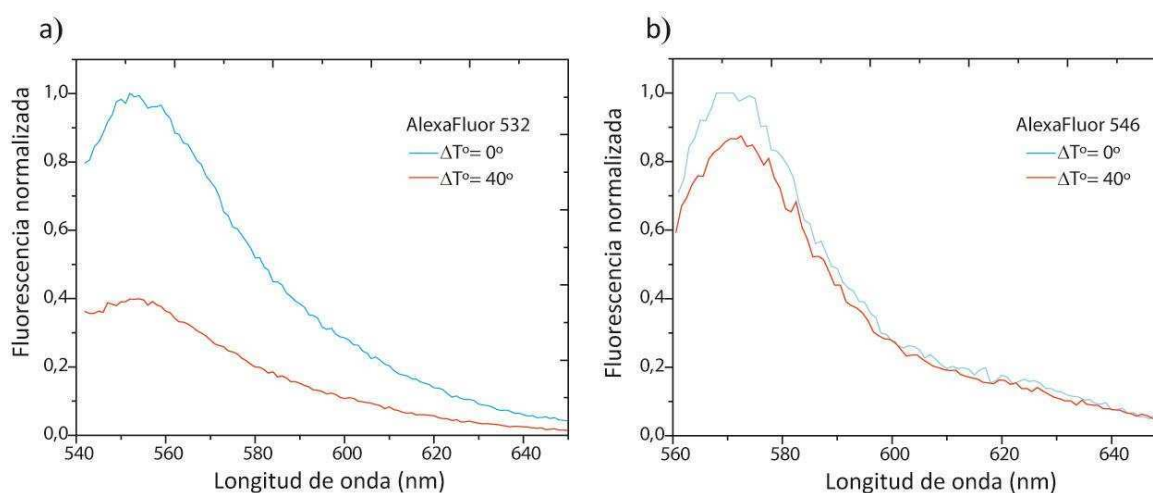


Figura 3.4 Espectros de fluorescencia normalizados por el máximo medido a $\Delta T^{\circ} = 0$, a temperatura ambiente ($\Delta T^{\circ} = 0$) y calentados a $\Delta T^{\circ} = 40$, para a) AlexaFluor532 y b) AlexaFluor 546.

En los espectros de emisión se observa únicamente una disminución en la intensidad, sin corrimientos espectrales apreciables. De estos resultados, sin embargo no puede concluirse si esta caída se debe a una menor eficiencia de excitación, como consecuencia de un corrimiento en los espectros de absorción. De todas formas, si la intención es utilizar esta sonda para estudios de microscopía, la excitación en ese caso, se mantendrá fija, por lo que a los efectos de la adquisición, la caída de intensidad debería corresponderse con las de la figura 3.4, independientemente del efecto al que se debiera (para más detalles ver materiales y métodos).

En la figura 3.5 se muestra la intensidad de fluorescencia normalizada en función de la temperatura. Estos fluoróforos presentan un decaimiento prácticamente lineal de la intensidad de fluorescencia con la temperatura, pero con distintas pendientes: la intensidad de fluorescencia de la AlexaFluor546 cae a razón de 0.35%/K, mientras que la Rodamina lo hace a 0.9%/K y la AlexaFluor532 1.2%/K.

Un aumento de la temperatura también puede acelerar las reacciones fotoquímicas involucradas en el fotoblanqueo. Es importante caracterizar este aspecto de los fluoróforos ya que un fluoróforo muy lábil al fotoblanqueo no es adecuado para estudios de modulación donde se necesita adquirir varios ciclos. Para realizar estos estudios de fotoblanqueo, es necesario inmovilizar la muestra para evitar que la misma se renueve en el tiempo, antes de observar su blanqueo. Por esta razón, se monitoreó en un microscopio de epi-fluorescencia la intensidad de emisión en el tiempo de fluoróforos inmovilizadas sobre un cubreobjetos.

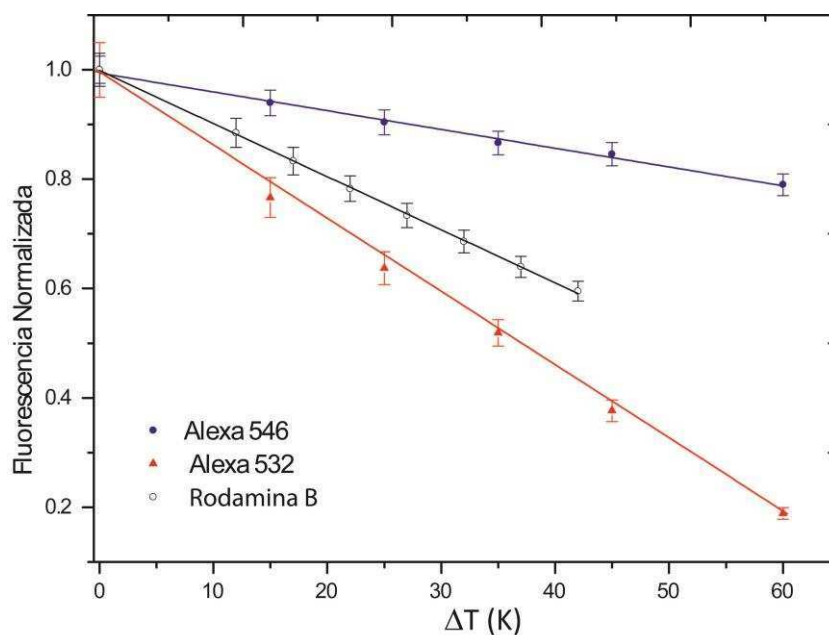


Figura 3.5 Intensidad de fluorescencia en función de la temperatura de AlexaFluor 546 y AlexaFluor 532 en agua, y de RodaminaB en etanol.

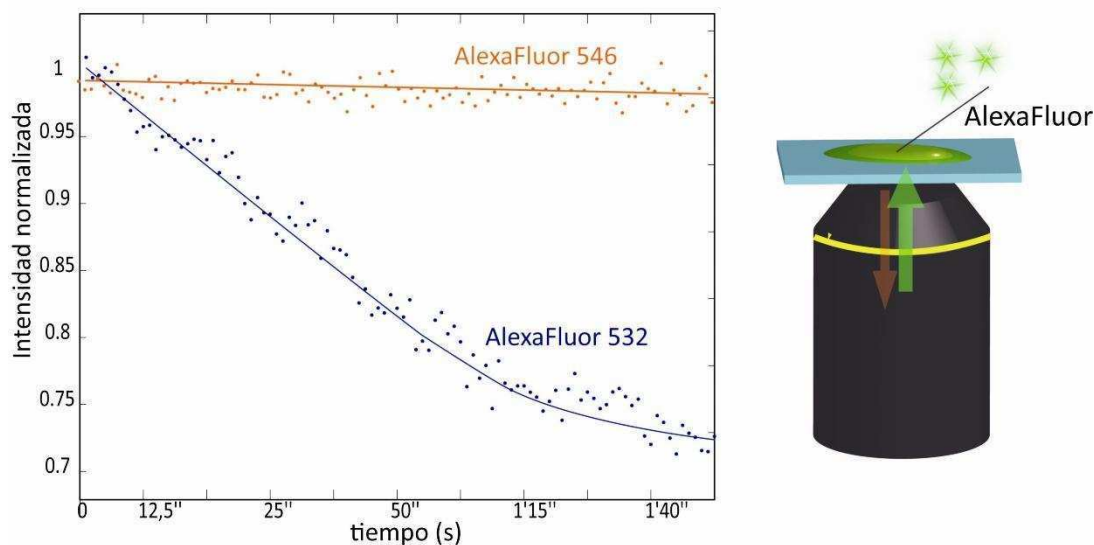


Figura 3.6 Intensidad de fluorescencia en función del tiempo de AlexaFluor 532 y AlexaFluor 546 bajo excitación constante. Las curvas no representan ajustes sino solo guías visuales.

La excitación se realizó con una lámpara de mercurio, cuya intensidad se mantuvo constante a lo largo de los ensayos. Los resultados se muestran en la figura 3.6. Se observa que en el lapso de un minuto la intensidad de fluorescencia de AlexaFluor 532 cae aproximadamente un 25%, mientras que la de AlexaFluor 546 se mantiene prácticamente inalterada, bajo las mismas condiciones de excitación.

Los resultados de esta sección ilustran un comportamiento típico de fluoróforos orgánicos. Las moléculas que muestran una sensibilidad mayor a los cambios de temperatura son también las más lábiles a la fotodegradación. En este proyecto se deberá encontrar un balance aceptable entre estos dos fenómenos, dado que el primero es para los experimentos planteados, favorable mientras que el segundo no.

3.3 Campo de temperatura alrededor de nanopartículas

3.3.1 Cálculos del campo de temperaturas

Las tecnologías que existen actualmente para medir campos de temperatura en la nanoescala, o bien no poseen la resolución necesaria, o son técnicas complejas^{180,181}. Por este motivo es esencial estimar mediante cálculos el campo de temperaturas generado alrededor de las AuNR. Cabe destacar que todos los parámetros involucrados en los cálculos son bien conocidos o pueden determinarse experimentalmente sin dificultad. Es por esto que se espera que los cálculos sean representativos de la situación experimental.

Para abordar el problema estacionario, como se describió en la sección 1.2.8 de la introducción, basta resolver la ecuación de difusión de calor (eq. 1.19), utilizando la

expresión 1.15 para la potencia absorbida por la partícula. La solución para una fuente con simetría esférica queda entonces como en la eq. 1.20:

$$\Delta T(r) = \frac{\sigma_{abs} I}{4\pi r k_{h_2o}} \quad r > R$$

Donde se supuso la fuente inmersa en agua por lo que se reemplazó el coeficiente de conductividad térmica directamente por el coeficiente del agua $k_{h_2o} = (0.58 \text{ W}/(\text{m} \cdot \text{K}))$.

En este caso se conoce la sección eficaz de absorción (dato facilitado por el fabricante y verificado mediante cálculos de FDTD) y la irradiancia I puede calcularse distribuyendo la potencia del láser en el área transversal de la función de dispersión de punto (PSF) del microscopio (ver 3.7.5). Sin embargo, al tratarse de nanocilindros que no poseen simetría esférica, existen dos posibilidades para abordar la solución:

- Resolviendo numéricamente la ecuación de calor para un contorno cilíndrico. Esta solución si bien es más precisa, requiere de un cálculo más complejo y de la aplicación de un método numérico adecuado.
- Calculando un radio equivalente para el AuNR (el radio de la esfera cuyo volumen es igual al del nanocilindro) y utilizando 1.20. Esta solución es relativamente sencilla pero aproximada

A continuación se comparan ambos métodos.

a. Método numérico

Para realizar los cálculos presentados en esta sección, se trabajó en colaboración con el Dr. Ignacio Ojea (departamento de Matemática, FCEyN, UBA), quien resolvió numéricamente la ecuación de calor dependiente del tiempo en tres dimensiones. Se calculó el campo de temperaturas en torno a una nanopartícula de 90x22nm (dimensiones determinadas a partir de las imágenes de SEM y TEM, se aproximaron las NP por cilindros de puntas chatas, sin embargo por simplicidad se las llama de 100x25nm en coherencia con los datos del fabricante) inmersa en agua e irradiada a 785 nm a distintos valores de irradiancia.

En la figura 3.7 a,b) se muestran los mapas de temperatura calculados numéricamente alrededor del AuNR cuando se lo irradia con $600 \text{ kW}/\text{cm}^2$. La temperatura del agua aumenta únicamente en el entorno nanométrico de la AuNR, y se equilibra a la temperatura del medio en unas pocas decenas de nanómetros en todas las direcciones. Este mismo comportamiento se observa para valores de irradiancias entre 300 y 900 kW/cm^2 , como se ve en los cortes transversales y longitudinales del campo de temperaturas presentados en las figuras 3.7 d) y e). A su vez se observa también que en el rango de potencias calculadas la temperatura en un punto dado alrededor de la AuNR aumenta linealmente con la irradiancia (figura 3.7 c).

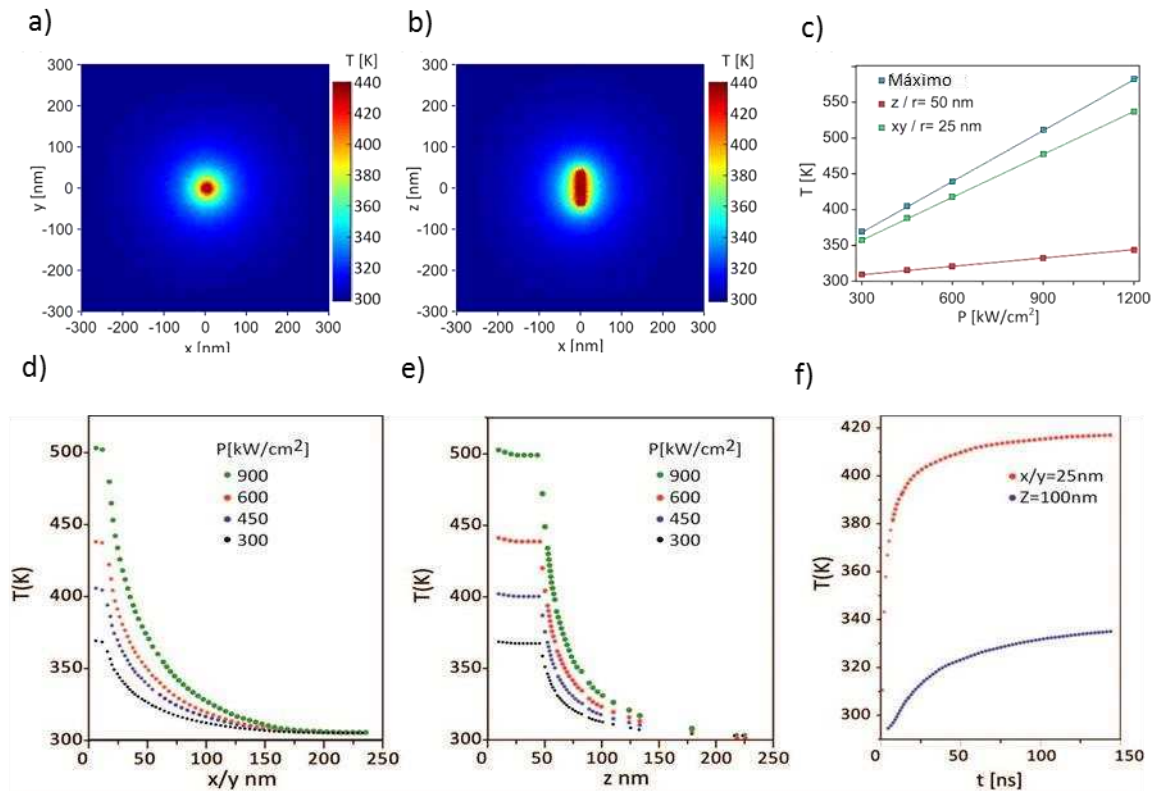


Figura 3.7: Cálculos numéricos resolviendo la ecuación de calor en 3D, del calentamiento plasmónico de una AuNR de 90x22nm irradiada a 785nm. a,b) Campo de temperaturas alrededor de una AuNR irradiada a 600kW/cm². c, d) Perfiles de temperatura a lo largo del eje x o y a), y z para irradiancias de 300, 450, 600 y 900 kW/cm². e) Temperatura en función de la densidad de potencia en distintas posiciones cercanas a la AuNR. f) evolución temporal de la temperatura en dos posiciones cercanas a la AuNR.

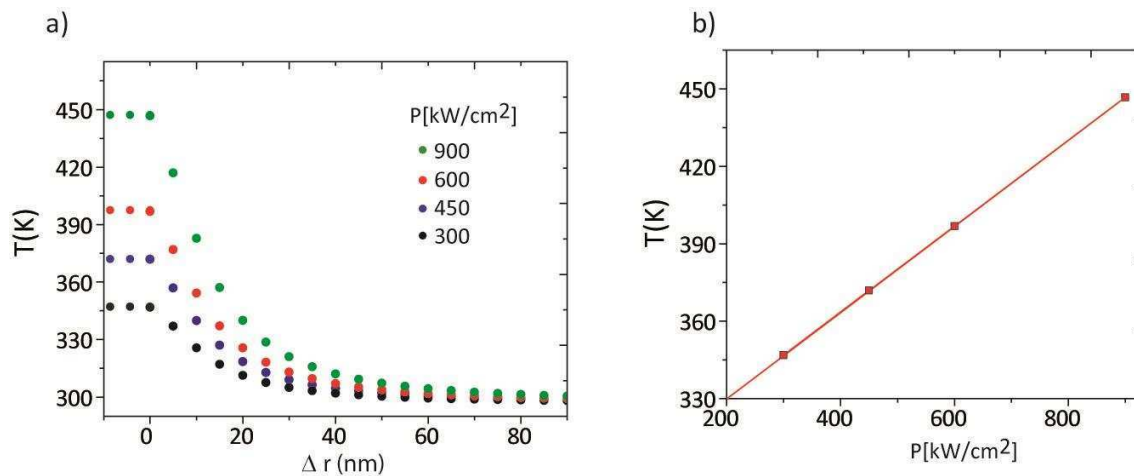
De estos cálculos se obtiene también la evolución temporal del calentamiento, como se muestra en la figura 3.7 f) para el caso de 450kW/cm². Se ve que el sistema requiere poco más de 100 ns para alcanzar el estado estacionario.

b. Solución del estado estacionario

En este caso se estudió la solución analítica estacionaria para partículas esféricas (eq. 1.20), usando un radio equivalente de los AuNR.

El radio equivalente de cada AuNR se determinó, considerándolos de puntas chatas (ver fig. 3.3 c) e igualando el volumen de un cilindro con una esfera: $R_{eq} = \sqrt[3]{\frac{3R^2h}{4}}$, donde R es

el radio del cilindro y h su altura. Para las AUNR de 90x22nm se obtiene un radio equivalente $R_{eq} \approx 20$ nm.



90x22

Figura 3.8 Calentamiento plasmónico resuelto por aproximación estacionaria para una fuente con simetría esférica. a) perfiles obtenidos para distintos valores de irradiancia sobre una AuNR de 90x22nm. b) Dependencia de la temperatura en la superficie de la partícula con la irradiancia.

En la figura 3.8 a) se presenta el perfil del campo de temperaturas para densidades de potencia entre 300 kW/cm^2 y 900 kW/cm^2 . Aquí no tiene sentido hablar corte de transversal o longitudinal, ya que se ha obtenido una solución radial, por lo que en el gráfico se presentan la temperatura con respecto a la distancia a la superficie de la partícula. En la figura 3.8 b) se grafica el máximo de temperatura obtenido para cada potencia. Tanto la forma del perfil como la tendencia con la potencia son similares entre ambos métodos. Para un análisis más concluyente, se comparan ambos resultados en la figura 3.9.

Por último se compararon los perfiles x/y y z del campo obtenido numéricamente, con el perfil aproximado, para dos valores de irradiancias. En la figura 3.9 se puede observar que la respuesta es similar para ambas potencias. La aproximación esférica queda prácticamente contenida entre ambas curvas. La mayor discrepancia se observa en el máximo medido, es decir, en el valor del campo inmediatamente sobre la superficie. Sin embargo si lo que se desea estudiar es el campo que percibirá una molécula adherida a la superficie de una NP, tampoco sería correcto decir que la temperatura a la que ésta se ve sometida, es la inmediatamente contigua a la superficie. En estos ensayos la longitud de separación estará definida por el complejo estreptavidina-biotina que actuará como ligando; la estreptavidina tiene dimensiones de aproximadamente 4 nm. Sumada esta incerteza a la sencillez que presenta la resolución del problema del perfil por el método b. respecto al a., se decidió realizar el resto de los cálculos por medio de la aproximación por fuente puntual y se tomó la temperatura percibida por el fluoróforo como la obtenida a 4 nm de la superficie.

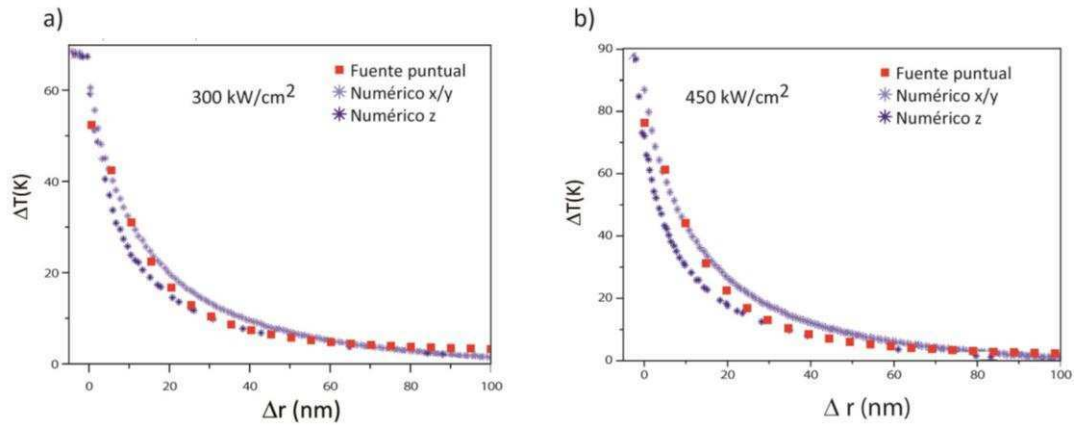


Figura 3.9 Comparación de los perfiles a lo largo del eje x o y obtenidos por resolución numérica de la ecuación de temperatura (línea punteada) y la resolución aproximando por fuente puntual (sólida) para dos densidades de potencia 300 y 450kW/cm².

3.3.2 Efecto sobre la intensidad de fluorescencia

Se calcularon los perfiles de temperaturas para AuNRs de los tamaños nominales usados en los experimentos por medio de la aproximación por fuente puntual. En la figura 3.10 a) se compara la respuesta de un AuNR de 100x25nm (medidas 90x22nm) con respecto a uno de 42x10 nm, ambos irradiados con 400 kW/cm². Para la AuNR más grande ya a 80nm de distancia desde la superficie la diferencia de temperaturas con el seno del medio no supera los 10 grados.

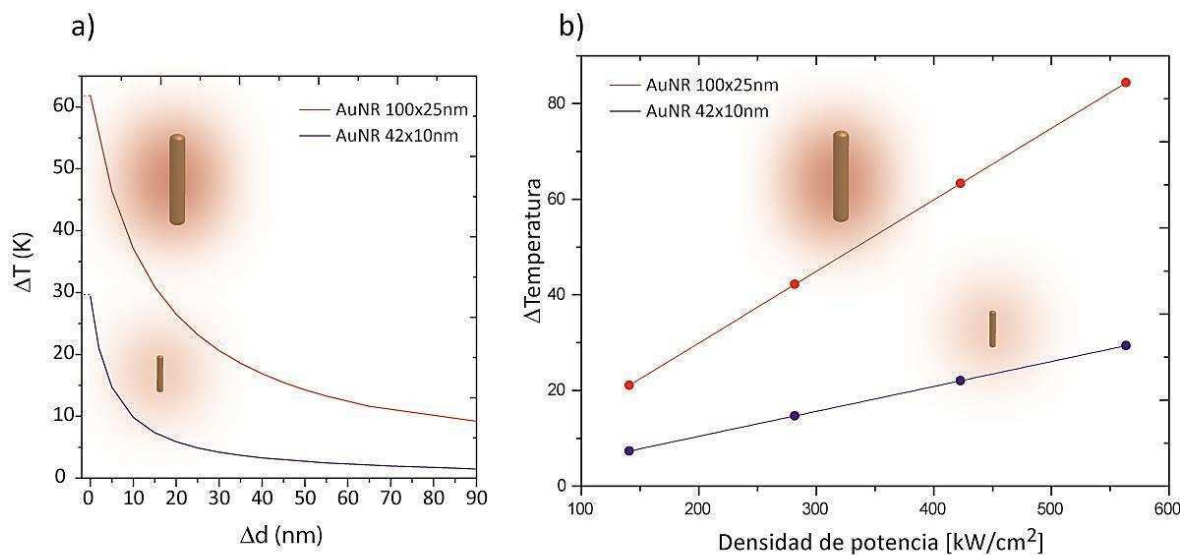


Figura 3.10 a) Simulación de respuesta térmica de una partícula al ser excitada con una densidad de potencia de 400kW/cm². Perfil de aproximación por fuente puntual, en azul NPs de 42X10, tomando como $R_{eq} = 10nm$ y rojo NPs de 100x25, con $R_{eq} = 20nm$. b) Respuesta térmica en la superficie de una partícula al ser excitada con distintas irradiancias, calculado por aproximación por fuente puntual.

En el caso de la AuNRs pequeñas, la misma condición se alcanza a los 20nm. Esto se debe a que a mayor tamaño de NP, mayor sección eficaz de absorción, lo que se traduce en un campo de temperaturas más intenso. Asimismo en la figura 3.10 b) se presenta la temperatura alcanzada en la superficie de cada tamaño de AuNR al aumentar la irradiancia, y se observa un aumento lineal, en coherencia con las simulaciones previas.

Estos datos se cruzaron con la respuesta de la fluorescencia ante cambios de temperatura del medio de las sondas estudiadas. De esta forma se obtuvo la curva de la figura 3.11, donde se puede relacionar la caída de fluorescencia esperada para un fluoróforo en la superficie de la NP en función de la densidad de potencia del haz de calentamiento. Como es de esperar, las caídas de intensidad son mayores para la NP de mayor tamaño.

Con estos resultados se decidió realizar los primeros ensayos con AlexaFluor546, ya que se espera observar una caída como mínimo de un 20% con las NPs grandes, lo que posibilitará no sólo detectar cambios, sino también acomodar las condiciones del ensayo evitando el posible fotoblanqueo que podría presentar AlexaFluor532.

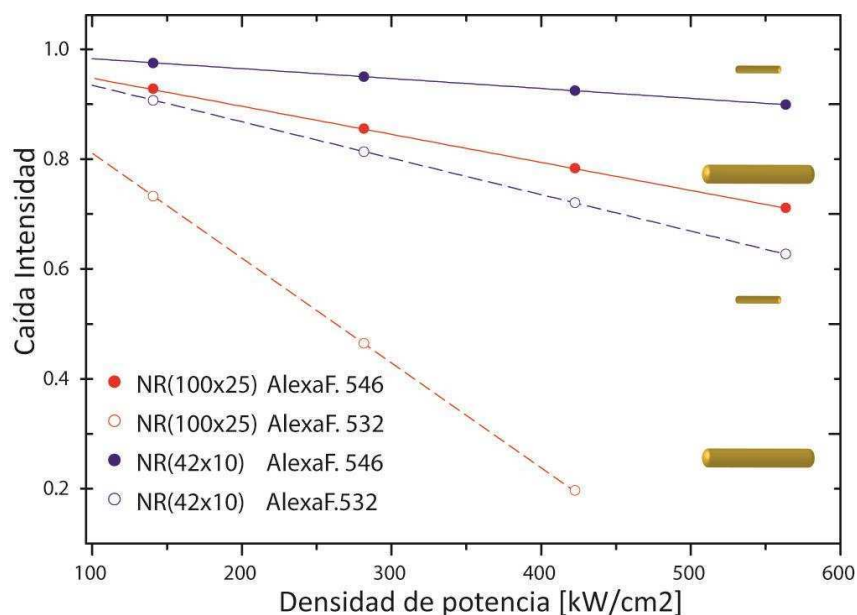


Figura 3.11 Caída de intensidad de un fluoróforo colocado en la superficie de un AuNR irradiado a distintas potencias, cálculos realizados para dos tamaños de partículas., 100x25nm y 40x22nm.

3.4 Modulación fototérmica de fluorescencia por calentamiento plasmónico

Con el objetivo de investigar la hipótesis de modulación fototérmica de fluorescencia por calentamiento plasmónico de AuNRs, se procedió a tomar imágenes de fluorescencia de distintas muestras conteniendo fluoróforos y AuNRs, en función de la irradiancia de un haz de calentamiento. Para esto se modificó un microscopio invertido de fluorescencia como se muestra en la figura 3.12).

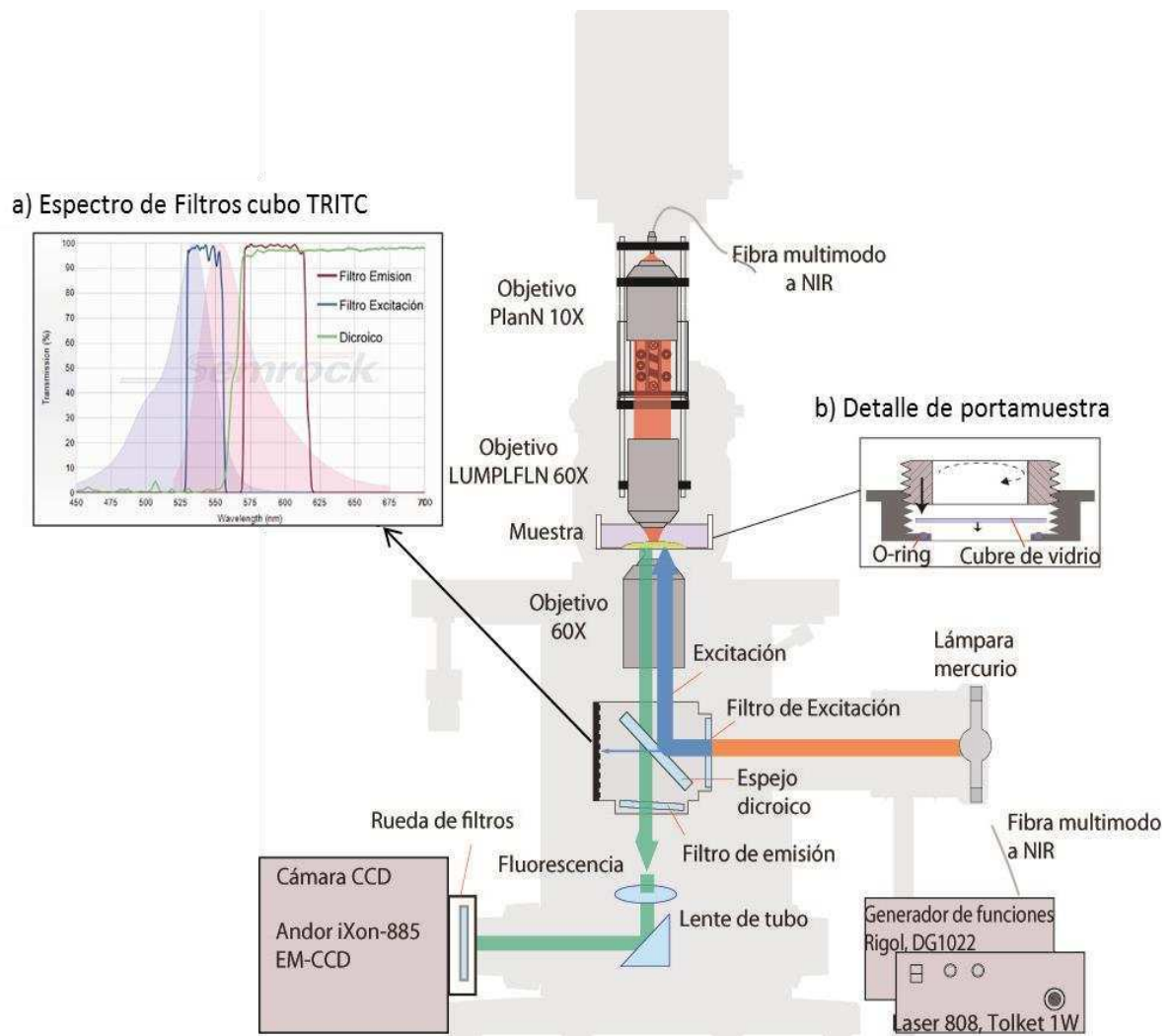


Figura 3.12 Esquema del dispositivo experimental utilizado para realizar las mediciones de Epifluorescencia. Recuadro a) Espectros de transmitancia de los filtros correspondientes al cubo TRITC, b) detalle del portamuestra utilizado para evitar la caída de líquidos sobre el objetivo.

3.4.1 Detalles del arreglo experimental.

Las mediciones se realizaron en un microscopio invertido Olympus IX71 (Olympus, Japan) configurado como se esquematiza en la Figura 3.12. La muestra es excitada con una lámpara de Mercurio de potencia regulable a 3 valores discretos. Los rangos espectrales de excitación y detección están determinados por los filtros utilizados. En este caso, acorde a las características de la muestra, se eligió trabajar con el conjunto de filtros *TRiTC* (cubo Olympus con filtros Chroma), cuyos espectros pueden verse en la figura 3.12 (recuadro).

La fluorescencia fue excitada y colectada en configuración *epi*, con un objetivo Plan Apo (Olympus, Japan) de magnificación 60x y apertura numérica 1.42. La señal de fluorescencia es enfocada sobre una cámara iXon-885 EM-CCD (Andor, Belfast, Reino Unido) con 1004 × 1002 pixeles activos de 8 × 8 μm de tamaño, operada a 20 ms por cuadro. En las condiciones experimentales descritas el tamaño de pixel corresponde a 130 nm sobre la muestra.

Para incorporar la luz necesaria para el calentamiento plasmónico de las AuNRs, se acopló al microscopio un diodo láser multimodo NIR acoplado a fibra desde la parte superior ($\lambda=808\text{nm}$, Potencia máxima 1W multimodo, TolKet, Argentina). Con este fin se reemplazó el condensador superior del microscopio por una estructura que sostiene un extremo de la fibra óptica multimodo por donde llega la luz NIR, un objetivo PlanN 10x (Olympus) para colimar el haz y un último objetivo LUMPLFLN 60x de agua (Olympus) para enfocar nuevamente el haz sobre la muestra. De esta forma se pudo hacer uso del soporte del microscopio que posee tornillos calibrados a fin de ajustar la posición x, y, z del condensador, y controlar la región iluminada con 808 nm sobre la muestra. Una vez fijada, la posición del haz de calentamiento se proyecta siempre sobre la misma región del sistema óptico y del sensor de la cámara CCD. Para iluminar con el láser NIR distintas regiones de la muestra, ésta se mueve con una platina motorizada (Prior ProScan II).

La intensidad del diodo láser NIR puede modularse mediante una señal externa que se suministró con un generador de funciones (RIGOL, DG1022). Para el montado de la muestra se utilizaron porta muestras con traba a rosca y con un anillo de goma (o-ring) para sellarlo hidráulicamente.

La potencia del haz de calentamiento sobre la muestra se determinó midiendo la potencia a la salida de la fibra y las pérdidas de cada elemento óptico. Para evitar que la luz NIR llegue a la cámara CCD se ubicó un filtro de corte (808 nm StopLinesingle-notch filter, Semrock) en una rueda de filtros anterior a la cámara. A fin de obtener la densidad de potencia sobre la muestra se dejó pasar el láser NIR con la potencia mínima para evitar dañar la cámara, pero logrando obtener una imagen del perfil del haz. Un ajuste gaussiano arroja un ancho a mitad de altura de 13μm (ver materiales y métodos 3.6.3).

3.4.2 Mediciones sobre aglomerados de AuNRs

Como primera prueba para corroborar si es posible modular la emisión de una sonda fluorescente por calentamiento plasmónico, se utilizó como sistema modelo los AuNRs derivatizados con biotina, y marcados con AlexaFluor-estreptavidina. Los fluoróforos quedan adheridos a la superficie de la NP por medio de la unión biotina-estreptavidina, y por lo tanto a una distancia aproximada de 5-10nm.

Se colocó una gota de la solución pre-incubada de AuNR-biotina + AlexaFluor-estreptavidina sobre un cubre previamente lavado (ver materiales y métodos, preparación de muestras control). Esto genera sobre la superficie la formación de diversos aglomerados de AuNRs marcados fluorescentemente (Figura 3.13).

Sobre el borde de una gota de solución de AuNR de 42x10nm (figura 3.14) se estudió el perfil de intensidades con el NIR apagado y encendido a una potencia aproximada de 400kW/cm². Se observa que en el área donde se encuentra incidiendo el láser de calentamiento, la intensidad de fluorescencia decae.

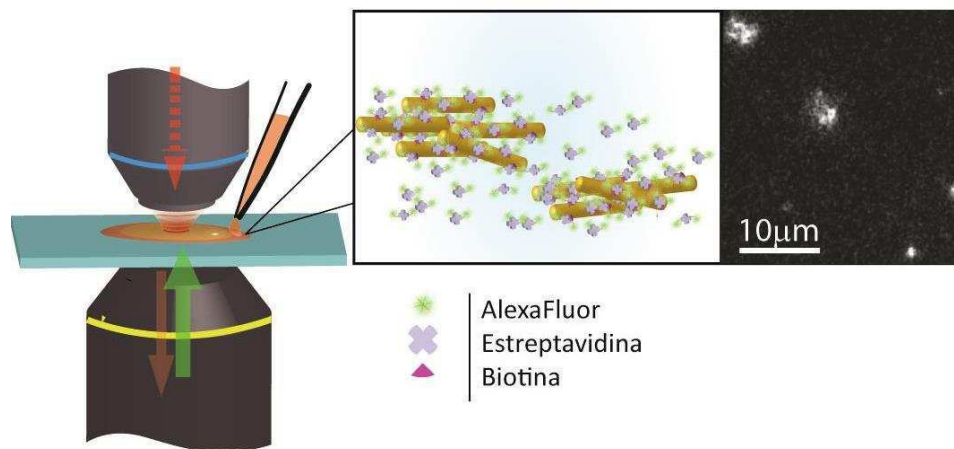


Figura 3.13 Representación esquemática del experimento realizado en gota. Una gota de NP marcadas con AlexaFluor se coloca sobre un cubreobjetos y se deja secar, formándose aglomerados de nanopartículas y fluoróforos. A la izquierda se muestra una imagen tomada con el microscopio de epifluorescencia.

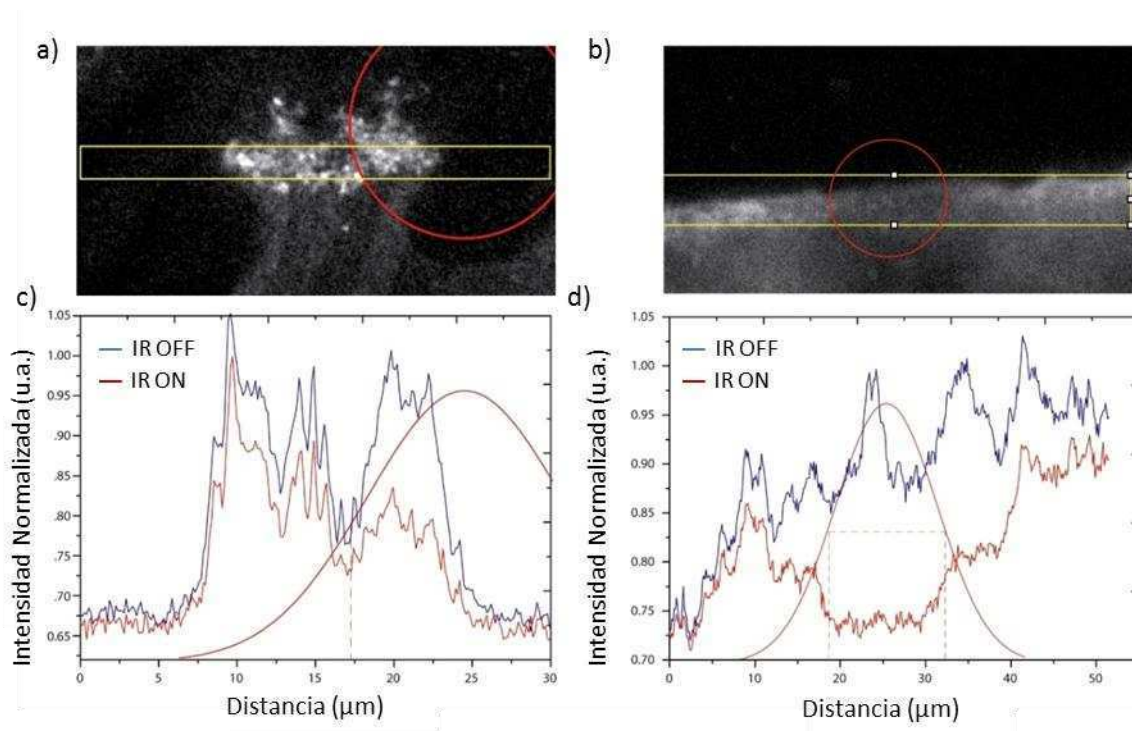


Figura 3.14: Análisis del efecto del NIR sobre una gota de AuNR de 42x10nm a) y b) imágenes de epifluorescencia. En rojo se marca aproximadamente el área iluminada por el haz de calentamiento y en amarillo la zona cuyo perfil de intensidad se grafica en d) y e). Se compara la intensidad de fluorescencia adquirida con el NIR encendido y apagado. La señal de intensidad se ve afectada únicamente en la zona del haz.

Un estudio similar se llevó a cabo para controlar qué efecto produce el haz de calentamiento sobre los fluoróforos, en ausencia de AuNRs. Se preparó una muestra con AuNR 100x25nm marcados y además fluoróforos libres. Se investigó la influencia del haz de calentamiento en un sector donde hay AuNRs marcados y sobre otro donde solo hay fluoróforo (figura 3.15). Únicamente sobre la zona con AuNRs el haz de calentamiento reduce la fluorescencia y se detecta una señal modulada. Esto demuestra que el fluoróforo solo no se ve influenciado por el láser de calentamiento. Se realizaron varios ciclos de encendido apagado a una potencia aproximada de $400\text{W}/\text{cm}^2$ sin observarse degradación de la muestra, ya que al apagarse la iluminación NIR la señal de fluorescencia recupera su intensidad original.

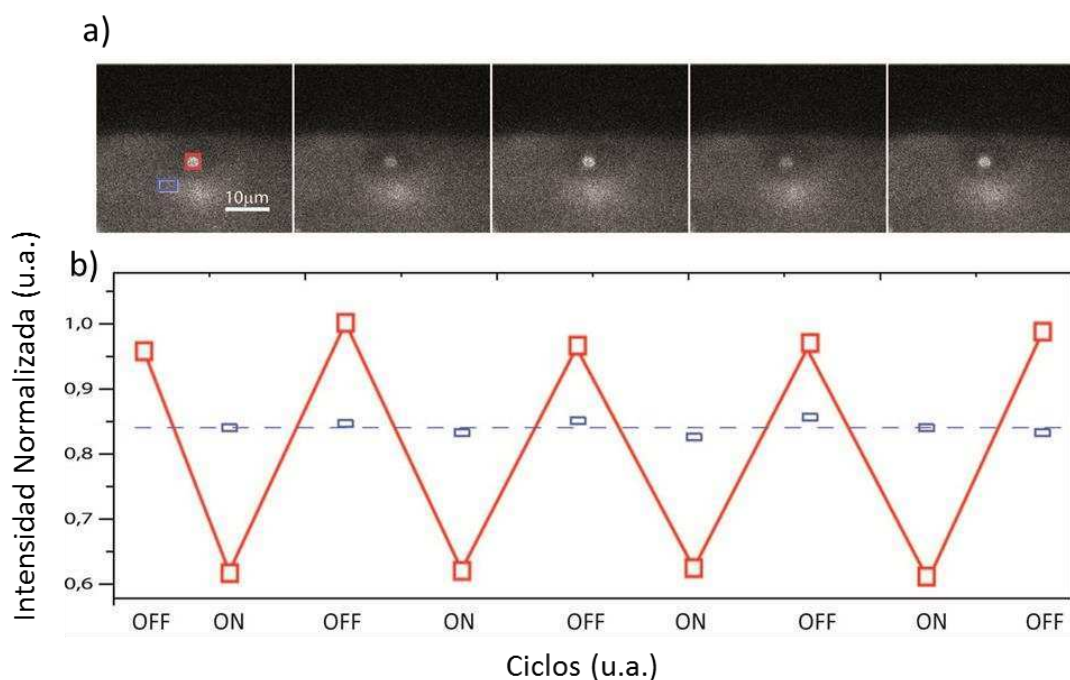


Figura 3.15: Análisis del efecto del NIR sobre una gota de AuNR de 100x25nm. a) imágenes de epi fluorescencia con el encendido y apagado del haz de calentamiento. En rojo se marca la zona donde hay presencia de AuNRs mientras que en azul la zona donde únicamente hay fluoróforos. a) Se presentan las 5 primeras imágenes del ciclado a modo de ejemplo b) intensidad normalizada en función del tiempo para las zonas marcadas en a).

Luego, se estudió el efecto de la intensidad del haz de calentamiento. La figura 3.16 muestra la intensidad de fluorescencia de un punto de una muestra con AuNR 100x25nm con AlexaFluor546, al incidir con el haz de calentamiento modulado a distintas potencias. La señal de calentamiento se muestra junto con las señales de fluorescencia. La modulación de ambas se encuentra desfasada en medio ciclo; cuando el láser NIR tiene un máximo, la fluorescencia es mínima. Es importante notar que si el haz de calentamiento no estuviese perfectamente bloqueado ante la cámara, cualquier filtración contribuirá con una señal en fase con el láser, es decir inversa a lo observado.

De estos resultados se puede concluir que el efecto es reversible, local y específico. Reversible dado que es posible realizar repetidos ciclos de calentamiento de forma reproducible. Local, puesto que el efecto se observa únicamente en el área alcanzada por el haz (figura 3.14 a) y no más allá de él. Y específico, ya que sólo se observa una modulación de la fluorescencia en presencia de AuNR mientras que la sonda libre se ve inalterada al incidirle con la luz de calentamiento (figura 3.15).

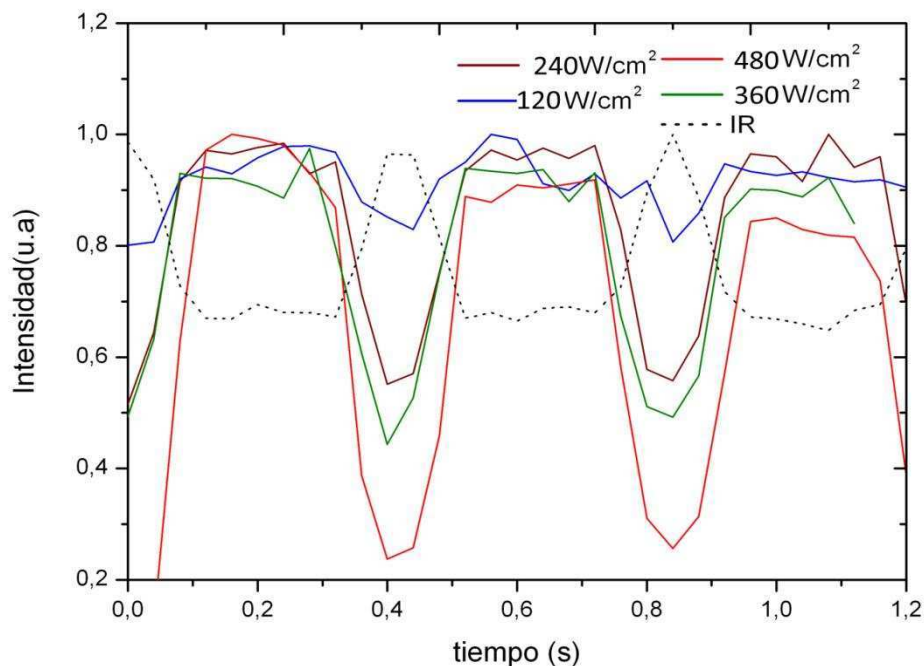


Figura 3.16 Modulación de fluorescencia a distintas potencias de calentamiento sobre una gota de AuNR de 100x25nm marcados con AlexaFluor546.

En estas mediciones la caída de fluorescencia experimental es mayor que las esperadas a partir de los cálculos de la sección 3.3 con los mismos valores de irradiancia. Sin embargo, hay que tener en cuenta que los cálculos fueron realizados para fuentes puntuales de calor, mientras que en estos experimentos se investigaron aglomerados de AuNRs. Evidentemente, la acumulación de calor entre NPs vecinas es significativa y produce un incremento mayor de temperatura, con una consecuente reducción mayor de fluorescencia (ver efectos colectivos, introducción). Por otro lado, se observa que de una muestra a otra la caída de señal, aún para potencias de excitación similares, no es reproducible. Esto da cuenta de la falta de control sobre el preparado de muestras, ya que al dejar secar una gota, habrá zonas de menor densidad en el centro y zonas de grandes aglomerados en los bordes, aumentando los efectos colectivos de calentamiento.

3.4.3 Mediciones en AuNRs Individuales

La comparación más fiel a los cálculos puede obtenerse con mediciones sobre AuNRs individuales. Para estas mediciones es necesario preparar muestras diluidas, con una distribución homogénea de AuNRs bien separados. Se prepararon vidrios (cubreobjetos) modificados superficialmente con una multicapa generada mediante autoensamblado molecular (detalles del protocolo en sección 3.6.1.2). En primer lugar se funcionalizaron los substratos con una mezcla de BSA+BSA-biotina. Luego se acopló una capa de estreptavidina que proveyó los sitios de anclaje para AuNRs funcionalizados con biotina.

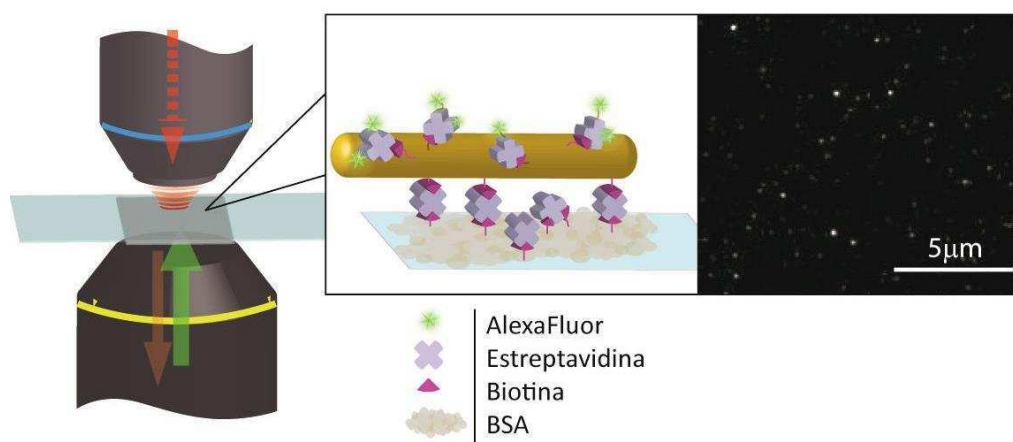


Figura 3.17 Representación esquemática del experimento realizado en AuNRs aislados. Una gota de NP marcadas con AlexaFluor se coloca sobre un cubreobjetos y se deja secar, formándose aglomerados de nanopartículas y fluoróforos. A la izquierda se muestra una imagen tomada con el microscopio de epifluorescencia.

Finalmente se hizo reaccionar a los AuNRs inmovilizados con el fluoróforo-estreptavidina y se enjuaga el exceso. Ajustando la relación BSA:BSA-biotina y la concentración de AuNRs se obtiene una muestra con AuNRs individuales suficientemente separados unos de otros para permitir su estudio de a uno a la vez en el microscopio óptico. Un ejemplo se muestra en la figura 3.17, junto con una imagen adquirida con el microscopio de Epifluorescencia.

En primer lugar se estudió la respuesta de AuNRs de 100x25 nm marcadas con AlexaFluor532, ante el efecto de iluminación de calentamiento modulada a 1 Hz y a una irradiancia de 400 kW/cm^2 , mientras su fluorescencia era constantemente interrogada a 532 nm. Bajo estas condiciones se observó una modulación de fluorescencia junto a una rápida fotodegradación. En la figura 3.18 a) se muestra a modo de ejemplo una muestra a tiempo cero y tras 5 ciclos de encendido apagado del haz de calentamiento. En la figura 3.18 b) se presentan cuatro ejemplos de trazas temporales de fluorescencia de AuNRs marcados. Se analizaron trazas de 20 AuNRs individuales. Más del 62% de los AuNRs irradiados pierden su fluorescencia luego de tan sólo 3 ciclos de iluminación con la luz NIR (figura 3.18 c). Bajo estas condiciones la señal normalizada (normalizada por la intensidad medida con el NIR apagado) cae en promedio a 0.45 al encender el NIR.

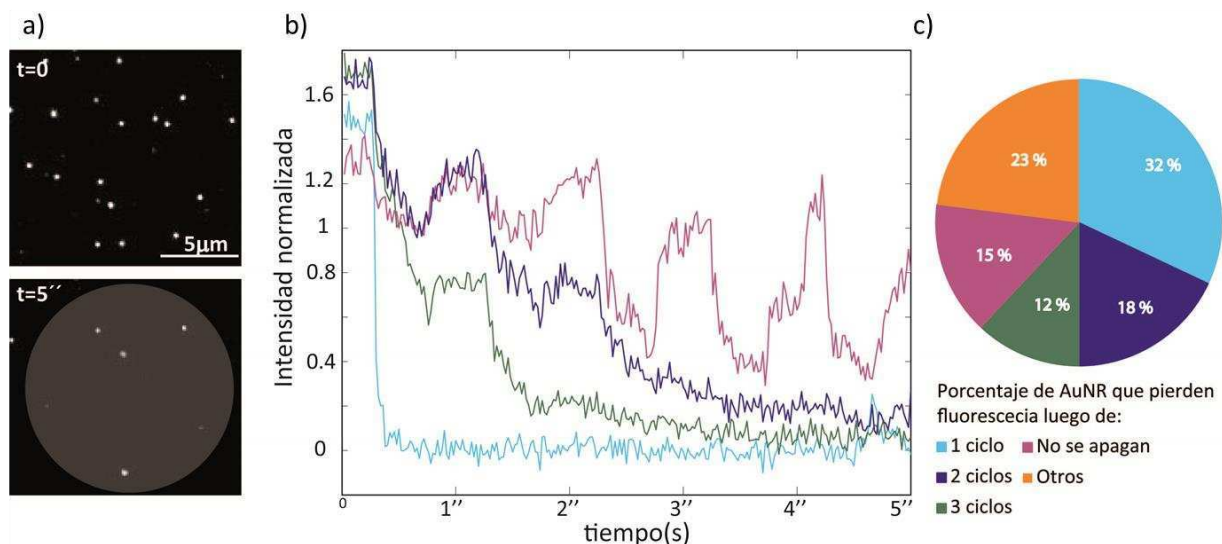


Figura 3.18 AuNRs con AlexaFluor532 bajo iluminación de calentamiento modulada con una señal cuadrada de frecuencia 1Hz). Se muestra la imagen de epi fluorescencia inicial y luego de 5 ciclos de calentamiento. En la figura final se representa con un círculo gris la zona iluminada con luz de calentamiento. b) Trazas representativas de la respuesta de AlexaFluor 532 adherida a AuNR al ser irradiada con NIR. c) Representación de porcentajes de sondas que se fotodegradan tras cada ciclo de modulación.

Esta baja reproducibilidad a lo largo de los ciclos, hace de ésta una sonda modulable pobre, ya que podría dificultar su utilización para ser aplicado luego un filtro de frecuencias para limpiar la imagen, como se propuso inicialmente. En este sentido sería de interés explorar si a densidades de potencias menores el fotoblanqueo resulta más gradual.

Siguiendo el mismo protocolo se prepararon muestras de AuNRs de $100 \times 25 \text{ nm}$ y de $42 \times 10 \text{ nm}$, pero esta vez recubiertas con AlexaFluor 546. La modulación de fluorescencia se estudió bajo las mismas condiciones: láser NIR modulado con una señal cuadrada de 1 Hz y a una irradiancia de 400 kW/cm^2 . En este caso fue posible realizar más de 10 ciclos sin observar una fotodegradación mayor al 5%. En la figura 3.19 a) se presentan a modo de ejemplo un traza temporal de fluorescencia modulada de cada tipo de AuNR. En la figura 3.19 b) se muestra el comportamiento promedio de 10 AuNRs de cada tipo. Las oscilaciones son reproducibles y similares entre distintos puntos de la misma muestra, como se evidencia en la varianza menor al 5%.

La amplitud de modulación de fluorescencia alcanza un valor promedio de 15% para las AuNRs grandes y de 4% para las pequeñas. Esto se debe a sus distintos coeficientes de absorción y tamaños ($\sigma_{42 \times 10 \text{ nm}} = 3,8 \cdot 10^{-4} \mu\text{m}^2$, $\sigma_{100 \times 25 \text{ nm}} = 2,4 \cdot 10^{-3} \mu\text{m}^2$).

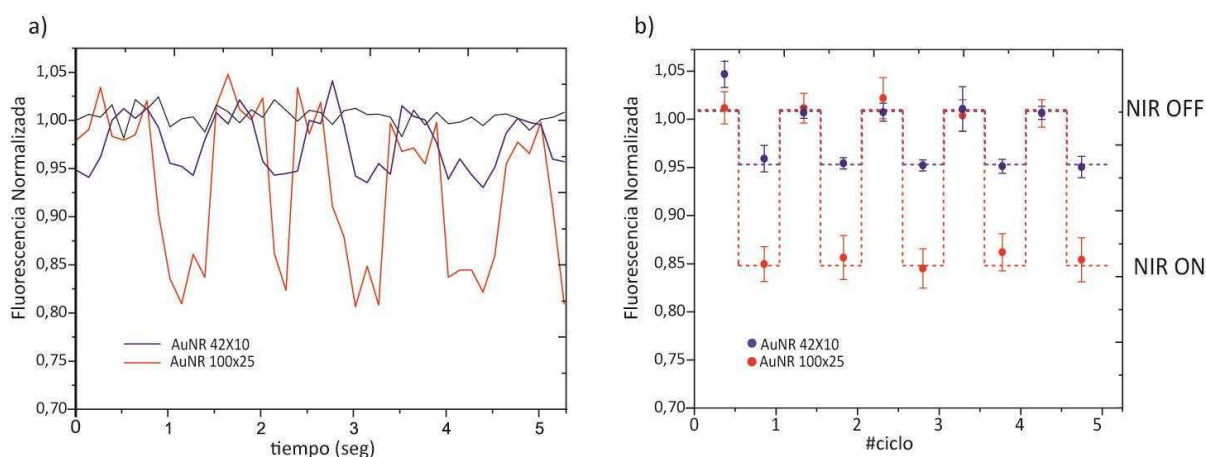


Figura 3.19 Variaciones de intensidad de fluorescencia al incidir con NIR modulado, medida sobre una muestra de NP dispersas marcadas con AlexaFluor 546. a) a modo de ejemplo se presentan en rojo una traza adquirida sobre una muestra de AuNR de 100x25nm y en azul una traza típica de una muestra de AuNR de 42x10nm, ambas muestras irradiadas con NIR a potencias similares (ca. 400kW/cm²). En negro se presenta el fondo que no responde al efecto de NIR. b) Se compraran promedio de 10 AuNR tomados al azar y analizados de cada tamaño, en azul de NP de 42x10nm y en rojo de NP de 100x25nm.

Aplicando la ecuación 1.20 con cada AuNR es posible establecer la relación entre caída de temperaturas que debe ser proporcional a la caída en la intensidad medida:

$$\frac{\Delta T_G}{\Delta T_C} = \frac{\sigma_G}{\sigma_C} \cdot \frac{R_{eqC}}{R_{eqG}} = \frac{2400nm^2}{380nm^2} \cdot \frac{10nm}{20nm} \approx 3,1 \propto \frac{15\%}{4\%} = 3,7$$

Donde se asignó el subíndice G para hacer referencia a los AuNR de 100x25 y C para los de 42x10nm. Si bien los valores difieren en un 20% el orden de magnitud se ajusta a la teoría, evidenciando una modulación en la intensidad debida al calentamiento plasmónico.

Finalmente, se comparó la amplitud de modulación observada en los distintos AuNRs con la esperada a partir de los cálculos de temperatura y la dependencia de cada fluoróforo con la temperatura medida en solución. En la figura 3.20 se comparan los valores predichos contra un promedio de mediciones de cada tipo de AuNR. El acuerdo entre los experimentos y los cálculos es muy aceptable. En el caso del valor obtenido para las AuNR con AlexaFluor 532 se tiene una menor estadística de puntos debido al fuerte fotoblanqueo.

Se observa entonces que el efecto puede ser medido y predicho mediante cálculos sencillos. Las variaciones con las NPs de menor sección eficaz y con el fluoróforo menos sensible a la temperatura puede ser discriminada del fondo. Sin embargo trabajar con un fluoróforo de mayor respuesta a la temperatura pero de rápido fotoblanqueo da por resultado mayores errores y dificultades para la medición. Esto debe ser tenido en cuenta a la hora de seleccionar un fluoróforo.

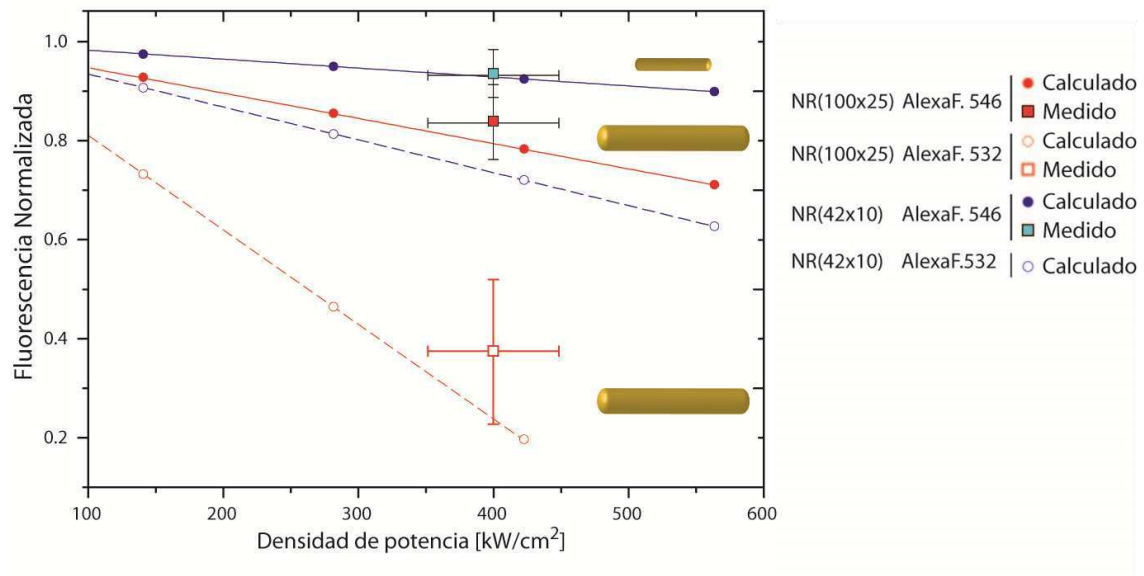


Figura 3.20 Se compara la caída de intensidad medida (puntos) contra la caída de intensidad simulada a partir de cálculos (resolviendo ecuación de calor para una fuente puntual) y la respuesta medida en bulk del fluoróforo ante cambios de temperatura.

3.5 Aumento de contraste por modulación de fluorescencia

A partir de los resultados obtenidos del análisis con partículas únicas, se estudió la viabilidad de utilizar este efecto para aumentar el contraste de señales en microscopía de fluorescencia. En muestras biológicas complejas donde la autofluorescencia dificulta la definición de regiones de interés, metodologías de este tipo pueden encontrar gran utilidad.

Los estudios se realizaron, en primer lugar sobre imágenes simuladas, y luego aumentando artificialmente la señal de fondo en imágenes adquiridas con AuNRs fluorescentes modulados y sin modular. Lo que se busca entonces es filtrar las imágenes de manera de poder distinguir más eficientemente aquellos pixeles que estén modulados. Para esto se probaron 2 métodos de correlación.

En un primer algoritmo se analizó la correlación de cada pixel en el tiempo, con una señal cuadrada de referencia de igual frecuencia que la usada para el calentamiento plasmónico, es decir se estudia la correlación cruzada del experimento con la función periódica de referencia (correlación cruzada). El segundo método consistió simplemente en analizar la autocorrelación temporal de cada pixel.

El coeficiente de correlación para cada pixel (x,y) se define como:

$$\rho(x, y) = \sum_t \frac{\{I(x,y,t) - \mu_I\} \{R - \mu_R\}}{\sigma_I \sigma_R} \quad (3.1)$$

Donde I es la intensidad de fluorescencia de un pixel en la posición (x,y) a un tiempo t y R representa la función de referencia para el caso de correlación cruzada, mientras que para autocorrelación corresponde a la misma señal de fluorescencia I pero un tiempo t posterior; μ es el promedio de la señal I y R respectivamente, mientras que σ es el desvío estándar de cada señal.

El coeficiente de correlación tiene un valor absoluto que varía entre cero y uno, de manera que aquellos pixeles que pertenezcan al fondo, presentarán un valor de correlación cruzada cercana a cero, mientras que los que correlacionan estarán cercanos al uno. Cuanta más diferencia exista entre ambos grupos de pixeles, mayor será el contraste en la imagen de correlación.

3.5.1 Prueba de los algoritmos en imágenes simuladas

En primer lugar, para estudiar la ganancia que se obtendría al modular una sonda con respecto a adquirir la señal durante el mismo tiempo sin ser modulada, se realizaron una serie de simulaciones donde se propone comparar una imagen de correlación con la imagen promedio de los datos adquiridos en el tiempo, modulados y sin modular, respectivamente.

Para ello se simularon tres series de imágenes de 20x20 pixeles, cada una, con un objeto en el centro conformado por 5 pixeles de mayor intensidad. En un caso la señal correspondiente al objeto se moduló por un coseno. Se simularon 5 ciclos con un muestreo por ciclo similar a los datos adquiridos (ca.40 puntos/ciclo).

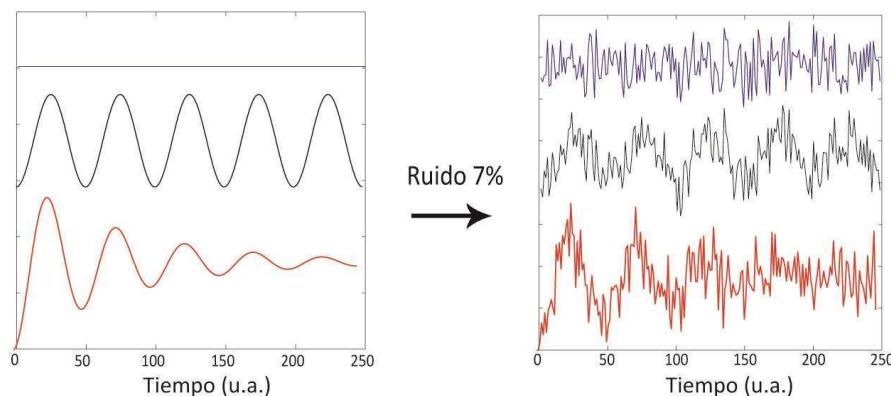


Figura 3.21 Formas de señales utilizadas, una señal continua (azul), una señal modulada en el tiempo por un coseno (rojo), una señal modulada por un coseno y decayendo en amplitud exponencialmente. A la derecha se presentan las mismas señales con el agregado de un 7% de ruido medido respecto al valor de fondo.

Este análisis se realizó para una señal de intensidad media constante, y para otra de intensidad decreciente, simulando una señal que sufre fotoblanqueo. La otra serie de imágenes se mantuvo constante toda la señal a lo largo de la misma cantidad de puntos. En todos los casos, a los datos se les asignó un ruido de un 7% con respecto a la señal, coherente con las imágenes anteriormente estudiadas en el microscopio de epifluorescencia (figura 3.21).

En el caso de las imágenes moduladas, estudiaron distintos casos de amplitud de modulación, definida como:

$$\%Caída = \frac{2 \cdot M_o}{I_f} \cdot 100,$$

Donde M es la amplitud de modulación sobre el objeto e I_o es la intensidad de fluorescencia del fondo. Luego para cada %Caída se estudió el coeficiente de correlación ganado del segundo máximo $\Delta\rho$ (de manera de evitar el valor correlación 1), definido como:

$$\Delta\rho = \rho_o - \rho_f ,$$

Donde ρ_o y ρ_f corresponden al coeficiente de correlación del objeto y el fondo respectivamente. En la figura 3.22 se presenta a modo de ejemplo una curva de autocorrelación para un pixel correspondiente al fondo y otro al objeto.

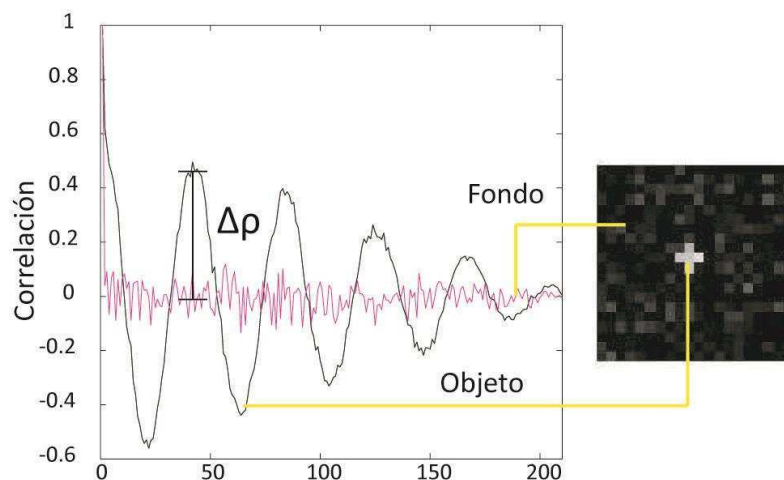


Figura 3.22 Curva de autocorrelación obtenida sobre una simulación de una imagen con una amplitud de modulación tal que el %Caída=27%. En negro se presenta la correlación obtenida para un pixel correspondiente al objeto y en violeta un pixel del fondo. A la derecha se presenta la imagen de correlación obtenida.

En el caso donde la señal no se modula, el análisis consistió en calcular una imagen promedio en el tiempo (como resultado de promediar el valor de cada pixel a lo largo de las imágenes), para distintos casos de porcentaje de señal respecto al fondo, donde se definió

$$\%Señal = \frac{I_o}{I_f} \cdot 100,$$

Donde I_o e I_f son la intensidad de fluorescencia del objeto y el fondo respectivamente. Los valores de intensidad corresponden al valor asignado sin considerar el ruido agregado. Para cada valor se analizó el coeficiente C como una medida del contraste, definido como la relación entre las señales promedio:

$$C = \frac{\langle I_{o,f} \rangle - \langle I_f \rangle}{\langle I_f \rangle},$$

donde $\langle I_{o,f} \rangle$ es el promedio de la intensidad del objeto más el fondo.

En la figura 3.23 se presentan los resultados obtenidos para cada uno de los casos estudiados. En la figura a) se presentan los resultados obtenidos tras aplicar correlación a las series de imágenes moduladas a distintas amplitudes, y en b) el resultado de promediar imágenes, para distintos % de señal.

A modo de ejemplo se analiza una imagen cuya Intensidad del objeto es un 20% del fondo (figura 3.23 b) recuadro punteado). En ese caso, sería necesario modular con un %caída como mínimo del 20% para obtener un mayor contraste en la imagen de correlación que en la obtenida promediando en el tiempo. Sin embargo, en este caso sería necesario aplicar una modulación del doble de amplitud, si se tuviera un fluoróforo fotoblanqueándose en el tiempo (figura 3.23, círculos rojos).

La diferencia entre el caso con fotoblanqueo y el caso sin fotoblanqueo, esencialmente radica en la cantidad de ciclos a partir de los cuales es posible establecer la correlación de señales. Si fuera posible aumentar la cantidad de ciclos sería posible mejorar la correlación. Esta dependencia se presenta en la figura 3.24 donde se estudió la correlación obtenida al modular la señal con un coseno cuya amplitud decae en el tiempo como $\exp(-0.1 \cdot t)$.

En líneas generales, este método ofrece una mejora en la imagen radical, si se cuenta con un objeto cuya señal no supera en más de un 20% el fondo y es posible apagarla como mínimo un 40% en cada ciclo de modulación.

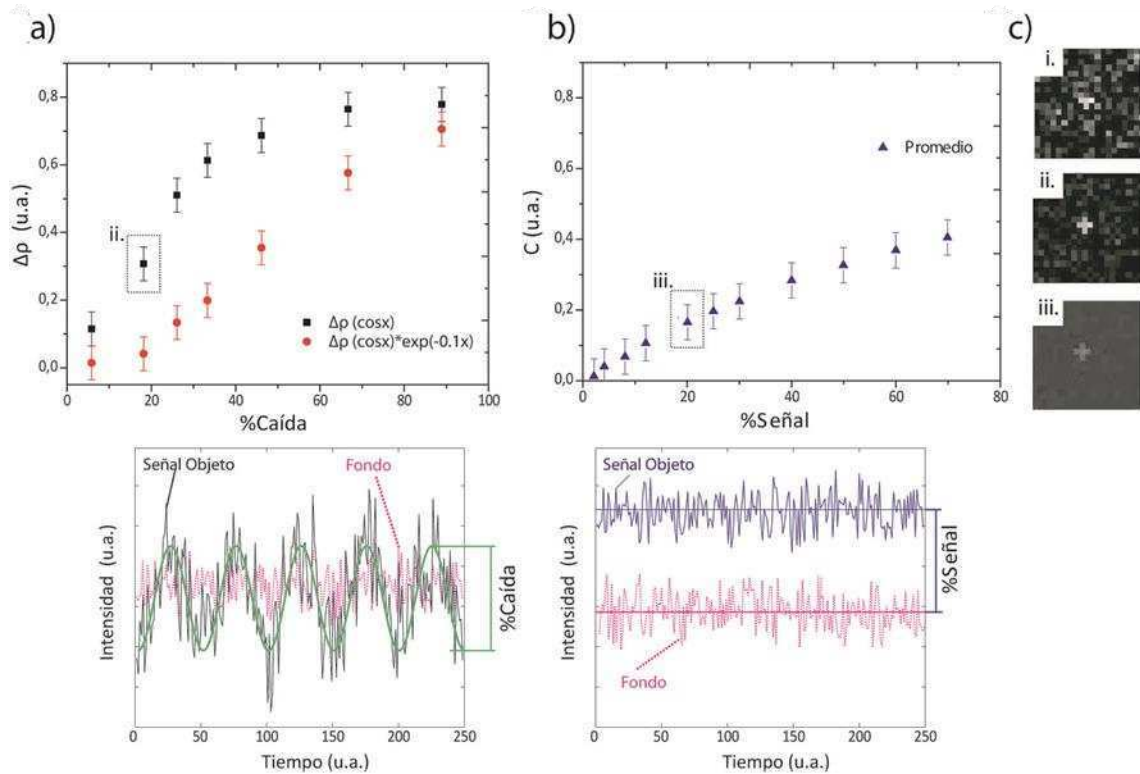


Figura 3.23 Coeficientes de Correlación y promedios obtenidos a partir de una imagen con ruido del 7% simulada. a) En negro se presentan los coeficientes de correlación obtenidos para distintas amplitudes de modulación de la intensidad del objeto. En rojo se presenta el mismo análisis pero para un coseno cuya amplitud decae en el tiempo como una exponencial. b) En azul se presenta el resultado de promediar cada pixel consigo mismo en el tiempo c). imágenes correspondientes a los puntos recuadrados i. original, como resultado de: ii. Correlación, iii. Promedio. **Paneles inferiores.** a) En negro, la señal modulada correspondiente a un pixel del objeto donde se marca el %caída. b) Señal sin modulación del objeto (con mayor intensidad-azul) y fondo en violeta.

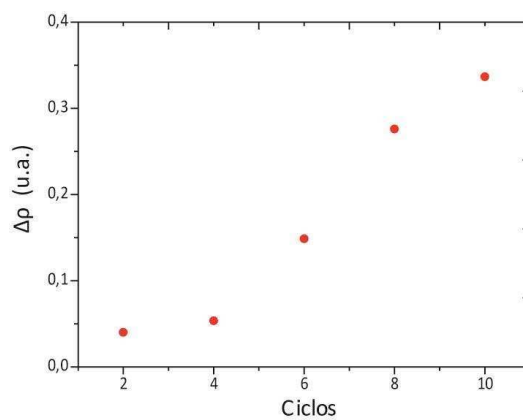


Figura 3.24 Número de ciclos analizados con respecto al coeficiente de correlación obtenido al estudiar una señal modulada por un coseno y cuya amplitud decae en el tiempo como $\exp(-0.1 \cdot t)$.

3.5.2 Prueba de algoritmos sobre imágenes adquiridas

Las imágenes analizadas corresponden a muestras de AuNRs individuales de 100x25nm marcados con AlexaFluor546. El calentamiento plasmónico se realizó con una densidad de potencia de ca. 400kW/cm² modulado a 1Hz con una señal cuadrada. Se tomaron 10 ciclos para el análisis.

La imagen original utilizada poseía una relación %señal de 200% (1200u.a intensidad en el punto. vs 400u.a. aprox. de fondo). Para probar el algoritmo con una imagen cuya contribución de fondo fuera mayor, a estos datos se le sumó un fondo simulando una señal externa. De esta forma se obtuvo una imagen cuyo %Señal es 17%, donde difícilmente se distingue el borde de la NP en cada imagen.

Se aplicaron los tres métodos de análisis: autocorrelación, correlación cruzada con la señal de modulación, y el promedio en el tiempo pixel a pixel. En las imágenes finales puede notarse, en todos los casos, una diferencia entre los píxeles centrales, donde se encuentra la partícula, y el resto, lo que prácticamente es imposible en cada imagen individual. Para una comparación más cuantitativa es necesario estudiar un perfil de señales. En la figura 3.25 se muestra un perfil de las señales obtenidas en un corte de la muestra donde se encuentra el punto marcado. En gris se presenta la traza de intensidades original, mientras que en rojo y verde se presentan los coeficientes de correlación obtenidos por cada método, según se definió anteriormente. En azul se grafica el coeficiente C obtenido de los promedios.

No se observan diferencias apreciables entre realizar la autocorrelación y la correlación cruzada. Al no reflejar una diferencia apreciable un método de otro, podría elegirse la autocorrelación, ya que no requiere conocimiento previo de la función con la que se moduló la señal.

En consistencia con las simulaciones previas, para este %Señal, la correlación devuelve un mayor contraste que los promedios ($\Delta\rho = 0.65$ vs. $C = 0.18$), sin embargo, el promedio suaviza el ruido, permitiendo distinguir el perfil del punto marcado, aunque no aumente el coeficiente C respecto a la imagen original.

Como control se aplicó el mismo algoritmo sobre un conjunto de imágenes en presencia de NP pero sin modulación (figura 3.26 DyE). La intensidad de los píxeles de la imagen de correlación, en este caso poseen una intensidad media constante, sin diferenciar zonas más intensas (2.26, E).

Este método permite también determinar un filtro de corte entre las partes de la imagen de interés y el fondo, ya que discriminando del total de los píxeles solo aquellos que presentan modulación en el tiempo, es posible separar dos poblaciones, aún cuando el histograma de intensidades no lo permite.

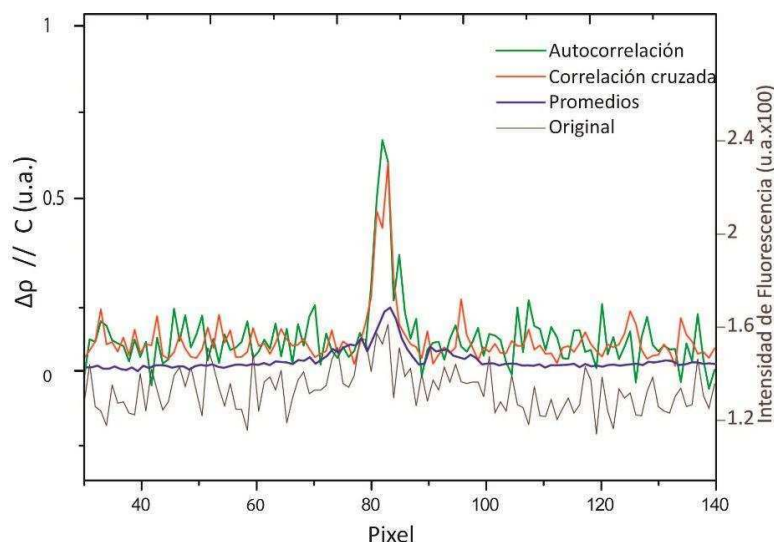


Figura 3.25: Perfiles correspondientes a una muestra de AuNR con AlexaFluor 546 a la que se le sumó ruido digitalmente y se le aplicó correlación. En verde se ve la salida de la autocorrelación, mientras que en rojo la de correlación cruzada con una función escalón de igual frecuencia que la modulación. En gris

Para mejorar la correlación y por ende el contraste de la misma, es necesario que la modulación sea menos ruidosa, lo que implicaría mayor %Caída y repetitividad. Para esto, sería ideal utilizar una sonda con una respuesta térmica tipo AlexaFluor532. Sin embargo dada su inestabilidad temporal, sería imposible utilizar para este tipo de análisis, ya que como se vio previamente en tan solo 3 ciclos más del 80% de la muestra pierde la señal por completo. Como se estudió en la sección anterior, sería posible aplicar el método aun cuando hay fotoblanqueo pero es necesario un mínimo de ciclos (por ejemplo, para el caso simulado de la sección anterior, se encontró un mínimo de 6 ciclos) para extraer una diferencia significativa (el doble por ejemplo) con respecto a realizar un simple promedio de los datos, sin necesidad de modular la sonda.

Quedaría pendiente el estudio de otras sondas para esta aplicación, de manera que ajustando la potencia del láser de calentamiento se obtenga un %caída y una cantidad de ciclos útiles de la sonda que amplíen las diferencias obtenidas entre modular y promediar. Sería también interesante probar la viabilidad de estos marcadores en muestras de relevancia biológica.

Las pruebas realizadas en estos ensayos demuestran por primera vez el efecto de modulación de una sonda fluorescente por medio de calentamiento local plasmónico. Otras aplicaciones del método serán desarrolladas en el capítulo 4.

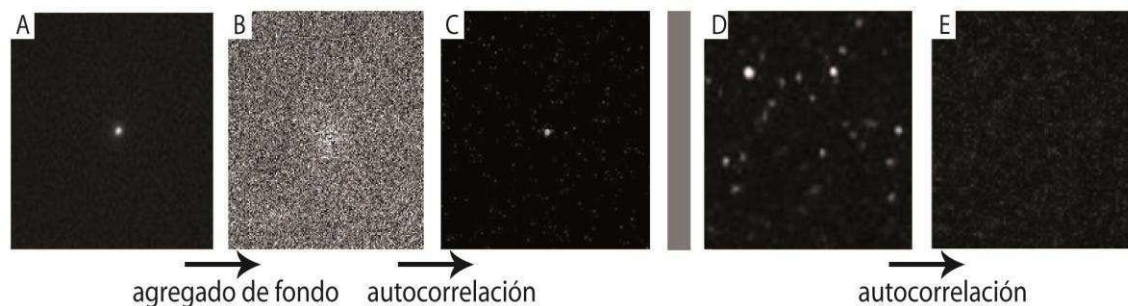


Figura 3.26 Se presentan las imágenes que fueron analizadas por correlación: A. corresponde a una muestra de AuNR 100x25nm con AlexaFluor 546 modulada con NIR. B. A estos datos se le suma fondo aleatorio a fin de desdibujar la presencia de la nanopartícula (perfil presentado en figura 2.25 azul). C. Imagen de correlación de B., curva verde de la figura 2.25 D. Imagen de muestra con AuNR de 100x25nm con AlexaFluor 546 sin modulación de NIR. E. Imagen de correlación de D, al no haber modulación la figura de salida es un plano.

3.6 Conclusiones y perspectivas

En este capítulo se ha estudiado en detalle la posibilidad la fluorescencia de una sonda por medio del calentamiento de nanopartículas. En particular se ha estudiado la respuesta de dos fluoróforos distintos al ser calentados en solución, y al ser expuesto a un campo de temperaturas debido a una NP aislada o a un aglomerado de partículas.

Resolviendo la ecuación de calor de forma analítica aproximada y numérica, se han podido contrastar la respuesta de los fluoróforos medida con la calculada, obteniendo una respuesta que se ajusta a las simulaciones, únicamente para el caso en que las NPs se encuentran dispersas. En muestras donde se presentan aglomerados de NPs se obtiene una respuesta que no coincide con los datos simulados, ya que en este caso las NPs pueden interactuar entre sí, modificando la resonancia plasmónica (de manera que el láser de calentamiento no estaría excitando en igual medida al plasmón) como así también se podrían estar generando efectos colectivos de calentamiento (ver 1. Introducción). En este último caso, sería interesante estudiar el efecto colectivo en una cantidad controlada de partículas. Se han propuesto algunas opciones para realizar este estudio en colocando NPs de forma controlada en el espacio por medio de impresión de nanopartículas por fuerzas ópticas.

Las variaciones entre los datos simulados y los medidos en el caso de muestras AuNR aisladas, podrían provenir de diferencias en la distancia de los fluoróforos a las NPs. Dado que estas partículas no han sido sintetizadas en el laboratorio, no se cuenta con la información exacta acerca de cómo se ha logrado la funcionalización de la superficie con biotina, por lo que se desconoce con exactitud la distancia a la que quedarían situados los

fluoróforos. Se ha propuesto realizar un estudio detallado de la respuesta de los fluoróforos ante el campo de temperaturas generado por el AuNR, al variar la distancia a la NP. Para lograr controlar estas distancias con precisión, se propuso utilizar como plataforma un origami de ADN rectangular similar al utilizado en el trabajo de Acuña, 2012¹¹¹.

Experimentalmente se ha podido demostrar que es viable modular la intensidad de fluorescencia de una molécula, en este caso AlexaFluor 546 y AlexaFluor 532, sin embargo se podría haber utilizado otra especie que presente respuesta con la temperatura. Se utilizaron dos tamaños de partículas cilíndricas distintas, observando que a mayor coeficiente de absorción, mayor efecto sobre los fluoróforos. Esto concuerda con la teoría, ya que en ese caso, el campo de temperaturas generado será más intenso, dado que:

$$\Delta T(r) = \frac{\sigma_{abs} I}{4\pi r k_{H_2O}}$$

Por último se estudió la factibilidad de utilizar esta sonda modulada para la mejora de imágenes, en particular para mejorar imágenes con poco contraste y mucho ruido. Se observó que para lograr una mejoría apreciable en las imágenes, es necesario modular la sonda con amplitudes de un 40% con respecto al fondo, como mínimo. Quedaría pendiente estudiar otras sondas para esta aplicación, que presenten una respuesta más sensible a la temperatura, pero con un fotoblanqueo que permita realizar un mínimo de ciclos para obtener una imagen de correlación con un contraste apreciable con respecto al fondo.

3.7 Materiales y métodos

Preparación de Muestras

3.7.1 Limpieza de Cubreobjetos

Es necesario que el material utilizado sea cuidadosamente lavado de manera de reducir interferencia en las muestras debido a suciedades propias del material de vidrio o de las soluciones. Por esta razón, todas las soluciones utilizadas en estos trabajos fueron preparadas con agua milliQ o filtradas previo a su utilización.

Los cubre-objetos fueron lavados previos a su utilización según el siguiente protocolo:

Protocolo 3.1:

- Colocar los cubreobjetos en acetona y sonicar 15 minutos
- Enjuagar 3 veces con abundante agua milliQ.

- Dejar los cubre-objetos 1 hora en solución de alcohol 70% y ácido clorhídrico 0.1% agitando en plataforma móvil.
- Retirar el líquido y enjuagar 3 veces con abundante agua milliQ y con 15 minutos de agitación en plataforma móvil.
- Secar con nitrógeno y guardar en cajas de Petri selladas hasta su utilización.

3.7.2 Funcionalización de Cubreobjetos

Preparación de cubres para observación de nanopartículas aisladas.

Utilizar cubre-objetos lavados según Protocolo 2.1 y PBS 1X filtrado.

La marcación se realizó dentro de placas múltiples (multi-well plates) a fin de evitar la adhesión de los vidrios entre sí, por lo que las cantidades corresponden a la solución agregada por cada placa.

Protocolo 3.2

- Colocar los cubres dentro de cada depósito de la placa.
- Agregar 400 μ l de HF 0.2%v/v por vidrio, dejar reaccionar 30seg. Remove.
- Limpiar 3 veces con PBS 1X (10 min c/u en base móvil).
- Agregar 400 μ l de biotina-BSA 1mg/ml + BSA 0.1mg/ml (ambos preparados en PBS 1X). Dejar reaccionar durante la noche en heladera.
 - Lavar con PBS 1x tres veces.
 - Agregar 400 μ l de estreptavidina 1mg/ml en PBS 1x dejar actuar 1 hora.
 - Lavar con PBS 1x tres veces.

Agregado de Muestra:

- Colocar una dilución de AuNR-biotina de manera que su concentración sea del orden de 500 pM. Dejar reaccionar de una a 2 horas.
 - Lavar con PBS 1x tres veces.
 - Marcación con fluoróforo. Se prepara una dilución de la sonda a utilizar del orden de 50 nM. Dejar reaccionar 15 minutos.
 - Lavar con PBS 1x tres veces.

Armado de muestras para el microscopio

Se coloca sobre un papel óptico el cubreobjetos limpio y funcionalizado del lado que no se encuentra la muestra sembrada (de esta manera se seca la parte inferior del vidrio que estará en contacto con el aceite óptico). Luego se coloca el vidrio sobre el portamuestra (ver figura 3.12 recuadro b) y se cierra con un o-ring para evitar pérdidas de líquido sobre el objetivo. Llenar la placa con PBS 1x nuevamente.

3.7.3 Marcación de NPs con fluoróforos para experimentos en gota

Las muestras de AuNR depositadas en forma de gota, para los estudios en el microscopio de Epi-fluorescencia, fueron marcadas con fluoróforo y lavadas del exceso antes de ser colocadas sobre los vidrios cubreobjetos.

Partiendo de un stock de AuNR 5nM se realizó una marcación 1:300 NP:AlexaFluor en PBS 1x. Se utilizaron AuNR-biotina y fluoróforos con estreptavidina.

Transcurridos 90 minutos se limpia la muestra del exceso de fluoróforo centrifugando 1 hora a 7000 r.p.m. Se descarta el sobrenadante y se resuspende el pellet en PBS 1x. Se repite a fin de limpiar el fluoróforo libre de la muestra.

Una vez terminado este proceso se realiza un espectro UV-vis y se compara con el espectro de las NPs previo a la marcación a fin de corroborar que las AuNRs no se hayan agregado en el proceso.

3.7.4 Detalles del arreglo experimental

Las mediciones se realizaron en un microscopio Olympus IX71 (Olympus, Japan) de epifluorescencia en FCEN-UBA (Figura 3.12). La muestra es excitada con una lámpara de Mercurio de potencia regulable a 3 valores discretos (Max, Med, Low). La longitud de onda de excitación está determinada por los filtros del cubo utilizado. En este caso, acorde a las características de la muestra, se eligió trabajar con el cubo de TRiTC (cubo Olympus con filtros Chroma), cuyos espectros pueden verse en la figura 3.12.

Para coleccionar la fluorescencia, se utilizó un objetivo Plan Apo (Olympus, Japan) con magnificación 60x y apertura numérica 1.42. La señal de fluorescencia es enfocada sobre una cámara iXon-885 EM-CCD (Andor, Belfast, Reino Unido) con 1004 × 1002 pixeles activos de 8 × 8 μm de tamaño, operada a 20 ms por cuadro. En las condiciones experimentales descriptas el tamaño de pixel corresponde a 130 nm sobre la muestra.

Para excitar la muestra con NIR ($\lambda=808\text{nm}$, Potencia máxima 1W multimodo, TolKet), se acopló este láser al microscopio iluminando a la muestra desde arriba como se muestra en

la figura. Se reemplazó el condensador del microscopio por una estructura que sostiene la fibra óptica multimodo por donde llega el haz, un objetivo PlanN 10x (Olympus) para colimar el haz y un último objetivo LUMPLFLN 60x de agua (Olympus) para enfocar nuevamente el haz sobre la muestra. De esta forma se pudo hacer uso del soporte del microscopio que posee tornillos calibrados a fin de ajustar la posición x, y, z del condensador, o en este caso del NIR.

El láser se moduló con un generador de funciones (RIGOL, DG1022), este generador permite setear la frecuencia y la forma de la modulación con la que se alimenta el láser. Dado que en esta configuración el láser NIR puede llegar directo a la cámara, se agregó un filtro de corte (notch) en una rueda de filtros anterior a la cámara

Por último, para la preparación de la muestra, se utilizaron porta muestras con traba a rosca y con un anillo de goma (o-ring) para evitar la pérdida de agua.

3.7.5 Determinación del tamaño del haz de calentamiento

Una vez montado el sistema se determina el tamaño final del haz de calentamiento a fin de estimar la irradiancia que incidirá sobre la muestra. Para esto se remueve el filtro notch de la rueda de filtros previa a la cámara y se ajusta la intensidad del láser suficientemente baja de manera de poder detectarla sin dañar el sistema de adquisición. Se tomó una imagen y la misma se midió con ayuda del ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>) y se ajustó por un perfil gaussiano como se presenta en la figura 3.27. La función de dispersión de punto (PSF) se toma como el ancho del ajuste, marcado sobre la curva, que para este caso se obtuvo $13\mu\text{m}$.

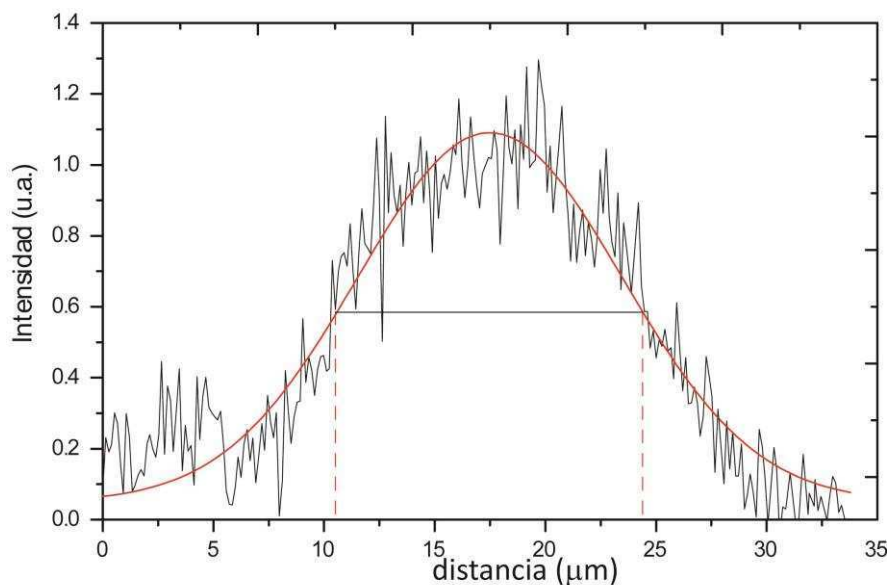


Figura 3.27: Perfil tomado sobre una imagen sacando el filtro notch con el haz al mínimo de potencia para evitar dañar la cámara, con ajuste Gaussiano al perfil.

3.7.6 Espectroscopías

Los espectros de absorción de UV-Vis fueron adquiridos en un espectrómetro Cary 50 UV-vis (Agilent Technologies, USA), perteneciente al departamento de química orgánica, FCEyN, UBA. Para las mediciones se utilizaron cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico.

Los espectros de fluorescencia se realizaron en un espectrofotómetro Cary Varian Eclipse termoestabilizable por medio de un dispositivo termoeléctrico (peltier).

Para medir los espectros de fluorescencia de los fluoróforos la excitación se definió de acuerdo a la longitud de onda media del filtro de excitación del cubo TRiTC, de manera que los resultados obtenidos fueran comparables con los adquiridos luego por imágenes de microscopía.

3.7.7 Simulaciones del campo de temperaturas generado por AuNRs

Las simulaciones de campos de temperatura fueron realizadas resolviendo numéricamente la ecuación de calor en tres dimensiones eq 1.18. La ecuación se resolvió dentro de una caja definida por $-300 < x < 300$, $-300 < y < 300$, $-350 < z < 350$ (nm). En los límites de la caja, se considera la temperatura constante e igual a la temperatura ambiente (298K). El nanocilindro se centró en el origen (centro de la caja). La fuente f se modeló como una función delta situada en el centro del AuNR, tomando un valor positivo determinado por la sección eficaz de absorción del AuNR y la potencia del haz de calentamiento y valiendo cero en el resto del espacio.

La ecuación de calor fue resuelta utilizando el método de elementos finitos en el espacio, y de diferencias finitas para discretizar el tiempo, para un tiempo total de 150 ns, utilizando un paso de 1 ns. Se utilizó una malla tetraédrica producida por la función *Distmesh* del generador de mallas de *Matlab*. La malla es redefinida dentro del AuNR y si entorno, de manera de minimizar el error producido por el salto en el coeficiente de difusividad en la interface entre el oro y el agua. La distancia entre nodos de la malla cercana a la NP es de ca. 2 nm, y aumenta linealmente con la distancia al AuNR.

4

Biosensado por reducción fototérmica de fluorescencia

En este capítulo se describe un nuevo método de biosensado basado en la aplicación del efecto de fotoblanqueo selectivo por calentamiento plasmónico descrito en el capítulo 3. Se presentan los fundamentos, el principio de funcionamiento y una demostración experimental usando el sistema modelo de reconocimiento biotina-streptavidina.

4.1. Inmunoensayos, descripción y relevancia

Un biosensor es un dispositivo que permite detectar la presencia o cuantificar la concentración de una molécula biológicamente relevante, denominada analito o molécula blanco. Los biosensores en general constan de dos componentes: i) un sistema de reconocimiento molecular y ii) un sistema de sensado que traduce la presencia de analito en una señal medible. Mundialmente la comercialización de biosensores para medicina es un negocio muy importante y ha impulsado fuertemente la investigación y desarrollo de numerosos sistemas de reconocimiento y sensado¹⁸².

Dentro de las metodologías de sensado, se destacan las basadas en técnicas ópticas por su simpleza, rapidez y baja invasividad. Entre los biosensores ópticos, los basados en fluorescencia proveen las mayores sensibilidades^{27,183}. En general un biosensor exitoso debe proveer una respuesta rápida, con una sensibilidad adecuada y gran reproducibilidad. Los biosensores son clasificados en homogéneos y heterogéneos. Los biosensores homogéneos funcionan en una única fase, generalmente líquida, no requieren tratamientos de separación, y son los más simples y rápidos. Una limitación común a la mayoría de los biosensores homogéneos está impuesta por las contribuciones de fondo a la señal de sensado. Para reducir la contribución de estas señales se realizan biosensores

heterogéneos que involucran pasos de separación y purificación como así también reacciones superficiales sobre substratos. Gracias a la separación física del analito previa a la medición, estos sensores brindan en general las sensibilidades más altas. Por estos motivos, muchas investigaciones se han focalizado en el desarrollo de sensores homogéneos por su sencillez, pero con sensibilidades comparables a los heterogéneos^{182,184-186}.

En las últimas décadas el desarrollo de nanomateriales ha tenido un gran impacto en el área del biosensado. En particular, las nanopartículas metálicas han permitido desarrollar mejoradas plataformas de biosensado gracias a sus distintivas propiedades ópticas, y la gran variedad de protocolos eficientes para controlar su forma, tamaño y funcionalización química superficial^{24,70}. Sumado esto a la posibilidad de ser combinadas con otras técnicas como espectroscopía Raman y fluorescencia, su popularidad en el campo ha sido creciente^{185,187-189}.

Un tipo de sensores capaces de detectar analitos sin ningún paso previo de marcación son los sensores sándwich. Su nombre ilustra el hecho de que dos entidades diferentes se unen al analito, de manera independiente y en sitios diferentes. Por ejemplo para la detección de proteínas se emplean anticuerpos monoclonales que se unen a la proteína blanco en posiciones específicas (epitopes) diferentes. La señal de biosensado debe originarse a partir de alguna interacción entre las dos entidades unidas a la molécula blanco. Existen sensores sándwich tanto homogéneos como heterogéneos, siendo estos últimos los más populares. Se destacan los ensayos sándwich ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay).

Un problema común en los ensayos de reconocimiento molecular en muestras complejas, suele ser la interacción no-específica que puede dar como resultado falsos negativos o positivos, afectando la confiabilidad del resultado. Aquellas sustancias que podrían afectar la concentración medible del analito o alterar la afinidad del anticuerpo pueden resultar potenciales interferencias en los inmunoensayos. Ciertas sustancias endógenas como anticuerpos polirreactivos junto con otras proteínas de unión pueden interferir en la reacción entre el analito y los anticuerpos específicos.

Los problemas de interferencia se presentan aún en ensayos de biosensores heterogéneos, ya que el pegado no específico muchas veces ocurre previo al paso de separación. Los sensores tipo sándwich, al reaccionar únicamente cuando el analito es reconocido por dos unidades de reconocimiento independientes, minimizan los problemas de interferencia, por lo que son preferidos en muestras complejas

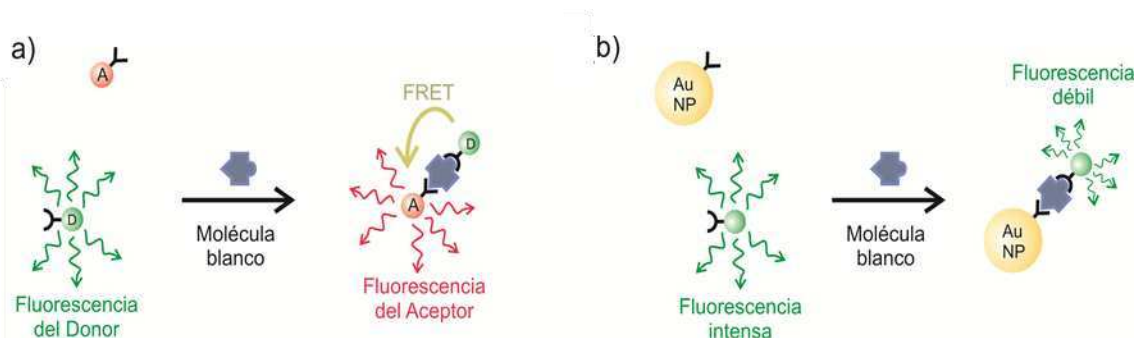


Figura 4.1 Esquemas de funcionamiento de dos biosensores sandwich homogéneos basados en fluorescencia. a) Las dos entidades de reconocimiento de la molécula blanco se encuentran marcadas fluorescentemente, unas con un fluoróforo donador (D) y las otras con uno aceptor (A) capaces de interactuar mediante FRET (Förster resonance energy transfer). En presencia de la molécula blanco, la formación del sandwich molecular pone en cercanía suficiente a los donores y aceptores, permitiendo la ocurrencia de FRET. b) De manera similar, la formación del sandwich molecular pone a un fluoróforo en la cercanía de una nanopartícula metálica, capaz de absorber la energía de excitación y suprimir la emisión de fluorescencia.

La figura 4.1 muestra esquemáticamente dos ejemplos de biosensores sandwich homogéneos, con lectura de fluorescencia pero basados en dos principios físicos diferentes: a) mediante transferencia de energía Förster entre un fluoróforo donador y uno aceptor, y b) mediante reducción de fluorescencia por transferencia de energía a una nanopartícula metálica. Un biosensor como el de la figura 4.1 b) fue desarrollado por el Dr. Stefani en colaboración con Roche Diagnostics GmbH (Penzberg, Alemania) para la detección de troponina cardíacas^{T24}.

En el método de la figura 4.1 a) la cantidad de molécula blanco se determina mediante la medición cuantitativa de la emisión de fluorescencia del aceptor. En el método de la figura 4.1 b) la cantidad de molécula blanco se determina cuantificando la reducción de fluorescencia que se produce al armarse el sándwich molecular. Un problema usual de los sensores basados en FRET, es que esta técnica depende fuertemente de la distancia de separación donador-aceptor. Radios típicos de acción rondan los 6-8 nm, por lo que el tamaño mismo de los anticuerpos y del analito restringen el uso de FRET. En ejemplo de la figura 4.1b), esta restricción se relaja ya que la transferencia directa de energía a las NPs metálica es eficiente hasta distancias de más de 15 nm.

En este capítulo se describe un nuevo método de sensado molecular homogéneo, donde se determinará la concentración del analito, cuantificando la reducción de fluorescencia al irradiar AuNPs a la frecuencia de resonancia.

4.2. Principio de funcionamiento del sensado por reducción fototérmica de fluorescencia

La figura 4.2 esquematiza los componentes necesarios. Un sistema general utilizará nanopartículas funcionalizadas superficialmente con una entidad de reconocimiento molecular específica para el analito (RM1). Estas NP pueden ser de cualquier forma, su estructura definirá su/s resonancia/s plasmónica/s, lo cual influirá en el diseño del biosensor. Otra o la misma entidad de reconocimiento molecular (RM2) se une a una o varias especies luminiscentes. La elección del fluoróforo estará sujeta a la posición del plasmón, ya que es importante que el calentamiento y la fluorescencia puedan excitarse de manera independiente (detalle en sección 3.2.1).

En presencia del analito, se forman estructuras sandwich que dejan a las especies luminiscentes en la vecindad directa y nanométrica de las nanopartículas. Cuando se irradia el sistema con la radiación de calentamiento, esta es absorbida única o muy preferencialmente por las nanopartículas generando un campo local de alta temperatura alrededor de las NP. Las especies luminiscentes unidas a las nanopartículas mediante el analito se verán afectadas por la temperatura, mientras que las que sigan libres en solución no. De la medición del efecto de la temperatura sobre la luminiscencia es posible cuantificar la cantidad de analito presente.

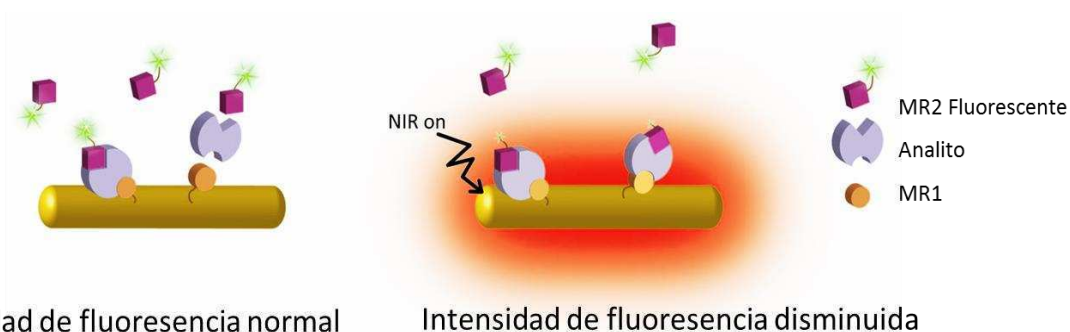


Figura 4.2 Principio de funcionamiento del sensor molecular basado en blanqueo de fluorescencia fototérmico. El analito construye un sándwich molecular en conjunto con las unidades de reconocimiento molecular MR1, en la superficie de la nanopartícula, y MR2 marcada con una sonda fluorescente. Al exponer el sistema a la radiación de calentamiento (p.e. un láser NIR) las nanopartículas generan un campo de alta temperatura localmente a su alrededor. Los fluoróforos que conforman el sandwich se ven inmersos en el campo de temperaturas, reduciendo su emisión de fluorescencia, mientras que los fluoróforos libres en solución no se ven afectados.

4.3. Componentes del ensayo y dispositivo de medición

Las partículas usadas fueron nano-varillas de oro (AuNRs) de 95x22nm, cuya resonancia longitudinal se encuentra en 800 nm, aproximadamente ($\sigma = 2,4 \cdot 10^{-3} \mu m^2$, Nanopartz, USA) El fluoróforo utilizado fue AlexaFluor546. En la figura 4.1.3 a) se muestran los espectros de absorción y emisión de AlexaFluor546, junto al espectro de extinción de los AuNRs. Se indican además las ventanas espectrales de excitación y detección de fluorescencia, y de calentamiento plasmónico.

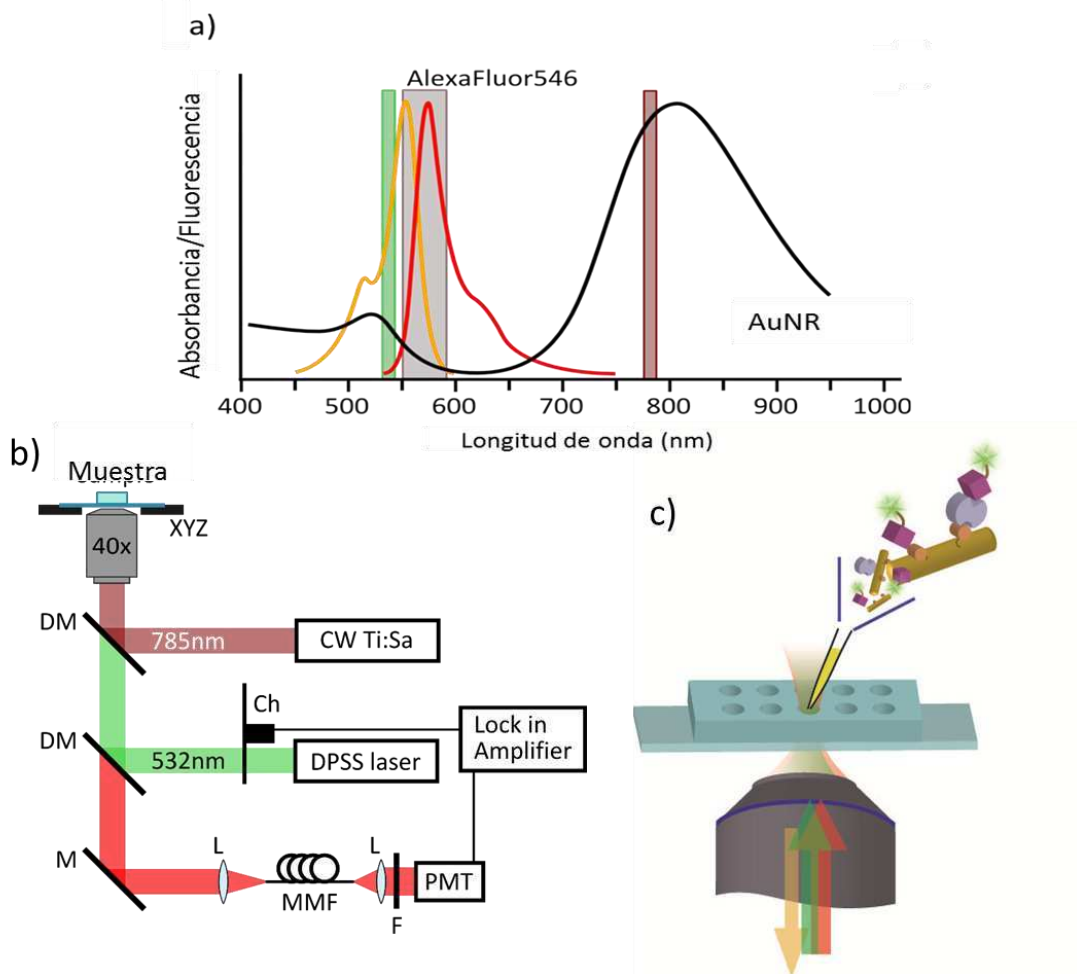


Figura 4.3. Configuración experimental: a) Espectro de extinción de las AuNRs, espectro de absorción y emisión de AlexaFluor546. Las bandas verticales representan la longitud de onda de excitación (532 nm), detección (570±20 nm), y el láser de calentamiento plasmónico (785nm). b) Esquema del dispositivo experimental. DM: espejo dicróico, M: espejo, Ch: chopper mecánico, L: lentes, MMF: fibra multimodo, PMT: tubo fotomultiplicador c) Representación de porta muestra utilizado para estudiar las muestras en solución.

Como sistema de bio-reconocimiento se utilizó biotina-estreptavidina, el cual es un sistema modelo arquetípico para el testeo de nuevos biosensores. Se utilizaron AuNRs funcionalizados superficialmente con biotina, y dependiendo del ensayo AlexaFluor546 modificada con una entidad de biotina, o unida a estreptavidina.

Los ensayos deben realizarse usando pequeños volúmenes de muestra, menores a 50 μ l. Con este fin se trabajó en colaboración con el Laboratorio de Electrónica Cuántica (LEC, FCEyN, UBA), para adaptar un microscopio confocal no comercial construido por el Lic. Martín Caldarola bajo la dirección de la Dra. Andrea Bragas.

El dispositivo experimental se muestra esquemáticamente en la figura 4.3 b) y c) consiste en un microscopio confocal adaptado para incluir una entrada de excitación adicional. Se utilizaron entonces dos láseres de onda continua, uno verde de 532 nm para excitar la fluorescencia y otro para realizar el calentamiento plasmónico de las AuNR a 785nm. Ambos láseres se combinaron utilizando espejos dicróicos adecuados. Un objetivo 40x (Olympus ULPSAPO 40x, NA 0.9) se usó tanto para enfocar los láseres en la muestra como para recolectar la fluorescencia. La emisión fue filtrada espectralmente y enfocada en una fibra óptica multimodo, que sirve como pinhole confocal y conduce la luz hasta un tubo fotomultiplicador. Para mayor sensibilidad se moduló la excitación de fluorescencia mediante un chopper mecánico y la señal de fluorescencia se filtró y amplificó con un amplificador Lock-in.

4.4. Determinación de parámetros esenciales del sensor por simulaciones

Los inmunoensayos sándwich presentan cierta complejidad para definir las relaciones de concentraciones entre reactivos debido al efecto conocido como efecto Hook¹⁸⁴ (figura 4.4).

A diferencia de otros sensores no-sandwich, que poseen una curva de respuesta estándar tipo sigmoidea que termina en un plateau a la concentración donde el marcador monomolecular se satura (curvas de saturación), los sensores sándwich presentan curvas de respuesta más complejas. Estas curvas suelen presentar una forma tipo campana caracterizada por un primer rango de señal dependiente de la concentración, que llega a un máximo a partir del cual la señal comienza a decrecer hasta llegar a un plateau^{27,184}.

El rango de concentraciones de analito donde la señal comienza a caer es conocido como punto hook. Por debajo de este punto ambas unidades de reconocimiento pueden adherirse a la molécula blanco favoreciendo la detección. En el punto hook una de ambas moléculas de reconocimiento es saturada por el analito dando un máximo de respuesta. Al continuar aumentando la concentración de analito, el analito compite consigo mismo y por lo tanto la formación del sándwich se reduce, haciendo decrecer la señal de respuesta.

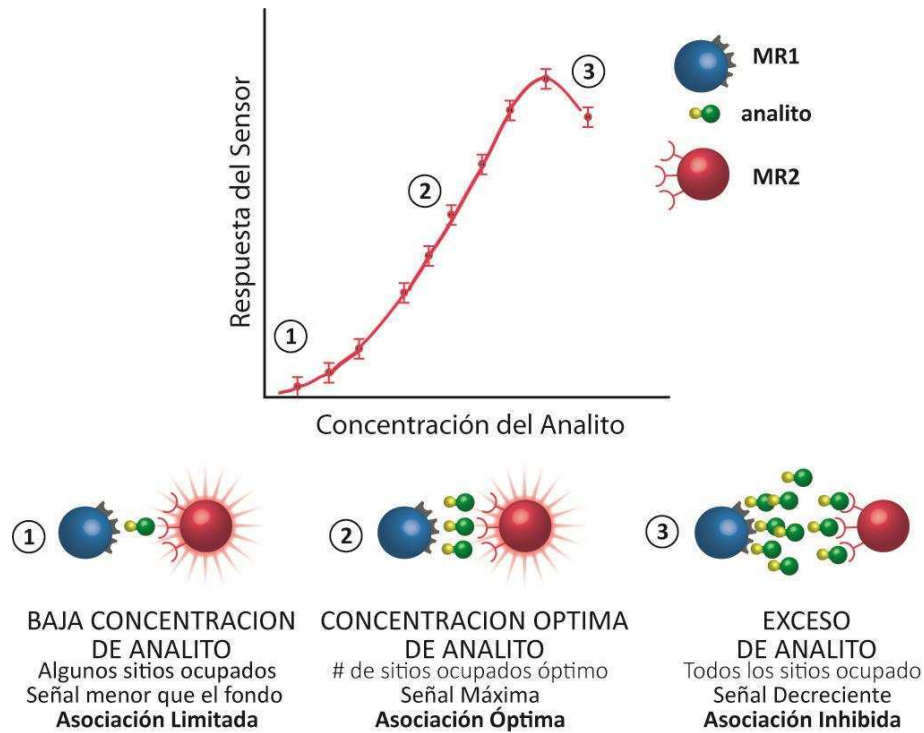
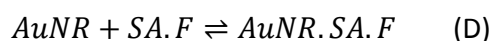
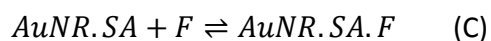
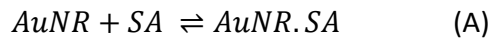


Figura 4.4 Efecto Hook. Representación de la respuesta de un sensor sándwich con dos unidades de reconocimiento y de los distintos rangos de comportamiento del sensor según la concentración del analito.

Es importante caracterizar estos rangos de respuesta de los sensores para optimizar el rango de concentraciones de trabajo, y evitar por ejemplo falsos negativos.

Dado que el sistema que se utilizará como prueba usa dos tipos de marcadores pero con iguales unidades de reconocimiento (biotina-estreptavidina) se modeló este sistema mediante simulaciones a fin de analizar la respuesta esperada. Se plantean las ecuaciones de equilibrio correspondientes, donde $AuNR$ son las nano-varillas de oro con biotina, F el fluoróforo unido a biotina, SA el analito estreptavidina y el punto implica la formación del complejo.



Y a su vez las ecuaciones diferenciales que se ajustan a este modelo son:

$$(1) \frac{d[AuNR]}{dt} = k_{on}[AuNR][SA] + k_{off}[AuNR.SA] - k_{on}[AuNR][SA.F] + k_{off}[AuNR.SA.F]$$

$$(2) \frac{d[SA]}{dt} = k_{on}[SA][F] + k_{off}[SA.F] - k_{on}[AuNR][SA] + k_{off}[AuNR.SA]$$

$$(3) \frac{d[F]}{dt} = k_{on} [AuNR.SA][F] + k_{off}[AuNR.SA.F] - k_{on}[SA][F] + k_{off}[SA.F]$$

$$(4) \frac{d[AuNR.SA]}{dt} = k_{on}[AuNR][SA] - k_{off}[AuNR.SA] - k_{on}[AuNR.SA][F] + k_{off}[AuNR.SA.F]$$

$$(5) \frac{d[SA.F]}{dt} = k_{on}[SA][F] - k_{off}[SA.F] - k_{on}[AuNR][SA.F] + k_{off}[AuNR.SA.F]$$

$$(6) \frac{d[AuNR.SA.F]}{dt} = k_{on}[F][AuNR.SA] - k_{off}[AuNR.SA.F] + k_{on}[AuNR][SA.F] - k_{off}[AuNR.SA.F]$$

donde k_{on} y k_{off} representan las constantes de asociación y disociación de biotina-estreptavidina, respectivamente. Para resolver el sistema se consideraron diferentes condiciones iniciales de concentración de AuNR y AlexaFluor546 de manera de estudiar la respuesta del sensor en distintos rangos, pero igual proporciones.

Se estudió el comportamiento para cantidades de analito variables en presencia de AuNR: AlexaFluor, en relaciones 1:2, 1:10 y 1:50 para concentraciones de AuNR de 0.1nM., 0.2nM y 1nM (figura 4.5 a), b) y c) respectivamente), similares a las usadas experimentalmente. En las simulaciones se consideró un sitio de unión por AuNR. En la práctica un AuNR puede tener múltiples sitios de unión para el analito si se optimiza la funcionalización superficial.

De las simulaciones se observó el comportamiento típico de un sensor sándwich. Para un funcionamiento óptimo, las concentraciones de ambos componentes del ensayo deben estar ajustadas a la concentración que quiere detectarse; ninguno de los componentes debe limitar la formación de estructuras sándwich. En nuestro caso tomamos a los AuNRs como reactivos limitantes, por lo que el rango dinámico del sensor queda determinado su concentración. La concentración de fluoróforos es irrelevante, siempre y cuando sea suficiente para revelar la saturación. Lo mismo podría decirse a la inversa, si el reactivo limitante fueran los fluoróforos.

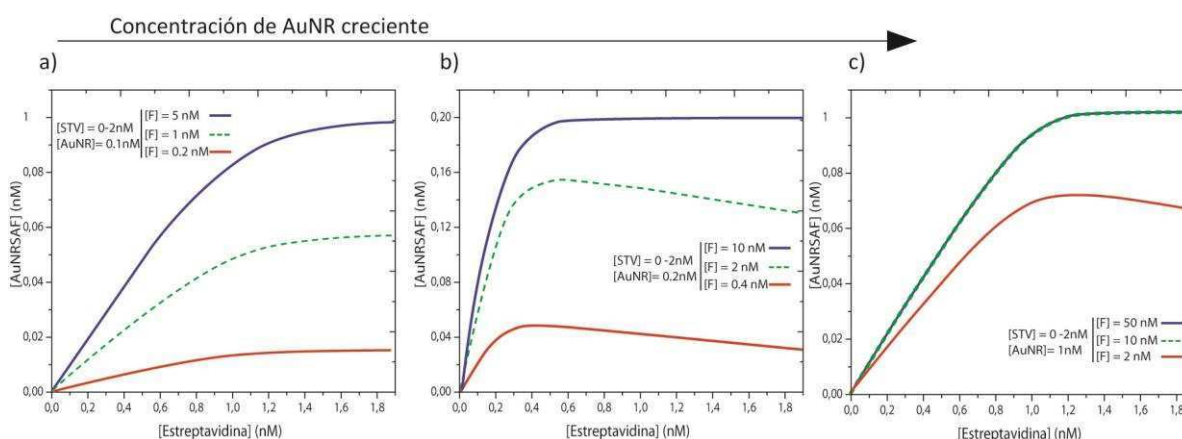


Figura 4.5 Simulaciones de respuesta de un sensor tipo sándwich al variar la concentración de analito (estreptavidina) ante relaciones crecientes de unidades de reconocimiento. Aquí $[F]$ denota, concentración de fluoróforo y $[AuNR.SA.F]$ concentración de producto a) con 0.1 nM AuNR b) 0.2 nM de AuNR, c) 1nM de AuNR.

Idealmente entonces uno quisiera tener ambos componentes del ensayo por exceso, de modo de garantizar un rango dinámico lo más extendido posible. Sin embargo, por razones prácticas de la medición aumentar la concentración de AuNRs o fluoróforo más de lo necesario va en detrimento de la sensibilidad del ensayo. Usar altas concentraciones de AuNRs tiene la desventaja que incrementa la densidad óptica de la solución y la misma muestra actúa como filtro para la fluorescencia y la excitación. Incrementar la concentración de fluoróforo demasiado hace que la fracción de fluoróforos en estructuras sándwich sea cada vez menor, y en consecuencia su detección se hace más difícil.

Por otro lado, si se buscara llegar a sensibilidades muy altas bajando las concentraciones es importante tener en cuenta que se puede entrar en un régimen en el que solo se tienen unas pocas nanopartículas y/o fluoróforos en el volumen de observación, y las fluctuaciones de intensidad pueden entorpecer la medición.

A fin de determinar la mínima concentración de AuNRs viable evitando fluctuaciones en la señal, se estimó la cantidad de partículas en el volumen de observación y el tiempo de permanencia en el mismo. De esto última también dependerá el tiempo mínimo de integración para las mediciones.

Se determinó el volumen de observación midiendo la dispersión de luz de una NP de oro de 80 nm fijada sobre un cubreobjetos, al escanear el haz de excitación de fluorescencia ($\lambda=532$ nm) en las tres dimensiones. En la figura 4.6 se muestran cortes del volumen de observación. De esta misma manera se determinó la posición y tamaño del foco del haz de calentamiento ($\lambda=785$ nm). Antes de cada medición se corrigió la posición relativa de ambos focos para maximizar la superposición y así garantizar que la región calentada fuera la misma que la interrogada por fluorescencia.

De estas mediciones se pudo estimar que el volumen confocal es del orden de 2fL . Considerando la concentración de AuNRs de 1nM , se obtiene que en promedio hay 1.6 AuNRs en el volumen confocal. Para concentraciones de 0.5nM y 0.2nM , los cálculos reflejan que habría menos de una AuNR por volumen confocal, lo que no es recomendable para las mediciones, ya que la señal podría dar nula en ciertos intervalos independientemente del láser NIR.

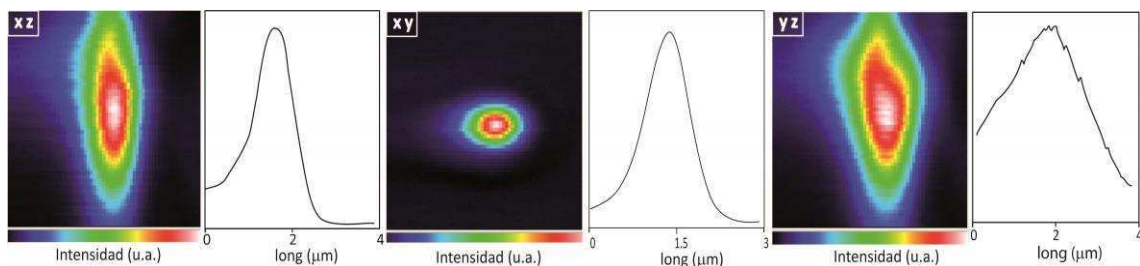


Figura 4.6 Perfiles del volumen confocal de observación.

Con el objetivo de obtener una estimación del tiempo de residencia de cada AuNRs en el volumen de observación, se analizó su difusión usando el coeficiente de difusión traslacional D_{tr} de los AuNRs ¹⁹⁰:

$$D_{tr} = \frac{k_B T}{3\pi\kappa L} \left[\ln\left(\frac{L}{d}\right) + v \right] \quad (4.1)$$

Donde L y d son el largo y el diámetro del AuNR respectivamente, k_B es la constante de Boltzmann, T la temperatura del medio, κ la viscosidad del solvente (agua en este caso) y v está definido³⁰ como

$$v = 0.312 + 0.565\left(\frac{d}{L}\right) + 0.1\left(\frac{d}{L}\right)^2 \quad (4.2)$$

Con estos datos entonces se puede obtener el tiempo medio de permanencia de una partícula en el volumen confocal, utilizando:

$$\tau_D = \frac{r_0^2}{4D_{tr}} \quad (4.3)$$

Donde r_0 es la cintura del haz medida. En la figura 4.7 se grafica el tiempo de difusión obtenido para los AuNR para distintas temperaturas del medio, considerando la contribución de agitación térmica y los cambios de viscosidad del agua. Se observa que en el rango de temperaturas de trabajo razonables los tiempos de residencia varían de 0,5 a unos 3,5 ms.

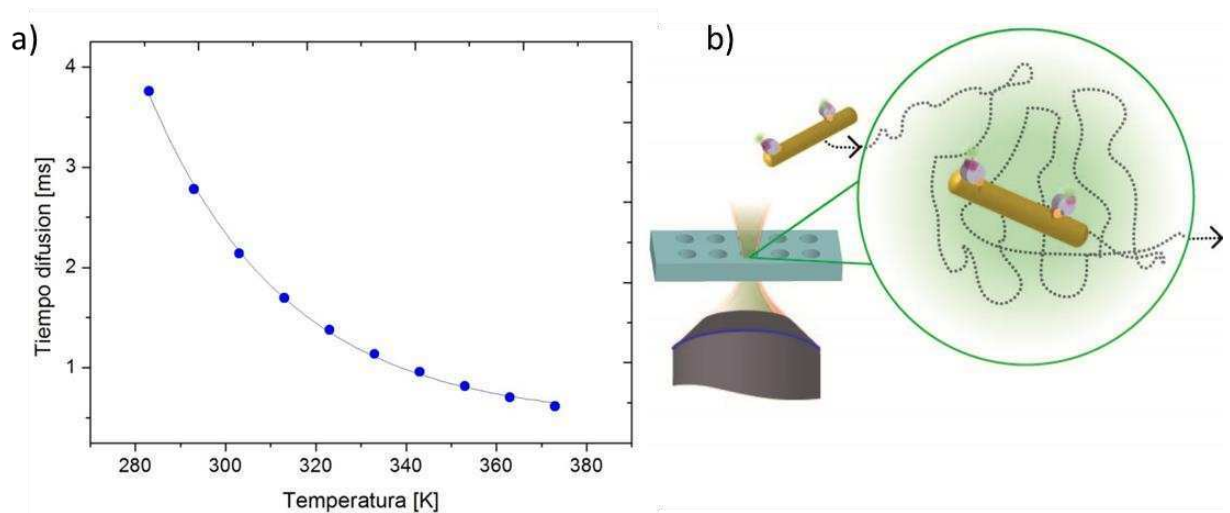


Figura 4.7 Tiempo promedio de residencia de los AuNRs en el volumen de observación a distintas temperaturas. a) Tiempo de difusión en función de la temperatura del medio b) Representación del área de difusión

4.5. Reducción selectiva de fluorescencia

El primer paso consistió en verificar que en efecto fuera posible reducir la emisión de fluorescencia de fluoróforos unidos a AuNRs en solución. Para esto se prepararon dos muestras: A) una incubando AuNRs de 85x22nm biotinilados con un exceso de fluoróforos (1:20) AlexaFluor546-estreptavidina, de modo de garantizar fluoróforos unidos a los AuNRs, y B) una muestra análoga pero en este caso los fluoróforos fueron AlexaFluor546-biotina, de modo que no se espera ningún tipo de interacción específica con los AuNRs.

En ambas muestras se interrogó la fluorescencia con excitación continua, a la vez que se encendía y apagaba el haz de calentamiento periódicamente, para ver si la fluorescencia en efecto se tornaba más débil debido al calentamiento local. En la figura 4.8 a) se muestra un resultado típico de las muestras de AuNRs marcados con fluoróforo. El decrecimiento de la emisión de fluorescencia con el haz de calentamiento es evidente. Como la temperatura en cualquier punto de la superficie de la NP aumenta proporcionalmente con la densidad de potencia del láser de calentamiento, se espera que al utilizar densidades de potencia mayores, el decrecimiento en la intensidad de fluorescencia emitida sea mayor. Esta dependencia se observa claramente en la figura 4.8 a) y 4.8 c) Se observa una saturación de aproximadamente un 60% de caída alcanzado a los 2000 kW/cm².

La reducción de intensidad de fluorescencia observada en este caso puede tener componentes reversibles como irreversibles (fotodegradación). A los términos prácticos del sensado, es irrelevante el mecanismo particular de reducción de fluorescencia, ya que al estar la muestra en solución y renovarse continuamente el volumen de observación, es posible modular la señal de forma reversible hasta la saturación (figura 4.8 b). En este caso la saturación estaría relacionada con el máximo de moléculas que pueden adherirse a la superficie de las NPs y cuya fluorescencia puede ser apagada. Por lo tanto una vez alcanzada la potencia que lleva al fotoblanqueo total de las NPs en el foco, las partículas libres no se apagarán aun cuando la potencia del NIR continúe aumentando, confirmando que estas no se ven afectadas por su radiación.

La especificidad del efecto en solución se puede cuantificar comparando la respuesta de la muestra con AuNRs marcado (específico) contra la de la muestra con fluoróforos libres en solución (no específico), bajo las mismas condiciones de excitación y calentamiento. El resultado se muestra en la figura 4.8 c), para varias potencias de calentamiento. Se observa una pequeña respuesta de la muestra no específica ante el encendido del láser de calentamiento, pero nunca mayor al 10%. La caída satura para potencias mayores a 3500 kW/cm² aproximadamente. Esto demuestra que la respuesta detectada en el caso A ante el encendido de NIR es debido al fotoblanqueo térmico principalmente de los fluoróforos adheridos específicamente a la superficie de las NPs, lo que permite cuantificar reacciones de bio-reconocimiento que ocurran en la superficie de la NPs. Comparando la dependencia de la señal específica y no específica con la densidad de potencia, se decidió trabajar a 600kW/cm² dado que la máxima separación entre ambas señales se encuentra a partir de esta potencia.

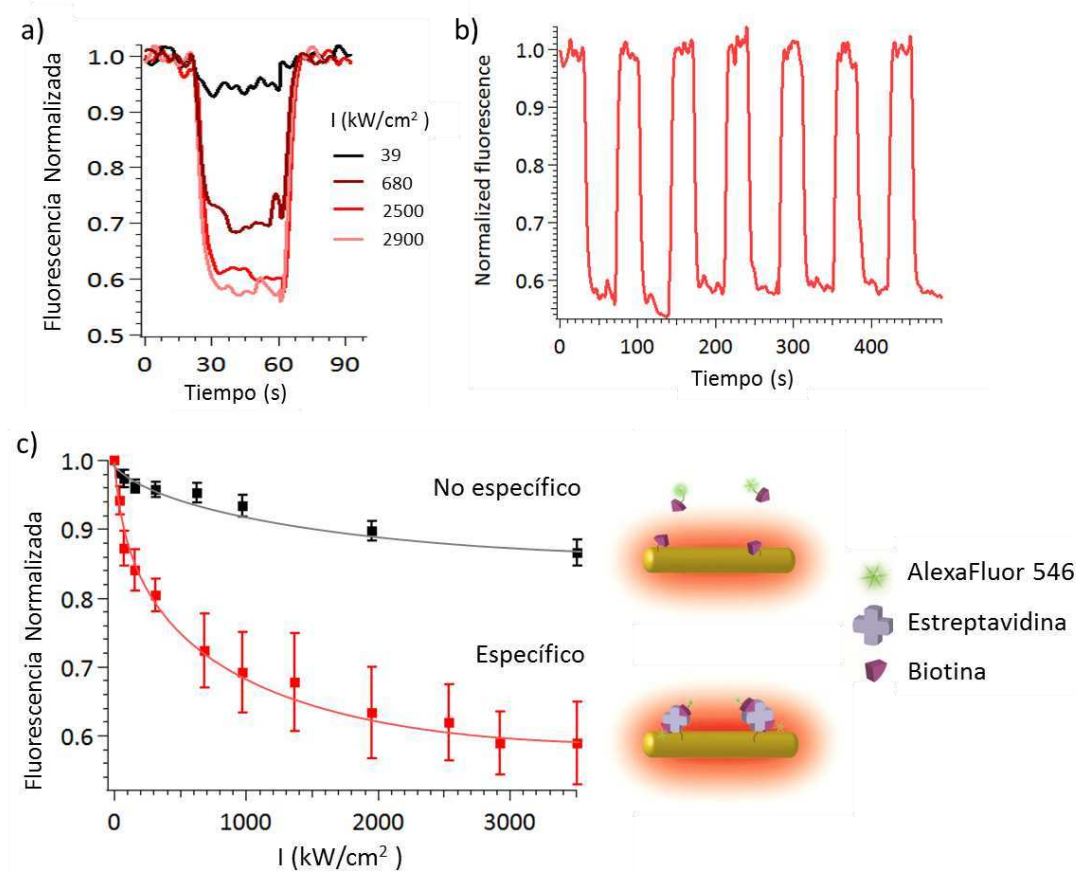


Figura 4.8 Reducción fototérmica de fluorescencia de AlexaFluor546 unida a AuNRs de: a) trazas temporales de la emisión de fluorescencia mostrando un período de iluminación con distintas irradiancias del haz de calentamiento. b) traza temporal de fluorescencia mostrando 6 ciclos de calentamiento modulado a 2500kW/cm². c) Intensidad de fluorescencia en función de la irradiancia del haz de calentamiento para una muestra con AlexaFluor546 unida específicamente a la superficie de los AuNRs (específica) y otra muestra de fluoróforos y AuNR ambos biotinilados (no específica). En esta última se espera que la AlexaFluor546 esté en solución o adherida inespecíficamente a la superficie de las AuNR. Las líneas sólidas son guías visuales.

4.6. Ensayo de biosensado sandwich

Una vez confirmado que es posible reducir específicamente la emisión de fluorescencia de moléculas unidas a los AuNRs, se estudió la aplicabilidad del fenómeno para la detección de biomoléculas en un ensayo tipo sándwich.

Como sistema modelos se utilizó estreptavidina como analito, y AuNR biotinilados y AlexaFluor546-biotina como marcadores. En ausencia de estreptavidina los fluoróforos permanecen en solución sin ser afectados por el calentamiento plasmónico al irradiar con luz NIR. Sin embargo en presencia del analito, al formarse el sándwich molecular biotina-estreptavidina-biotina, los fluoróforos quedarán en la vecindad de las NPs percibiendo el

campo de temperaturas y reflejándolo en una reducción de su intensidad de fluorescencia. Por lo tanto, al iluminar la muestra con luz NIR, sólo una fracción de fluoróforos es apagada, la cual depende de la concentración de estreptavidina presente. Cuantificando la reducción de fluorescencia es posible determinar la concentración de estreptavidina, previa calibración.

Es necesario definir las concentraciones de las entidades de reconocimiento (AuNR-biotina y AlexaFluor546-biotina) que se utilizarán, ya que de esto dependerá la sensibilidad y el rango dinámico del sensor. El punto óptimo será aquel, cuya relación de concentraciones favorezca la formación estequiométrica del sándwich. Luego variando ambos componentes pero conservando su relación, es posible aumentar el rango dinámico del sistema. Sin embargo, esto suele aumentar las señales no específicas empeorando el límite de detección.

En este tipo de sensores donde hay involucradas NPs debe tenerse en cuenta la cantidad de sitios activos (biotinas en este caso) disponibles por cada nanopartícula. Además, es posible que la afinidad de las moléculas de reconocimiento sobre la superficie de las NPs no sea la misma que en solución. Dado que la determinación de estas dos cantidades es dificultosa (materiales y métodos 4.8.3) o el error en la determinación suele ser muy grande, la concentración óptima de trabajo para el rango de analito a estudiar se determina prácticamente. A modo de ejemplo, y para estudiar 2 rangos de concentraciones y su sensibilidad en cada una de ellas, se analizó el desempeño dos ensayos con distintas concentraciones de AlexaFluor 546 (figura 4.9). En ambos ensayos se utilizó 1nM de AuNR, pero en el primero se agregaron 80nM de AlexaFluor 546, mientras que en el segundo solo 5nM. En el primer caso se observa que el rango de trabajo posible (antes de saturar) abarca concentraciones entre 2 y 6 nM. El segundo en cambio, al tener menos fluoróforo permite determinaciones de concentraciones de analito menores (mayor sensibilidad). Se consideró como límite de detección 0.4 nM de analito, sin embargo concentraciones menores aún pueden ser distinguidas del fondo.

Esto estaría indicando que, rediseñando el ensayo con unidades de reconocimiento específicas y distintas y utilizando un fluoróforo más sensible a la temperatura, es posible mejorar aún más la sensibilidad del sistema para detección subnanomolar. En particular, a través de un ensayo para determinar los sitios activos (ver materiales y métodos 4.6.3) se midió una cantidad de 15 ± 2 sitios para estreptavidina por AuNR, lo que indicaría una eficiencia de marcación baja. Incluso en estos ensayos los AuNRs parecerían saturarse con solo 10 sitios ocupados (4.9 a) se ve una saturación en 10nM para 1nM de AuNR), por lo que sintetizar AuNR con una mayor densidad de sitios activos podría mejorar esta respuesta, posibilitando un rango de medición más amplio.

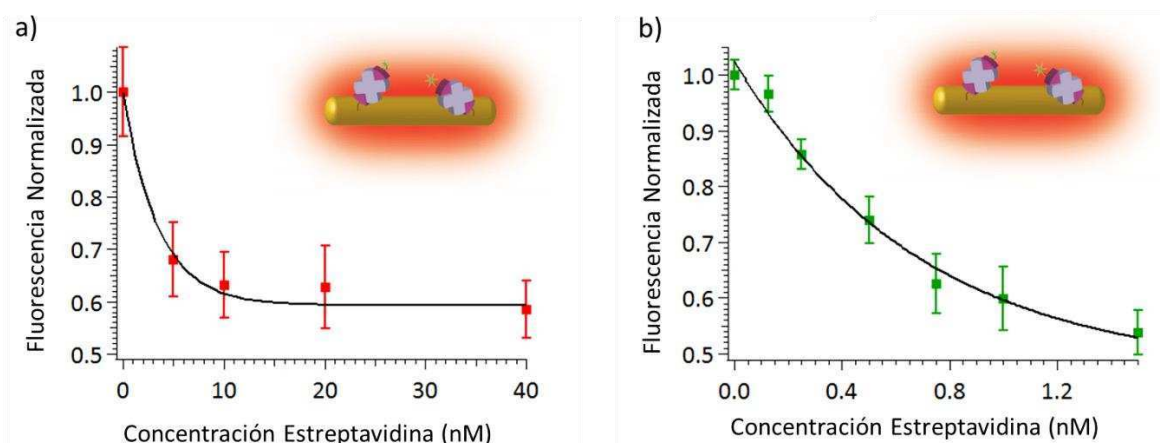


Figura 4.9 Ensayo sandwich basado en la reducción fototérmica de fluorescencia. Emisión de fluorescencia reducida con 600 kW/cm^2 de luz NIR en función de la concentración de estreptavidina para los ensayos compuestos por: a) 1 nM de AuNR-biotina + 80 nM AlexaFluor546-biotina y b) 1 nM AuNR-biotina + 5 nM AlexaFluor546-biotina. Las líneas son ajustes exponenciales del tipo: $y = y_0 + Ae^{-x/\theta}$. Los valores de θ (medida de la sensibilidad del ensayo) obtenidos en cada caso fueron a) 3.5 nM y b) 0.7 nM.

4.7. Conclusiones y Perspectivas

En este capítulo se demostró en primer lugar que es posible mediante el calentamiento plasmónico de AuNR en solución, reducir selectivamente la emisión de fluorescencia de moléculas adheridas a su superficie. Y en segundo lugar se demostró que combinando la posibilidad de generar un campo local de altas temperaturas, con la respuesta térmica de ciertas sondas fluorescentes es posible cuantificar reacciones que ocurren en la superficie de las NPs en un ensayo sándwich homogéneo.

Concentraciones subnanomolar pueden detectarse sin dificultad con este sistema puramente óptico. El grado de sensibilidad demostrado en estas pruebas es apto para la aplicación en ensayos para la detección de hormonas y proteínas de relevancia clínica.

Estos experimentos específicamente, fueron llevados a cabo a fin de estudiar la reducción de fluorescencia debida únicamente al efecto fototérmico. Sin embargo, utilizando fluoróforos cuya banda de emisión se encuentre superpuesta con la resonancia del plasmón transversal de las AuNRs, es posible obtener una reducción adicional debido a transferencia directa de energía al metal al formarse el sándwich, como se demostró con NPs esféricas²⁴. De esta forma al combinar ambas contribuciones (transferencia de energía al metal más efecto fototérmico) se podría obtener una sensibilidad mayor aún.

Queda pendiente también el desarrollo de nuevas nanopartículas con mayor eficiencia de marcación de anticuerpos, de manera de contar cada una de ellas con más sitios activos y así ampliar el rango dinámico del sensor.

Cabe destacar que la bibliografía disponible en cuanto a protocolos de marcación de proteínas y anticuerpos con fluoróforos y AuNP es sumamente amplia de manera que el método de sensado es fácilmente adaptable a la detección de numerosos analitos. Por otro lado, escogiendo el fluoróforo adecuado es posible utilizar nanopartículas de otras composiciones y formas, volviendo este método aún más versátil y con un amplio campo de aplicaciones.

4.8. Materiales y métodos

4.8.1. Preparación y análisis de muestras

Todas las soluciones utilizadas fueron preparadas en agua milliQ o filtradas previo a su uso.

Preparación de muestras para ensayos de prueba. Se preparó una solución de 20nM AlexaFluor 546-X (X: biotina o estreptavidina) y 1nM de AuNRs en buffer fosfato salino (PBS) 1X con 0.1% m/v de albúmina de suero bovino (BSA). Las soluciones se dejaron reaccionar por dos horas y luego se alicuotaron para llevar adelante las mediciones. La BSA se utiliza únicamente para evitar el pegado inespecífico de las proteínas en solución (el analito) al vidrio de la cubeta de medición.

Preparación de muestras para los ensayos tipo sandwich con estreptavidina. Se prepararon soluciones de 1nM de AuNR con diversas concentraciones de estreptavidina con 0.1% m/v BSA y se dejaron incubar toda la noche. Finalmente se agregó AlexaFluor 546-biotina concentración final 5nM y 80nM, dependiendo del experimento, y se dejó reaccionar dos horas más antes de tomar la alícuota correspondiente para ser medida.

Para determinar las concentraciones de los fluoróforos y nanopartículas se midieron los espectros de absorbancia en un espectrómetro UV-vis Cary Varian 50 UV-Vis, Agilent, y se utilizaron los datos de los coeficientes de extinción (E) facilitados por el fabricante, medidos en el máximo de emisión:

$$E_{532} = 81.000 \text{ cm}^{-1}M^{-1}$$

$$E_{546} = 112.000 \text{ cm}^{-1}M^{-1}$$

4.8.2. Descripción del Dispositivo experimental

Las mediciones fueron llevadas a cabo en un microscopio confocal de fluorescencia invertido, al que se le adicionó un láser para el calentamiento plasmónico (ver esquema en figura 4.3). Todas las mediciones se realizaron en solución, y se utilizó un portamuestra de múltiples cámaras (Hamamatsu) de 25ul cada una. Las cámaras fueron cubiertas con otro cubreobjetos de manera de evitar la evaporación durante la medición.

Para la excitación de fluorescencia se utilizó un láser Nd-Yag 532 (Coherent Compass 315M). Para el calentamiento plasmónico de las AuNRs se utilizó un láser CW Ti-Sa (KMLabs), fijado a 785nm de manera de concordar con la resonancia del plasmón longitudinal de las AuNRs. Ambos haces fueron combinados mediante espejos dicroicos apropiados y superpuestos en el plano focal del objetivo 40x del microscopio (Olympus ULPSAPO 40x, NA 0.9). La fluorescencia es colectada por el mismo objetivo y separada espectralmente de la excitación y del calentamiento por medio de espejos dicroicos y filtros pasabanda, y finalmente se enfoca en una fibra óptica multimodo que actúa como pinhole confocal. El volumen de detección está restringido a aproximadamente 2 femtolitros. Luego de la fibra, la fluorescencia es colimada y detectada con un tubo fotomultiplicador (Hamamatsu R928). La señal generada es enviada a un amplificador Lock in (Stanford SR830) cuya referencia está dada por un Chopper (Stanford SR540) que modula la excitación del haz a 3KHz. La intensidad de fluorescencia es adquirida en paralelo con la señal de iluminación del NIR en la PC.

4.8.3. Marcación y cuantificación de sitios activos por NP

Los siguientes ensayos se realizaron a fin de determinar la cantidad aproximada de biotinas (sitios activos) disponibles para la marcación con fluoróforo-estreptavidina por AuNR. Este dato no es informado por el proveedor de las nanopartículas (Nanopartz), como tampoco el protocolo de recubrimiento de las mismas.

Una forma de realizar esta determinación es preparando muestras con distintas relaciones de AuNR: AlexaFluor. Luego se separan por centrifugación las NP (ya marcadas) del exceso de fluoróforo y se mide su fluorescencia. De la diferencia entre la concentración inicial de fluoróforo y la final, es posible determinar la cantidad de sitios activos.

Con este objetivo se prepararon la siguiente serie de soluciones con el volumen total de muestra y control equivalente. A todas las muestras se le agregó BSA 0.1% m/v para evitar el pegado de la solución a las cubetas. Se abrevió la sonda AlexaFluor546-estreptavidina por AI-F STV.

Muestra i 100:3 . 40µl finales: 3nM AuNR + 100nM AI-F STV

Control i 100:3.: 40µl finales: AI-F STV 100nM

Muestra ii 50:1 . 40µl finales: 3nM AuNR + 150nM Al-F STV

Control ii 50:1.: 40µl finales: 150nM Al-F STV

Muestra iii 40:1 . 40µl finales: 5nM AuNR + 200nM Al-F STV

Control iii 40:1.: 40µl finales: 200nM Al-F STV

Muestra iv 400:3 . 40µl finales: 3nM AuNR + 400nM Al-F STV

Control iv 400:3.: 40µl finales: 400nM Al-F STV

Se las dejó reaccionar 2 horas en agitación en un termoagitador (Eppendorf Themomixer®) y se las centrifugó a 10kr_{cf} 20 minutos. El mismo procedimiento se aplicó tanto para las muestras como para los controles.

Para poder realizar una cuantificación sobre la medición de fluorescencia, se realizó una curva de calibración con soluciones de fluoróforo preparadas a concentraciones conocidas. Las mediciones se realizaron en un lector de placas Pherastar (BMG LabTech). Finalmente se mide la intensidad de fluorescencia del sobrenadante de cada muestra y sus controles. La diferencia de concentraciones entre el control y la muestra calculada, corresponderá a la concentración de fluoróforos que quedaron adheridos a los AuNR.

Finalmente se promediaron los valores medidos para cada muestra y se obtuvo un total de 15 ± 2 fluoróforos por AuNR. Los resultados se presentan en la tabla 4.1.

Muestra	Control [nM]	SN [nM]	Pellet[nM]	sitios por NP
i	105,7	65,4	40,4	13,5
ii	127,2	73,7	53,5	17,8
iii	197,8	102,5	95,3	15,9
iv	368,6	320,3	48,3	16,1
Promedio				15,8
Desvío std				2

Tabla 4.1 Resultados de estudio de determinación de sitios para estreptavidina por AuNR. Se presentan las concentraciones calculadas a partir de la señal de fluorescencia medida en cada muestra. Control refiere a la muestra control luego de procesarla, SN al sobrenadante de la muestra con AuNR y Pellet se calculó como la diferencia entre control y SN, correspondiendo a la concentración de fluoróforo perdida en el pellet.

5

Conclusiones y Perspectivas

Esta tesis se ha enfocado a estudiar en detalle distintos efectos surgidos como consecuencia de la interacción entre nanopartículas de oro y moléculas fluorescentes, en experimentos que combinan mediciones de fluorescencia al nivel moléculas y nanopartículas individuales, con modelado teórico.

En un primer estudio se logró demostrar que **el número total de fotones emitidos por un fluoróforo antes de fotoblanquearse puede ser controlado al modificar localmente, con la presencia de una nanopartícula metálica, la densidad de estados fotónicos**. Este estudio se realizó en colaboración con el grupo del Dr. Tinnefeld (Universidad Técnica de Braunschweig, Alemania) y permitió además establecer una nueva plataforma para estudios de interacciones a nivel nanométrico, como son los origamis de ADN. A partir de este trabajo se propusieron una serie de estudios a continuarse en Argentina en colaboración con el Dr. Tinnefeld y el Dr. Acuña con esta plataforma. Entre ellos, se diseñó un nuevo arreglo, similar al utilizado en esta tesis, pero que permita controlar también la orientación del fluoróforo. De esta manera, podría ser posible repetir los ensayos aquí presentados, pero con el control de un grado más de libertad, permitiendo analizar los efectos de las NPs y su orientación.

Se ha propuesto también diseñar un sistema para estudiar el efecto del calentamiento plasmónico sobre sondas ubicadas a distancias conocidas y controladas de una nanopartícula metálica, gracias al origami de ADN. De esta manera sería posible reproducir un perfil de temperaturas medido en escalas nanométricas. Este último punto se relaciona con el segundo fenómeno estudiado en el marco de esta tesis.

El otro mecanismo que se investigó para manipular la fluorescencia molecular consistió en modular la respuesta de un fluoróforo mediante campos locales de alta temperatura generados por una nanopartícula metálica. Se demostró que **la intensidad de fluorescencia de moléculas en la vecindad nanométrica de una nanopartícula metálica puede modularse cuando esta se ilumina con radiación sintonizada con su resonancia plasmónica**. Se estudió la aplicación de este efecto tanto para el desarrollo de sondas modulables de mayor contraste en microscopía de fluorescencia, y de biosensores homogéneos de gran sensibilidad. Para el caso de las sondas modulables se encontró que ninguno de los dos fluoróforos estudiados reúne las características necesarias para proveer una mejora de contraste destacable. En cambio en la aplicación en biosensores, sí

se logró demostrar sensibilidad sub-nanomolar, usando el bio-reconocimiento modelo de bitoina-estreptavidina, en un ensayo homogéneo puramente óptico.

En todos los casos, los experimentos fueron apoyados por cálculos y simulaciones. Lo cual permitió profundizar el conocimiento sobre los fenómenos observados y diagramar estudios futuros con nuevos parámetros. Por ejemplo en el caso del incremento de fotones de fluorescencia, los cálculos motivaron el desarrollo de un nuevo diseño de origami de ADN con fluoróforos con orientaciones fijas.

En el caso del método de biosensado, las estimaciones indican que es posible obtener un sensor por calentamiento plasmónico con sensibilidad picomolar, y esto ha dado lugar a una patente nacional y ha despertado el interés de varios laboratorios de ensayos clínicos, con los que actualmente se está dando marco a una colaboración. En este contexto se están planeando nuevos ensayos para la detección de ferritina y con una sonda más termolábil que AlexaFluor, buscando mejorar aún más la resolución obtenida.

En líneas generales, este trabajo no solo ha permitido el estudio detallado de dos efectos producidos por la interacción de nanopartículas y fluoróforos, sino que además ha permitido generar el marco para el desarrollo de nuevos estudios y la continuidad de los experimentos en el grupo de investigación.

Apéndice

Lista de grampas modificadas y sin modificar del 5' al 3' el origami de ADN pilar. La estructura fuer armada a partir del ADN p8643.

GATTTAATTCCTGTCCTGAATGTTTAT	27	
TAATGCCCATGAAAATCACCGTACTCAG	28	
CTAACGGAACAACAAGTGCCATGAAACATCTGACGTACATAC	42	
GAGTGGAAGATTGTTAAAAACATTAACAAACCCTCAGGGTTCGTTA	47	
AAATAAAGTTAAGGAACAAGGCTCTGACAACTTAAAGGTTTT	42	
GGTTGAGGCAGGTATGATACTGTACCGCCACCCTCATTTTC	41	
TTAAATTAAGCCCCGAGGTCAGTACGGT	28	
AGGCACCGAGGAAGTATCACCTCGATAG	28	
AGGCACTGAACGAACGTGGACTCCAACGCAGGCGCAGACAT	42	
ACCTGGAAGTGTTTCGCCTGGAAGCGATTGA	31	
GAGCAAGAAACATTGCTGAGTGTTAGCTGGTTCAGTCA	40	
CATGGTGTGGCAAATCA	18	
AGAGCCAGCCGCCAGAATAGATTGTCGT	28	
TTAACGTGGTGAATCGGTTTATTGCGCAACGAGGCGCAGAC	42	
AGGCAAGATTAGTCACAGCGGCAGAACCAGTAACGAAA	38	
GCGGATAAGTGCGGGGTTT	19	
AGAGGGTAGAGCCATAAACACTGACGTTATTTTCAGCAATT	39	
ATGGCAATATACATATTTAAGGGCTTA	27	
TACAGACCAGGCGCCGATTGTGCGCAACTGGGGTCACCGCCAGCCATTG	49	
AAAGGTGATAAAGCGGAGAAGCCTTTATAAAAGGGTGAT	39	
TTTAAACTATTATATTTTCATCATTGCA	28	
AGTGAATAAGGCTTATTGTTGAATGCATATAAACAATGAAAT	42	
GAGTTAACACGAAGTACCGTTGCGGCAGAACGTAA	35	
AATAAGTTTTATTTTATTACGGTTATCTGGCCTGGGCGCTGAG	42	
AAATACCCCACTACCTGAGAAGAGTCGGAGCGCTAATATCA	42	
AATTCTTCGTTAAAATGATGATCAATAT	28	
AATCTACGTTAATACATTCACAGGGAAAAAAGGAGTATGTTA	42	
TTATTTAAAGTACGCCTGTT	20	
AATATGCCGCAATTTCTAGCTGAGAAAGGCCGGATTTTGCGTAAATCG	49	
TTTCCGCGTTTCCTGGATCCCTTGAAGC	28	
TCCTGATTTAGGTAATTTAGTAAAGCC	28	
TTGCAGACGACACCACCAATCACTCGGTCAAAGGCCGGGAA	42	
TATTAAGCGGAAGTGTAGAACGACGAC	28	
CAGCACCTAGCGTCGCCACGAAATCTC	28	
TGATATTAAGCGTCGTACCAGAACCGC	28	
GTCTGGAGTTTGACCGGAGAGGTAGGTA	28	
GCAAGCCAATAATAGGAATTAATATAA	28	

ATTATCGGGACAGATGAATTCATCTCATCATGAAGTATGCCG	42	
AACAGTGAGACTCCAGTATAGCCCGGAAACCCTCAGTAC	39	
ATCAGTAAAGTTGCTGAGTGTGTTCCAAATCCCTGGCGTTA	42	
TAGTAAGGTTAAATCAGTTTGTAGGTCA	28	
AAACAGTCTTAGATCTACCTTTTTAACCACTTTTTAATA	39	
ATAAGCAACAGCCTCTTAGACGGATTAATCGGACAAAA	38	
CATTTTAATTACTGCAAATCCAATCGTAACTATATGT	37	
TCCTTATTACGCAGAGTGAGAACGATACCAGCTGCCATTAA	42	
CTTCATCTCCATGAGCGCCGCATCACAAAAACGCTCATGG	42	
GTAATCGTCAACCGGGTCAATGAGCTGA	28	
CACCCTCTGATATATCAAGAGAAGGATTTTCAGTGCCTT	39	
TTACGCCAAAAACAAGATAAATGCACAATTCTGCTGAA	38	
AAATACCGAACGAAGAAACCTGGGAAGATTATTCGAAACGAA	42	
GGGAGGGGGTGAATTTCCATAGGCTTG	28	
AACGATCCTACAACTTTACCGAAACAGT	28	
ATGCAGAAACATGTTTAACTGAAACAA	28	
AAAAGAATCGATCAGAATTTGTTATTCCTGTAATGGGAAGGG	42	
AACCCTCGTTTTGCGTATCGGGGCGGAT	28	
TCCCTCACTCAGAGGGAATTGTTAGCGT	28	
AGAAACGCAAAGACGGGTTTCATCGCACTAGCTAACACACCGC	42	
GCAGCCTCAAATTCTTGTGACGCGACCCATAAGGGAACCGA	42	
CGAGAAACACCAGAACCAGGCTGACGCAATTATCTTACCGAA	42	
CGAGAAATCCGGCTAAACATAGCGATAGACATAAAAAC	38	
GAATCTTTACGGCGCATTACGCGTATTGCCCCAGCGATTAT	42	
TACAAACAAGGAGCTCCCATCTCAGCTA	28	
TAAGAACTGGCTCAGAAAGATCAAACGCAAATGCTTACCCAA	42	
GTTAAACAGATAATGGATCATTTTTCTTTGATCTAAACTGG	42	
TGACCGTAGCCAGCGTCAGAAAAAGCGA	28	
TACCGCAACGAGCAAAAGAAAATTATAC	28	
CAGAAGATAAAACACACTGCCGCGCTAGACGGCCTTATTAC	42	
AATAGTATAAGCAACAAGGATAAAAATTGTAATGTGGTAGCTTGA	45	
CATCACGAGGAGCGCGCTTTCTATAGATATTTATCCCAATCC	42	
TTAATTCGGATGGCGTTGATAATGAACG	28	
AGCAATAGCTATCTTACTGTTTAGATATGAGTTGCAAAGGGA	42	
CAACTAATGCAGATGCAAGGCGAGTAAGCATCGCTGTCACAA	42	
CGAGAGGCACTCCAGGATTCT	21	
CTTTTCATAATCAAGAGCCGTCAACAGGTAAATG	34	
CACGACCAGTAATAAGCAAGCTATCAGGGCCACTCGCCCTGA	42	
AGTCAGGACGTTGGACCAACACGAGGATTGTAATAAAGAC	42	
GAATCAGAGCGGGACGACACAGAGGGCAAATGC	34	
AAGAACGAATAATCAACATTAAGGGTTAGAACCT	34	
CGCGACCTTGAGCTAGCTTTAAAGCGAACAATTAACCGTTG	42	
CGTTGGTATTCGCGATCAAAATCGCGTT	28	
GCAAAATGTAGCATAGATTTAAGTTTCAGCTCCTTCGGA	39	
TGACCCGTTAAACGAAGCACTAAAACACTCAAGCAACGCAAAAT	44	

TGCGGGAAGTTGCGGGCATTTCGGAACC	28	
GCAAACGTAGAAAACCTGGCATCAAAACACAGTCGGCCACCAG	42	
TAACCTGAACACCCTGTTTATAATGACCGACACCATATAGGCTGGCTGAC	49	
GTGAATTACCTTATATTCAGCGGAAAGACTTCACAGGAAACG	42	
CATTGAAGGATTGCTCTGGCCAATCAGCT	29	
CAGGCTACAGCCTCAGCAGCGAAACTTAAACCTTATT	37	
AATAAACCATTTTTCAAATTGCGATTGCT	28	
GTTGTACGGGGCGCAACCTGTCTCAACATTAA	32	
CCAAATCAGCAGGCTGAGTGTGGCGAAACTGAAATGGAT	39	
TTTAACTAAATTTTTGCGAGCTTCGCAAAGCTCCCCCTGGTA	42	
GCTTCTGAAGATCGCTTTTGCAAACGAGAATGAC	35	
AAAGAGGACAGATGATGAACGATCAGAACACTAAAGGTAA	40	
AGGACCAGTAGCAGAGGAACATGTCTAATTTCTCATCGTAGA	42	
CATTCTGGCCAACAGCCTGGCCGTGAACCTGAACCACGAGTA	42	
AAAATCATAGGTCTTAATTTTGAAATAAACAGTACAA	37	
CATTTTTACCCCGTTAGAGCTGTTTTA	27	
AAGAACTGGCATGAGATAACGATTATCACAAACGCGACTGATA	42	
AGTACCGCAAATAATCAGGT	20	
TAGCCGGTAACAGTCCTCATGTGGCGAGACTTCTTTGATTAG	42	
AAATAAGCTCTGTATCGCATCCTGCGTGTGCTCCATGTTACT	42	
ACCATATGCGTAATAAGGTCCAGAACCAATCGGTATTATAAG	42	
GTAAATTGGGCTTGTAATAATATTGGTATACTCAAAGTAAGCAGATAG	49	
CGATAGAGCGTGAATAGCTGA	21	
TAATTCTAGAATATGCACGTAACAAAATCGCGC	33	
ACATATCAAAATTGTTACACGTATGGTGGCGCTATCAT	38	
GGTCAATAGGAGAAGTTCAGGGACGGGGATCACTTGCCTGAG	42	
AATTTTCGAACCCAAGGAGT	20	
TGCCAGTACAATCCGGATGCACAGCGTGATTTGTATCATCGC	42	
ACCGTGAAGGGATGGGCGGCATACGATTTTATGTACAATTTTATCCT	48	
CATAACCTAATTCTTGTGGCGATCAACGTGC	31	
TCTTTGACTAAACTAAGGGGGCGCTACATTTAGACAGGAACG	42	
TCAATCACCTCACACAATACTATGACGCCAGCGAGGCA	38	
ATATGTTAACCACAAAAAATAGTAGAT	25	
GCCCTAAAACATCGATTAATGGCGAACGCGTATTAGAAGAAA	42	
CAATAATAACGGAAGAATTTCTGACTGATTGCGTACTATTAG	42	
AACGGAGGTTTCGGGTACTGGTGACCATCCTGACTACGA	38	
TTGAATTACCTTTTATTA	18	
CTAAAGCATAGATACCGCGCTTTTCAT	28	
CACCGAGGGCAAGTAATTGCGTTACATATACAAAATAAACAG	42	
GACAGCTAAATGACGAGTCCGCTCACTTCCGAGTTGCT	38	
CATTACCATTAGCTAGCCCCAGCTTGATCGGTTT	34	
GCCCTTTTTAAGAAACATCGGAATATTCCTTCACCGAGATAG	42	
CCTCAAAACTAATATCAGATAAGAACAA	28	
AGTCACAAACCCTCAGACCACCGGAGCGCGTGAAACCAGTCA	42	
CAAGAACGGGGATTTATATCTGCGATGGTACATTTTGACGCT	42	

AGGTAGAAAGATTCCGACGTTCAACGAGGGTGAGTATATAAA	42	
CTGCAACAGTGCCAGTGCCTAACCACCATTGGGTACCACATT	42	
AAGATTCTTCAACGTAAAGCCTCAGAGCGCATCAATACA	39	
ACCGCCAGCATTCCCTCATAGCGAATAA	28	
CAGGGAGAACCATCAGACTGTAACCGCC	28	
GGGCGACACTTGAGAAAGACTCCGCTTT	28	
ACCAGACTTGATAAAAAAACACTGGAGC	28	
TCTTTAATGCGCGACGGGAGAGAGCTTGATTAATTTATACC	42	
CAACAGGCAAATCAGATTGCCATGAAGGAACAAAGTCAGAG	42	
CATTGCCATTTTTGAACGAGTTAACATCCAATAA	34	
GAGGCAAGAGGACTCCATTTGAAAACGT	28	
ATTTTGCAAGCAAAGATTAGATAGACTT	28	
CTGATAACAAAACGTAAAACGGGCGCTTAAAAGAGTCTGTC	42	
CCGTGGGAATGTGAGTCTTTAAAACCCAACAGG	34	
ATGTGAGTCCTTGATAGGTTGGGTTATACAAGACAAAAC	39	
ATAAAGGTGGCAACATCTGCACCCAATATTGCGCTGAGGTGA	42	
GGTAATTGCATACAGTTGAGTGACCTTTAAGAGTAATCTTGA	42	
ACTGACCAATACATGGCAGACGGAGCCCACTCAAACATATCGG	42	
TAGTATCGGAATCACAATTACCCTTGCTTCTGT	33	
GCGGTCAGTATTATCACATTGTAGCGGCCAGTCAATCAGTT	42	
AACCCTTCTGACCTAACAGCTAGTTTTTACAGCAAAGATGGT	42	
CGAGGAAAGCGTAACTAATATGGTTTACCAGGAGC	35	
CCGATTCAACAGTTTCTGGAGAATGTGTGAACCCTCAA	38	
AGCCAGCAGCAAATGCATAAAAAATGCGCATGTGCTACATAACGCCAAAA	49	
GAGATTTAGGAATAACGCCAGCGAAGGTGGTCAATACCACGG	42	
CCATATTGATTAAATATGATGGCAAATATTGTGTCGAAATC	42	
TCTGCGAGAGATCAATGCAATGCCTGATTTAGAAAAGAAATTA	41	
AGTTTTAACGGGGAGGATTAGCCGTCG	27	
GTAATACGACAGTCATGATATTAATAA	26	
AGTTAAAGCCCGCCACCGAGCCGC	24	
TGAATGGTTGGGCGCCTAAAGATCATTGGCGATT	35	
AAACTTCGCTGTAGATTTGTTGGCCACCAGAATTCGAACTA	43	
TTGAATAAAAAGAAGTAAGAATAAGAACG	28	
ACGTTGACATAACCGTCGCTGTAACGGG	29	
AACGGAGAGTATTAGGTTTTCTCACGCTATAATCAGTGAGGC	42	
TGTTTTGCGCGTAATGAGTGCGCGGGTCCAGAGCCTAATT	42	
ATTGTTGCTTCAGGAGGCCGATTACATCTGCGTTTAGAAAATATT	45	
CAAAAAAACTAAACCACCACAAATAAA	28	
TTTTACACATTTAAATGGTTCATCTTC	27	
CAATCGTAACCGTCGGTCCACTGTAGATAACCCACAAGAATT	42	
AACGCTCCCGACCGAAACAAATTAATGG	28	
ATTGAGGTTTTAGTCATTCC	20	
TCAATAGAAAATTCTCGACATGGTTTTGGCCGGAAGAAAAAT	42	
TAAACGGAATCAAGATGTGATACAAATAT	28	
TTGTCAAATAAGATTAATCGTCATCTGGATAGGAATTACTGG	42	

CACCAATTTTCATCCCGACAACAAAAGG	28	
CTTAAATCTTATCCTAGGAGCCAACTCG	28	
GCGTCTTATTTATTGGTTGGAGTTATCTGCGAAACAAAGTAC	42	
AACCGCCTAGGTGTGTATTAAGAGGCTGCCCGTATTTCC	39	
ATTCATGCCCCAGTCAAAGGGCGATCCTCATT	33	
ACCAAGCCGGATGGGATTAAGCACCCGCAGAATCCTGAGAAG	42	
TCACATAGCTCGGAAACCAACTGTAGACGACGATAAAA	38	
AGCCCTGACAGTTCAGAAAAGAAGTTT	28	
TAGCAATAAAGGAAGTCGTGCTTGCCCTAACGATTTTTTGT	42	
TTAATTTCAACTTTAATTACAGCTGGAATGTAGTGAAGTTACCAGAAGG	49	
ATCAGCTACAACCTCCGCCA	20	
TAATAACAAAGCCGAATCGGCCGAGTACCAAAAATGAAAATA	42	
GTACGCCCGCGCTTGTGTA AAAACTCGACCAACGCTAACGA	42	
TTCTGAAAATAAAGGAGCCAGTTATACA	28	
CTTTCCAGAGTTTCATACATGCTTGAGT	28	
AATATTTTGTATAATTTAATTTTCCATATAACAG	34	
AAACAAGTTAATGCCATTAGATTCTACT	28	
AGCCTTTGGAGTGACCAGA ACTTGGCCT	28	
TAGAAGACCGATTTAGGCGGTTACCGTGTTACAGAGAGAATA	42	
CGCCACGCGCCCAAGAAAGTTTTACAATAGCACCCAGCGAGA	43	
ATTTTAGTGAGAGATAAGACGCTGAGAAGAGTCA	34	
GTATACCGATTTCGTCACAGGCTTTAAGAATATCCGTGACGCT	42	
GAGAGATGAAGGTATCTTTACGACGACTCGGATATTCATTAC	42	
TCAATATATATCTTGGTATTCAACCAAG	28	
TCCTCATCTCTGAAGCCTGTACCCTCAG	28	
TCGGCAAGTTTGGATGTCGGA CTGTGCAACAGAGTCAATGAGTTAGA	48	
CCTTGCTTCGGAACCCAGGGTCAATGTGAACAGGGAAGCGCA	42	
CCGAACATCAGATGAGTCTAAGACGGGCGAAAGCG	35	
AAACCGAGCGATGCCATTCTGGGTTTTTACAGACAATATTTT	42	
TTAGACGAAATCCCCAGAGTCTGCTGGAACGGTG	35	
ACATAAACGAGAAAGCGTCGTAACCCAGCAACTTTG	35	
TAAGAATACGTGGCCTTTTACGTAAGATAGAAGAATCATT	42	
TATCCAGAACAATATTGAGGTGCCAGTGATGAAGACGGAGAAT	44	
AAGTGAGTCAGGGTACAAGAG	21	
TTTATAATGTGCAGTCCGAAA	21	
AACGACACTCCATGAAAATCC	21	
TGGTCGTCGAAATTCAAGGAG	21	
TCCACTATGGTGGTATCCGGTGTCTTGTTACATTGAACTCTC	42	
TCAATGTATGAGTAAGGTTCCG	21	
ATACGTAATGCCGGAAGACGGCTGCGCAGGCAACGGCACC	40	5' Biotin
GAATCAAGTTTGCCTTGTAAATCACATTA AAAAGGTAACTGCACCGAGCT	50	5' Biotin
ATCAAAAATCAGGGCAGTAAAACGTT	26	5' Biotin
ACCTATTATTCTGAAACCTGCCGCGC	27	5' Biotin
CGCTATTAATTAATTTTCCCTTAGAATGAATAACTGAGCACCAA	44	5' Biotin
AACCTCCCGACTTGCGGCGAGGCGAAGGTTCCCGAACGTTATT	43	5' Biotin

CAGGCAAGGCAACCCTCA	18	5' Biotin
AAAAGTTTGAGTGGCTGTCGGTAAAG	26	5' Biotin
TGTTTGATTAAGAAGACGCC	21	dyemod

Acrónimos

ε	<i>permitividad</i>
σ_{abs}	<i>sección eficaz de absorción</i>
σ_{ext}	<i>sección eficaz de extinción</i>
σ_{sca}	<i>sección eficaz de dispersión</i>
τ	<i>tiempo de decaimiento</i>
I	<i>irradiancia</i>
k_{exc}	<i>tasa de excitación</i>
k_{nr}	<i>tasa de decaimiento no radiativo</i>
k_r	<i>tasa de decaimiento radiativo</i>
Q	<i>potencia de calentamiento</i>
Q_r	<i>eficiencia cuántica de fluorescencia</i>
R_{eq}	<i>radio equivalente</i>
ADN	<i>ácido desoxirribonucleico</i>
APD	<i>fotodiodo de avalancha</i>
AuNP	<i>nanopartícula de oro</i>
AuNR	<i>nanocilindro de oro</i>
BSA	<i>albúmina de suero bobino</i>
Cy5	<i>cianina 5</i>
eq.	<i>ecuación</i>
FDTD	<i>método de diferencias finitas</i>
FWHM	<i>ancho a media altura</i>
IRF	<i>función respuesta del instrumental</i>
LSPR	<i>plasmón superficial localizado</i>
NA	<i>apertura numérica</i>
NIR	<i>Infrarrojo cercano</i>
NP	<i>nanopartícula</i>
NR	<i>nanocilindro</i>
O.D.	<i>densidad óptica</i>
PBS	<i>buffer fosfato salino</i>
PMT	<i>fotomultiplicador</i>
PSF	<i>función dispersión de punto</i>
TCSPC	<i>conteo de fotones correlacionados en el tiempo</i>

Bibliografía

1. Jabłoński, A. (1898-1980). Decay of Photoluminescence of Solutions. (1957). at <http://www.kpbc.ukw.edu.pl/dlibra/plain-content?id=38179>
2. Förster, T. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann. Phys.* **437**, 55–75 (1948).
3. Tawde, N. R. & Ramanathan, N. Fluorescence of Dyestuff Solutions: Viscosity and Temperature Effects. *Proc. Phys. Soc. Sect. B* **65**, 33–40 (2002).
4. Jenness, J. Effect of Temperature Upon the Fluorescence of some Organic Solutions. *Phys. Rev.* **34**, 1275–1285 (1929).
5. Lakowicz, J. R. Radiative decay engineering: biophysical and biomedical applications. *Anal. Biochem.* **298**, 1–24 (2001).
6. Jian Zhang, Yi Fu, Mustafa H. Chowdhury, and J. R. L. Single-Molecule Studies on Fluorescently Labeled Silver Particles: Effects of Particle Size. *NIH Public Access* **29**, 997–1003 (2012).
7. Ha, T. & Tinnefeld, P. Photophysics of fluorescent probes for single-molecule biophysics and super-resolution imaging. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **63**, 595–617 (2012).
8. Fernández-Suárez, M. & Ting, A. Y. Fluorescent probes for super-resolution imaging in living cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 929–43 (2008).
9. Nagano, T. Development of fluorescent probes for bioimaging applications. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.* **86**, 837–47 (2010).
10. Jares-Erijman, E. A. & Jovin, T. M. FRET imaging. *Nat. Biotechnol.* **21**, 1387–95 (2003).
11. Valeur, B. *Molecular Fluorescence*. (Wiley-VCH Verlag GmbH, 2002).
12. Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. (2006).
13. Jablonski, A. E. *et al.* Optically Modulatable Blue Fluorescent Proteins. (2013).
14. K. H. Drexhage. INFLUENCE OF A DIELECTRIC INTERFACE ON FLUORESCENCE DECAY TIME. *J. Lumin.* 693–701 (1970). at http://turroserver.chem.columbia.edu/surfaceplasmons/pdf/47_BAPS_14_873_1969_DrexhageFluorodecay.pdf
15. Persson, B. N. J. Theory of the damping of excited molecules located above a metal surface. *J. Phys. C Solid State Phys.* **11**, 4251–4269 (1978).
16. Dulkeith, E. *et al.* Fluorescence quenching of dye molecules near gold nanoparticles: radiative and nonradiative effects. *Phys. Rev. Lett.* **89**, 203002 (2002).

17. Enderlein, J. Single-molecule fluorescence near a metal layer. *Chem. Phys.* **247**, 1–9 (1999).
18. Ford, G. W. & Weber, W. H. Electromagnetic effects on a molecule at a metal surface. *Surf. Sci.* **109**, 451–481 (1981).
19. Stiles, P. L., Dieringer, J. A., Shah, N. C. & Van Duyne, R. P. Surface-enhanced Raman spectroscopy. *Annu. Rev. Anal. Chem. (Palo Alto, Calif.)* **1**, 601–26 (2008).
20. Schlücker, S. Surface-enhanced Raman spectroscopy: concepts and chemical applications. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **53**, 4756–95 (2014).
21. Anger, P., Bharadwaj, P. & Novotny, L. Enhancement and quenching of single-molecule fluorescence. *Phys. Rev. Lett.* **96**, 113002 (2006).
22. Bharadwaj, P., Novotny, L., Bharadwaj, P. & Novotny, L. Spectral dependence of single molecule fluorescence enhancement. *Opt. Express* **15**, 14266 (2007).
23. Taminiau, T. H., Stefani, F. D. & van Hulst, N. F. Optical nanorod antennas modeled as cavities for dipolar emitters: evolution of sub- and super-radiant modes. *Nano Lett.* **11**, 1020–4 (2011).
24. Mayilo, S. *et al.* Long-range fluorescence quenching by gold nanoparticles in a sandwich immunoassay for cardiac troponin T. *Nano Lett.* **9**, 4558–63 (2009).
25. Doria, G. *et al.* Noble metal nanoparticles for biosensing applications. *Sensors* **12**, 1657–1687 (2012).
26. Rodríguez-Lorenzo, L., de la Rica, R., Álvarez-Puebla, R. A., Liz-Marzán, L. M. & Stevens, M. M. Plasmonic nanosensors with inverse sensitivity by means of enzyme-guided crystal growth. *Nat. Mater.* **11**, 604–7 (2012).
27. Thompson, R. B. Fluorescence Sensors and Biosensors - CRC Press Book. at <<http://www.crcpress.com/product/isbn/9780824727376>>
28. Novotny, L. & van Hulst, N. Antennas for light. *Nat. Photonics* **5**, 83–90 (2011).
29. Balzarotti, F. & Stefani, F. D. Plasmonics meets far-field optical nanoscopy. *ACS Nano* **6**, 4580–4 (2012).
30. Huang, X., El-Sayed, I. H., Qian, W. & El-Sayed, M. A. Cancer cell imaging and photothermal therapy in the near-infrared region by using gold nanorods. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 2115–20 (2006).
31. Huang, X., Jain, P. K., El-Sayed, I. H. & El-Sayed, M. a. Gold nanoparticles: interesting optical properties and recent applications in cancer diagnostics and therapy. *Nanomedicine* **2**, 681–693 (2007).
32. Pollert, E. *et al.* Search of new core materials for magnetic fluid hyperthermia: Preliminary chemical and physical issues. *Prog. Solid State Chem.* **37**, 1–14 (2009).

33. Principles of Fluorescence Spectroscopy. at <http://www.springer.com/chemistry/analytical+chemistry/book/978-0-387-31278-1>
34. Stefani, F. D. *et al.* Photonic mode density effects on single-molecule fluorescence blinking. *New J. Phys.* **9**, 21–21 (2007).
35. Holzmeister, P. *et al.* Quantum yield and excitation rate of single molecules close to metallic nanostructures. *Nat. Commun.* **5**, 5356 (2014).
36. Plakhotnik, T., Donley, E. A. & Wild, U. P. Single-molecule spectroscopy. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **48**, 181–212 (1997).
37. O'Connor, D. V. & Phillips, D. *Time-correlated single photon counting*. 288 (Academic Press, 1984). at http://books.google.com.ar/books/about/Time_correlated_single_photon_counting.html?id=sDvAAAAMAAJ&pgis=1
38. Bollinger, L. M. & Thomas, G. E. Measurement of the Time Dependence of Scintillation Intensity by a Delayed-Coincidence Method. *Rev. Sci. Instrum.* **32**, 1044 (1961).
39. Stefani, F. D. Confocal microscopy applied to the study of single entity fluorescence and light scattering. *PhD thesis* (Johannes Gutenberg Universität Mainz, 2004).
40. Song, L., Hennink, E. J., Young, I. T. & Tanke, H. J. Photobleaching kinetics of fluorescein in quantitative fluorescence microscopy. *Biophys. J.* **68**, 2588–600 (1995).
41. Leung, B. O. & Chou, K. C. Review of super - Resolution fluorescence microscopy for biology. *Appl. Spectrosc.* **65**, 967–980 (2011).
42. Sprague, B. L., Pego, R. L., Stavreva, D. A. & McNally, J. G. Analysis of binding reactions by fluorescence recovery after photobleaching. *Biophys. J.* **86**, 3473–95 (2004).
43. Meyvis, T. K., De Smedt, S. C., Van Oostveldt, P. & Demeester, J. Fluorescence recovery after photobleaching: a versatile tool for mobility and interaction measurements in pharmaceutical research. *Pharm. Res.* **16**, 1153–62 (1999).
44. Axelrod, D., Koppel, D. E., Schlessinger, J., Elson, E. & Webb, W. W. Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. *Biophys. J.* **16**, 1055–69 (1976).
45. Peters, R., Brünger, A. & Schulten, K. Continuous fluorescence microphotolysis: A sensitive method for study of diffusion processes in single cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **78**, 962–6 (1981).
46. Mayer, K. M. & Hafner, J. H. Localized surface plasmon resonance sensors. *Chem. Rev.* **111**, 3828–57 (2011).
47. Weil, T., Abdalla, M. a, Jatzke, C., Hengstler, J. & Müllen, K. Water-soluble rylene dyes as high-performance colorants for the staining of cells. *Biomacromolecules* **6**, 68–79 (2005).

48. Suppan, P. Invited review solvatochromic shifts: The influence of the medium on the energy of electronic states. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **50**, 293–330 (1990).
49. Schulman, S. G. pH dependence of fluorescence of riboflavin and related isoalloxazine derivatives. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **44**, 23–631 (1971).
50. Haidekker, M. A., Brady, T. P., Lichlyter, D. & Theodorakis, E. A. A ratiometric fluorescent viscosity sensor. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 398–9 (2006).
51. K. H. Drexhage. *Dye Lasers*. **1**, (Springer Berlin Heidelberg, 1973).
52. Jenness, J. Effect of temperature upon the fluorescence of some organic solutions. *Phys. Rev.* **34**, 1275–85 (1929).
53. Lou, J., Finegan, T. M., Mohsen, P., Hatton, T. A. & Laibinis, P. E. Fluorescence-Based Thermometry: Principles and Applications. *Rev. Anal. Chem.* **18**, (1999).
54. Tawde, N. R. & Ramanathan, N. Fluorescence of Dyestuff Solutions: Viscosity and Temperature Effects. *Proc. Phys. Soc. Sect. B* **65**, 33–40 (1952).
55. Marras, S. a E. Selection of fluorophore and quencher pairs for fluorescent nucleic acid hybridization probes. *Methods Mol. Biol.* **335**, 3–16 (2006).
56. Faraday, M. Experimental Relations of Gold (and Other Metals) to Light. *Philos. Trans. R. Soc. London* **147**, 145–181 (1857).
57. Pham, T., Jackson, J. B., Halas, N. J. & Lee, T. R. Preparation and Characterization of Gold Nanoshells Coated with Self-Assembled Monolayers. *Society* 4915–4920 (2002).
58. Oldenburg, S. ., Averitt, R. ., Westcott, S. . & Halas, N. . Nanoengineering of optical resonances. *Chem. Phys. Lett.* **288**, 243–247 (1998).
59. Lal, S. *et al.* Tailoring plasmonic substrates for surface enhanced spectroscopies. *Chem. Soc. Rev.* 898–911 (2008). doi:10.1039/b705969h
60. Myroshnychenko, V. *et al.* Modeling the Optical Response of Highly Faceted Metal Nanoparticles with a Fully 3D Boundary Element Method. *Adv. Mater.* **20**, 4288–4293 (2008).
61. Jain, P. K., Huang, X., El-Sayed, I. H. & El-Sayed, M. a. Review of some interesting surface plasmon resonance-enhanced properties of noble metal nanoparticles and their applications to biosystems. *Plasmonics* **2**, 107–118 (2007).
62. Kreibig, U. & Vollmer, M. *Optical Properties of Metal Clusters*. **25**, (Springer Berlin Heidelberg, 1995).
63. Baffou, G. & Quidant, R. Thermo-plasmonics: using metallic nanostructures as nano-sources of heat. *Laser Photon. Rev.* **7**, 171–187 (2013).
64. Brinson, B. E. *et al.* Nanoshells Made Easy : Improving Au Layer Growth on Nanoparticle Surfaces. *Synthesis (Stuttg)*. **120**, 14166–14171 (2008).

65. Ye, X. *et al.* Improved size-tunable synthesis of monodisperse gold nanorods through the use of aromatic additives. *ACS Nano* **6**, 2804–17 (2012).
66. Hu, M. *et al.* Gold nanostructures: engineering their plasmonic properties for biomedical applications. *Chem. Soc. Rev.* **35**, 1084–1094 (2006).
67. Nanostars, G. *et al.* Label-free Biosensing Based on Single. **XXX**, 6318–6322 (2010).
68. Ritchie, R. Plasma Losses by Fast Electrons in Thin Films. *Phys. Rev.* **106**, 874–881 (1957).
69. Pines, D. Collective energy losses in solids. *Rev. Mod. Phys.* **28**, 184–199 (1956).
70. Coronado, E. a, Encina, E. R. & Stefani, F. D. Optical properties of metallic nanoparticles: manipulating light, heat and forces at the nanoscale. *Nanoscale* **3**, 4042–59 (2011).
71. Amendola, V. & Meneghetti, M. Size Evaluation of Gold Nanoparticles by UV-vis Spectroscopy. *Direct* 4277–4285 (2009).
72. Charamisinau, I. Mie theory calculator User ' s manual. *Program*
73. Jain, P. K., Lee, K. S., El-Sayed, I. H. & El-Sayed, M. a. Calculated absorption and scattering properties of gold nanoparticles of different size, shape, and composition: applications in biological imaging and biomedicine. *J. Phys. Chem. B* **110**, 7238–48 (2006).
74. Gans, R. Über die Form ultramikroskopischer Goldteilchen. *Ann. Phys.* **342**, 881–900 (1912).
75. Liz-marz, L. M. Nanometals : 26–31 (2004).
76. Link, S. & El-Sayed, M. a. Size and Temperature Dependence of the Plasmon Absorption of Colloidal Gold Nanoparticles. *J. Phys. Chem. B* **103**, 4212 (1999).
77. Myroshnychenko, V. *et al.* Modelling the optical response of gold nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.* **37**, 1792–805 (2008).
78. He, G. S. *et al.* Scattering and Absorption Cross-Section Spectral Measurements of Gold Nanorods in Water. *J. Phys. Chem. C* **114**, 2853–2860 (2010).
79. Freddi, S. *et al.* A molecular thermometer for nanoparticles for optical hyperthermia. *Nano Lett.* **13**, 2004–2010 (2013).
80. Hulst, H. C. van de. *Light Scattering by Small Particles*. 470 (Courier Corporation, 2012). at <<https://books.google.com/books?id=777DAgAAQBAJ&pgis=1>>
81. Pazos-Perez, N. *et al.* Organized plasmonic clusters with high coordination number and extraordinary enhancement in surface-enhanced Raman scattering (SERS). *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **51**, 12688–93 (2012).

82. Estrada, L. C., Aramendía, P. F. & Martínez, O. E. 10000 Times Volume Reduction for Fluorescence Correlation Spectroscopy Using Nano-Antennas. *Opt. Express* **16**, 20597–602 (2008).
83. Rigneault, H. *et al.* Enhancement of Single-Molecule Fluorescence Detection in Subwavelength Apertures. *Phys. Rev. Lett.* **95**, 117401 (2005).
84. Curto, A. G. *et al.* Unidirectional Emission of a Quantum Dot Coupled to a Nanoantenna. *Science* (80-.). **329**, 930–933 (2010).
85. Taminiau, T. H., Stefani, F. D., Segerink, F. B. & van Hulst, N. F. Optical antennas direct single-molecule emission. *Nat. Photonics* **2**, 234–237 (2008).
86. Zijlstra, P., Paulo, P. M. R. & Orrit, M. Optical detection of single non-absorbing molecules using the surface plasmon resonance of a gold nanorod. *Nat. Nanotechnol.* **7**, 379–82 (2012).
87. Yorulmaz, M., Khatua, S., Zijlstra, P., Gaiduk, A. & Orrit, M. Luminescence quantum yield of single gold nanorods. *Nano Lett.* **12**, 4385–91 (2012).
88. Acuna, G. P. *et al.* Fluorescence enhancement at docking sites of DNA-directed self-assembled nanoantennas. *Science* **338**, 506–10 (2012).
89. Nordlander, P., Oubre, C., Prodan, E., Li, K. & Stockman, M. I. Plasmon Hybridization in Nanoparticle Dimers. *Nano Lett.* **4**, 899–903 (2004).
90. Inouye, H., Tanaka, K., Tanahashi, I. & Hirao, K. Ultrafast dynamics of nonequilibrium electrons in a gold nanoparticle system. *Phys. Rev. B* **57**, 11334–11340 (1998).
91. Hodak, J. H., Henglein, A. & Hartland, G. V. Size dependent properties of Au particles: Coherent excitation and dephasing of acoustic vibrational modes. *J. Chem. Phys.* **111**, 8613 (1999).
92. Link, S. & El-Sayed, M. A. Spectral Properties and Relaxation Dynamics of Surface Plasmon Electronic Oscillations in Gold and Silver Nanodots and Nanorods. *J. Phys. Chem. B* **103**, 8410–8426 (1999).
93. Hu, M. & Hartland, G. V. Heat Dissipation for Au Particles in Aqueous Solution: Relaxation Time versus Size. *J. Phys. Chem. B* **106**, 7029–7033 (2002).
94. Ekici, O. *et al.* Thermal Analysis of Gold Nanorods Heated with Femtosecond Laser Pulses. *J. Phys. D. Appl. Phys.* **41**, 185501 (2008).
95. Sassaroli, E., Li, K. C. P. & O’Neill, B. E. Numerical investigation of heating of a gold nanoparticle and the surrounding microenvironment by nanosecond laser pulses for nanomedicine applications. *Phys. Med. Biol.* **54**, 5541–60 (2009).
96. Rashidi-Huyeh, M., Volz, S. & Palpant, B. Non-Fourier heat transport in metal-dielectric core-shell nanoparticles under ultrafast laser pulse excitation. *Phys. Rev. B* **78**, 125408 (2008).

97. Tribelsky, M. I., Miroshnichenko, A. E., Kivshar, Y. S., Luk'yanchuk, B. S. & Khokhlov, A. R. Laser Pulse Heating of Spherical Metal Particles. *Phys. Rev. X* **1**, 021024 (2011).
98. Govorov, A. O. *et al.* Gold nanoparticle ensembles as heaters and actuators: Melting and collective plasmon resonances. *Nanoscale Res. Lett.* **1**, 84–90 (2006).
99. Baffou, G., Quidant, R. & García de Abajo, F. J. Nanoscale control of optical heating in complex plasmonic systems. *ACS Nano* **4**, 709–16 (2010).
100. Richardson, H. H., Hickman, Z. N., Thomas, A. C., Kordesch, M. E. & Govorov, A. O. Thermo-optical Properties of Nanoparticles and Nanoparticle Complexes Embedded in Ice: Characterization of Heat Generation and Actuation of Larger-scale Effects. *MRS Proc.* **964**, (2006).
101. Knoll, W. Interfaces and thin films as seen by bound electromagnetic waves. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **49**, 569–638 (1998).
102. Knobloch, H., Brunner, H., Leitner, A., Aussenegg, F. & Knoll, W. Probing the evanescent field of propagating plasmon surface polaritons by fluorescence and Raman spectroscopies. *J. Chem. Phys.* **98**, 10093 (1993).
103. Barnes, W. L. Fluorescence near interfaces: the role of photonic mode density. *J. Mod. Opt.* **45**, 661–699 (1998).
104. Lakowicz, J. R., Malicka, J., Gryczynski, I., Gryczynski, Z. & Geddes, C. D. Radiative decay engineering: the role of photonic mode density in biotechnology. *J. Phys. D* **36**, R240–R249 (2003).
105. Persson, B. & Zaremba, E. Electron-hole pair production at metal surfaces. *Phys. Rev. B* **31**, 1863–1872 (1985).
106. Persson, B. & Lang, N. Electron-hole-pair quenching of excited states near a metal. *Phys. Rev. B* **26**, 5409–5415 (1982).
107. Gersten, J. I. & Nitzan, A. Accelerated energy transfer between molecules near a solid particle. *Chem. Phys. Lett.* **104**, 31–37 (1984).
108. Seelig, J. *et al.* Nanoparticle-induced fluorescence lifetime modification as nanoscopic ruler: demonstration at the single molecule level. *Nano Lett.* **7**, 685–9 (2007).
109. Kühn, S., Håkanson, U., Rogobete, L. & Sandoghdar, V. Enhancement of Single-Molecule Fluorescence Using a Gold Nanoparticle as an Optical Nanoantenna. *Phys. Rev. Lett.* **97**, 017402 (2006).
110. Busson, M. P., Rolly, B., Stout, B., Bonod, N. & Bidault, S. Accelerated single photon emission from dye molecule-driven nanoantennas assembled on DNA. *Nat. Commun.* **3**, 962 (2012).
111. Acuna, G. P. *et al.* Distance dependence of single-fluorophore quenching by gold nanoparticles studied on DNA origami. *ACS Nano* **6**, 3189–95 (2012).

112. Stockman, M. I. Nanoplasmonics: The physics behind the applications. *Phys. Today* **64**, 39 (2011).
113. Gobin, M. *et al.* Near-Infrared Resonant Nanoshells for Combined Optical Imaging and Photothermal Cancer Therapy. *Nano* (2007).
114. Wu, X. *et al.* Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots. *Nat. Biotechnol.* **21**, 41–6 (2003).
115. Chandrasekharan, N. & Kelly, L. a. A dual fluorescence temperature sensor based on perylene/excimer interconversion. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 9898–9 (2001).
116. Nath, N. & Chilkoti, A. A colorimetric gold nanoparticle sensor to interrogate biomolecular interactions in real time on a surface. *Anal. Chem.* **74**, 504–9 (2002).
117. Taminiau, T. H., Stefani, F. D. & van Hulst, N. F. Enhanced directional excitation and emission of single emitters by a nano-optical Yagi-Uda antenna. *Opt. Express* **16**, 10858 (2008).
118. Schmied, J. J. *et al.* DNA origami nanopillars as standards for three-dimensional superresolution microscopy. *Nano Lett.* **13**, 781–785 (2013).
119. Testa, I. *et al.* Nanoscopy of living brain slices with low light levels. *Neuron* **75**, 992–1000 (2012).
120. Hirschfeld, T. Quantum efficiency independence of the time integrated emission from a fluorescent molecule. *Appl. Opt.* **15**, 3135–3139 (1976).
121. Panchuk-Voloshina, N. *et al.* Alexa Dyes, a Series of New Fluorescent Dyes that Yield Exceptionally Bright, Photostable Conjugates. *J. Histochem. Cytochem.* **47**, 1179–1188 (1999).
122. Avlasevich, Y., Li, C. & Müllen, K. Synthesis and applications of core-enlarged perylene dyes. *J. Mater. Chem.* **20**, 3814 (2010).
123. Altman, R. B. *et al.* Cyanine fluorophore derivatives with enhanced photostability. *Nat. Methods* **9**, 68–71 (2012).
124. Rasnik, I., McKinney, S. A. & Ha, T. Nonblinking and long-lasting single-molecule fluorescence imaging. *Nat. Methods* **3**, 891–3 (2006).
125. Benesch, R. E. & Benesch, R. Enzymatic removal of oxygen for polarography and related methods. *Science (80-.)*. **118**, (1953).
126. Yildiz, A., Tomishige, M., Vale, R. D. & Selvin, P. R. Kinesin Walks Hand-Over-Hand. *Science (80-.)*. **303**, 676–678 (2004).
127. Vogelsang, J. *et al.* A reducing and oxidizing system minimizes photobleaching and blinking of fluorescent dyes. *Angew. Chemie* **47**, 5465–9 (2008).

128. Ha, T. & Tinnefeld, P. Photophysics of fluorescent probes for single-molecule biophysics and super-resolution imaging. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **63**, 595–617 (2012).
129. Purcell, E. Spontaneous emission probabilities at radio frequencies. *Phys. Rev.* **69**, 681 (1946).
130. Drexhage, K. H. Interaction of light with monomolecular dye layers. *Prog. Opt.* **12**, 163–232 (1974).
131. Chance, R., Prock, A. & Silbey, R. Molecular fluorescence and energy transfer near interfaces. *Adv. Chem. Phys.* **37**, 1 (1978).
132. Novotny, L. & Hecht, B. *Principles of Nano Optics. Book* (Cambridge University Press, 2006).
133. Lakowicz, J. R. Radiative decay engineering 5: metal-enhanced fluorescence and plasmon emission. *Anal. Chem.* **337**, 171–194 (2005).
134. Hoogenboom, J. P. *et al.* The single molecule probe: nanoscale vectorial mapping of photonic mode density in a metal nanocavity. *Nano Lett.* **9**, 1189–95 (2009).
135. Muskens, O. L., Sanchez-Gil, J. A., Giannini, V. & Gomez-Rivas, J. Strong Enhancement of the Radiative Decay Rate of Emitters by Single Plasmonic Nanoantennas. *Nano Lett.* **7**, 2871–2875 (2007).
136. Malicka, J., Gryczynski, I., Fang, J., Kusba, J. & Lakowicz, J. R. Photostability of Cy3 and Cy5-Labeled DNA in the Presence of Metallic Silver Particles. *J. Fluoresc.* **12**, 439–447 (2002).
137. Vasilev, K., Stefani, F. D., Jacobsen, V., Knoll, W. & Kreiter, M. Reduced photobleaching of chromophores close to a metal surface. *J. Chem. Phys.* **120**, 6701–4 (2004).
138. Zaiba, S. *et al.* Transparent plasmonic nanocontainers protect organic fluorophores against photobleaching. *Nano Lett.* **11**, 2043–7 (2011).
139. Cang, H., Liu, Y., Wang, Y., Yin, X. & Zhang, X. Giant suppression of photobleaching for single molecule detection via the Purcell effect. *Nano Lett.* **13**, 5949–53 (2013).
140. Alberts, B. *et al.* Molecular Biology of the Cell. (2002). at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21054/>
141. SantaLucia, J. A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 1460–1465 (1998).
142. Zadejan, R. M. & Norton, M. L. Structural DNA nanotechnology: from design to applications. *Int. J. Mol. Sci.* **13**, 7149–62 (2012).
143. Sarikaya, M., Tamerler, C., Jen, A. K.-Y., Schulten, K. & Baneyx, F. Molecular biomimetics: nanotechnology through biology. *Nat. Mater.* **2**, 577–85 (2003).

144. Chen, J. H. & Seeman, N. C. Synthesis from DNA of a molecule with the connectivity of a cube. *Nature* **350**, 631–3 (1991).
145. Feature, N. & Sanderson, K. What to make with DNA origami. *Nature* **464**, 158–159 (2010).
146. Rothemund, P. W. K. Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns. *Nature* **440**, 297–302 (2006).
147. Eichman, B. F., Vargason, J. M., Mooers, B. H. M. & Ho, P. S. The Holliday junction in an inverted repeat DNA sequence: Sequence effects on the structure of four-way junctions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 3971–3976 (2000).
148. Douglas, S. M. *et al.* Self-assembly of DNA into nanoscale three-dimensional shapes. *Nature* **459**, 414–8 (2009).
149. Liedl, T., Högberg, B., Tytell, J., Ingber, D. E. & Shih, W. M. Self-assembly of three-dimensional prestressed tensegrity structures from DNA. *Nat. Nanotechnol.* **5**, 520–4 (2010).
150. Saccà, B. & Niemeyer, C. M. DNA origami: The art of folding DNA. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **51**, 58–66 (2012).
151. Pal, S. *et al.* DNA directed self-assembly of anisotropic plasmonic nanostructures. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 17606–9 (2011).
152. Wijaya, A., Schaffer, S. B., Pallares, I. G. & Hamad-schifferli, K. Selective Release of Multiple DNA Oligonucleotides from Gold Nanorods. **3**,
153. Ding, B. *et al.* Gold nanoparticle self-similar chain structure organized by DNA origami. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 3248–9 (2010).
154. Schreiber, R. *et al.* Hierarchical assembly of metal nanoparticles, quantum dots and organic dyes using DNA origami scaffolds. *Nat. Nanotechnol.* **9**, 74–8 (2014).
155. Stein, I. H., Schüller, V., Böhm, P., Tinnefeld, P. & Liedl, T. Single-molecule FRET ruler based on rigid DNA origami blocks. *Chemphyschem* **12**, 689–695 (2011).
156. Steinhauer, C., Jungmann, R., Sobey, T. L., Simmel, F. C. & Tinnefeld, P. DNA Origami as a Nanoscopic Ruler for Super-Resolution Microscopy. *Angewandte Chemie International Edition* **48**, 8870–8873 (2009).
157. Schmied, J. J. *et al.* Fluorescence and super-resolution standards based on DNA origami. *Nat. Methods* **9**, 1133–1134 (2012).
158. Möller, F. M., Holzmeister, P., Sen, T., Acuna, G. P. & Tinnefeld, P. Angular modulation of single-molecule fluorescence by gold nanoparticles on DNA origami templates. *Nanophotonics* **2**, 167–172 (2013).
159. Taminiau, T. H., Stefani, F. D. & Van Hulst, N. F. Single emitters coupled to plasmonic nano-antennas: Angular emission and collection efficiency. *New J. Phys.* **10**, (2008).

160. ISS | Data Tables. at
<http://www.iss.com/resources/reference/data_tables/index.html>
161. Mujumdar, R. B., Ernst, L. a, Mujumdar, S. R., Lewis, C. J. & Waggoner, a S. Cyanine dye labeling reagents: sulfoindocyanine succinimidyl esters. *Bioconjug. Chem.* **4**, 105–111 (1993).
162. Yu, X. *et al.* Distance control in-between plasmonic nanoparticles via biological and polymeric spacers. *Nano Today* **8**, 480–493 (2013).
163. Acuna, G. P. *et al.* Fluorescence enhancement at docking sites of DNA-directed self-assembled nanoantennas. *Science* **338**, 506–10 (2012).
164. Roy, R., Hohng, S. & Ha, T. REVIEW A practical guide to single-molecule FRET. *Nat. Methods* **5**, 507–516 (2008).
165. Hell, S. W. & Wichmann, J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission : stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. **19**, 780–782 (1994).
166. Dertinger, T., Colyer, R., Iyer, G., Weiss, S. & Enderlein, J. fluctuation imaging (SOFI). *PNAS* **106**, 22287–22292 (2009).
167. Marriott, G. *et al.* Optical lock-in detection imaging microscopy for contrast-enhanced imaging in living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 17789–17794 (2008).
168. Díaz, S. A., Giordano, L., Azcárate, J. C., Jovin, T. M. & Jares-Erijman, E. A. Quantum dots as templates for self-assembly of photoswitchable polymers: small, dual-color nanoparticles capable of facile photomodulation. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 3208–17 (2013).
169. Díaz, S. A., Giordano, L., Jovin, T. M. & Jares-Erijman, E. A. Modulation of a photoswitchable dual-color quantum dot containing a photochromic FRET acceptor and an internal standard. *Nano Lett.* **12**, 3537–44 (2012).
170. Cho, E. C. *et al.* Measuring the Optical Absorption Cross-sections of Au-Ag Nanocages and Au Nanorods by Photoacoustic Imaging. *J. Phys. Chem. C. Nanomater. Interfaces* **113**, 9023–9028 (2009).
171. Kim, J., Bryan, W. W. & Lee, T. R. Preparation , Characterization , and Optical Properties of Gold , Silver , and Gold-Silver Alloy Nanoshells Having Silica Cores. *Society* 11147–11152 (2008).
172. Nehl, C. L. & Hafner, J. H. Shape-dependent plasmon resonances of gold nanoparticles. *J. Mater. Chem.* **18**, 2415 (2008).
173. Ni, W., Kou, X., Yang, Z. & Wang, J. Tailoring longitudinal surface plasmon wavelengths, scattering and absorption cross sections of gold nanorods. *ACS Nano* **2**, 677–86 (2008).
174. Link, S., Mohamed, M. B. & El-Sayed, M. a. Simulation of the Optical Absorption Spectra of Gold Nanorods as a Function of Their Aspect Ratio and the Effect of the Medium Dielectric Constant. *J. Phys. Chem. B* **103**, 3073–3077 (1999).

175. Myroshnychenko, V. *et al.* Modelling the optical response of gold nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.* **37**, 1792–805 (2008).
176. Jennes, J. R. Effect of temperature upon the fluorescence of some organics solutions. *Phys. Rev.* **34**, 1275–1285 (1921).
177. Tawde, N. R. & Ramanathan, N. Fluorescence of Dyestuff Solutions: Viscosity and Temperature Effects. *Proc. Phys. Soc. Sect. B* **65**, 33–40 (1952).
178. Estrada-Pérez, C. E., Hassan, Y. a & Tan, S. Experimental characterization of temperature sensitive dyes for laser induced fluorescence thermometry. *Rev. Sci. Instrum.* **82**, 074901 (2011).
179. Natrajan, V. K. & Christensen, K. T. Two-color laser-induced fluorescent thermometry for microfluidic systems. *Meas. Sci. Technol.* **20**, 015401 (2009).
180. Brites, C. D. S. *et al.* Thermometry at the nanoscale. *Nanoscale* **4**, 4799–829 (2012).
181. Millen, J., Deesuwan, T., Barker, P. & Anders, J. Nanoscale temperature measurements using non-equilibrium Brownian dynamics of a levitated nanosphere. *Nat. Nanotechnol.* **9**, 425–9 (2014).
182. Doria, G. *et al.* Noble metal nanoparticles for biosensing applications. *Sensors (Basel)*. **12**, 1657–87 (2012).
183. Pavesi, L. & Fauchet, P. M. *Biophotonics*. 358 (Springer Science & Business Media, 2008). at <<http://books.google.com/books?id=9b1y7fQNirgC&pgis=1>>
184. Cooper, M. a. Optical biosensors in drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **1**, 515–28 (2002).
185. Guo, X. Surface plasmon resonance based biosensor technique: a review. *J. Biophotonics* **5**, 483–501 (2012).
186. Anker, J. N., Hall, W. P., Nilam, C., Zhao, J. & Van, P. Biosensing with plasmonic nanosensors. **7**, 8–10 (2008).
187. Schrittwieser, S. *et al.* Homogeneous biosensor based on optical detection of the rotational dynamics of anisotropic nanoparticles. *Procedia Eng.* **5**, 1107–1110 (2010).
188. Dave, S. R. & Gao, X. Monodisperse magnetic nanoparticles for biodetection , imaging , and drug delivery : a versatile and evolving technology. 583–609 (2009). doi:10.1002/wnan.051
189. Mohammed, M.-I. & Desmulliez, M. P. Y. Lab-on-a-chip based immunosensor principles and technologies for the detection of cardiac biomarkers: a review. *Lab Chip* **11**, 569–95 (2011).
190. Tcherniak, A. *et al.* One-photon plasmon luminescence and its application to correlation spectroscopy as a probe for rotational and translational dynamics of gold nanorods. *J. Phys. Chem. C* **115**, 15938–15949 (2011).

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer al Dr. Fernando Stefani, por haber asumido el desafío de armar un nuevo grupo de trabajo en la Argentina, apuntando a temas de investigación en el área experimental de gran relevancia y actualidad científica, dándonos la oportunidad de trabajar en contacto continuo con grupos de investigación líderes a nivel internacional. En particular quisiera agradecerle por la paciencia, el interminable conocimiento, y la capacidad de transmitirme tranquilidad y confianza aún en momentos adversos.

Y volviendo en el tiempo me trae a la memoria el buen recuerdo de la Dra. Elizabeth Jares Erijman, a quien le debo un gran agradecimiento, por haberme aconsejado acertadamente comenzar mi doctorado en este grupo y habernos prestado sus espacios para arrancar.

Quisiera agradecer también al Dr. Philip Tinnefeld y a todo su grupo por haberme brindado la oportunidad de trabajar, aprender y vivir una gran experiencia en mi estadía en Alemania.

Una especial mención al Dr. Guillermo Acuña, quien hizo mi estadía en Braunschweig no sólo científicamente provechosa, sino también amena y acompañada. Muchas gracias por las infinitas simulaciones, la paciencia, las comidas, y las impresoras 3D.

A la doctora Andrea Bragas y todo el grupo del LEC por brindarnos un espacio en nuestros primeros pasos.

A Mark Kreuzer, Martín Caldarola y Emiliano Cortes por haber alegrado los días del biosensado.

Muchas gracias al grupo de investigadores del Cibion, que siempre están dispuestos a ayudarnos con lo que sea necesario, aportando cada uno desde su área de conocimiento.

A Lía Pietrasanta y todo su grupo por los préstamos y las ayudas.

A las chicas del CM1 por darme una mano siempre, y sacarme de apuros. A Yani por ayudarme con el Matlab tantas veces!

Y el agradecimiento infinito a todo el grupo Nano, a los que la remamos desde el principio compartiendo "setup", tristezas y alegrías, a los que se sumaron después, a los que suman ideas aun estando lejos, a los que no son del grupo pero casi, a todos, un enorme GRACIAS! Esto no es más que el resultado de un trabajo en equipo. Juli, Fede, Martín, Luciano, Francisco, Emi, Alan, Flor a todos y cada uno, gracias!

A mi familia por cuidarme incondicionalmente.

A mis amigos por darle alegría a la vida.

A Fede por todo. Y más.

“Lo de menos, incluso es mi razón, (...) las palabras que digan lo demás...”