

BIOSENSADO BASADO EN MODULACIÓN DE FLUORESCENCIA POR CALENTAMIENTO PLASMÓNICO DE NANOVARILLAS DE ORO

Jesica V. Pellegrotti.^{1,2}, Martin Caldarola², Mark P. Kreuzer¹,
Emiliano Cortés¹, Martin D. Bordenave¹, Alfredo D. Sanchez¹,
Ignacio Ojea³, Andrea V. Bragas², Fernando D. Stefani^{1,2*}

¹ Centro de Investigaciones en Bionanociencias (CIBION), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Godoy Cruz 2390, C1425FQD Buenos Aires, Argentina.
(E-mail: fernando.stefani@cibion.conicet.gov.ar)

² Departamento de Física, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Pabellón 1 Ciudad Universitaria, C1428EHA Buenos Aires, Argentina.

³ Departamento de Matemática & Instituto de Investigaciones Matemáticas "Luis A. Santaló" (IMAS, CONICET), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Pabellón 1 Ciudad Universitaria, C1428EHA Buenos Aires, Argentina.

Resumen

Debido a su carácter poco 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-resolución [1-3]. Sin embargo, una de las grandes limitaciones de esta técnica es el lograr discriminar la señal de interés de contribuciones de fondo como la autofluorescencia o la marcación inespecífica [4]. Un enfoque reciente para abordar este problema consiste en utilizar sondas fluorescentes cuya emisión pueda modularse de manera específica. De este modo es posible usar esquemas de detección que filtren y amplifiquen las componentes de la señal a la frecuencia modulada [4,5]. En este trabajo investigamos esta posibilidad en sondas híbridas compuestas de nano-varillas de oro y fluoróforos orgánicos. Caracterizamos su funcionamiento como sondas fluorescentes modulables y evaluamos su posible aplicación para biosensado homogéneo.

Palabras clave: calentamiento plasmónico, nano-varillas de oro, nanopartículas de metálicas, biosensado, fluorescencia, sensores moleculares

Abstract

Biosensing based on modulation of fluorescence by plasmonic heating of gold nanorods. Due to its low invasive character, optical microscopy is the method of choice for the investigation of cellular processes. In particular, modalities based on fluorescence have shown a tremendous development, including the detection and tracking of single molecules and the super-resolution techniques. [1-3]. However, fluorescence methods find limitations in complex systems where background contributions such as auto-fluorescence or unspecific labelling become non-negligible [4]. A recent approach to tackle this problem consists of using fluorescent probes whose emission could be modulated specifically. In this way, highly sensitive detection schemes that filter and amplify the signal components at the modulation frequency are possible [4-5]. In this work we investigate this possibility using hybrid fluorescent probes made of gold nanorods and organic fluorophores. We characterize their performance as

modular fluorescent probes and examine their application for homogeneous biosensing.

Key words: plasmonic heating, gold nanorods, biosensing, fluorescence, nanoparticle, molecular sensors

Fluorescencia dependiente de la temperatura y calentamiento plasmónico

Las nanopartículas (NPs) metálicas pueden calentarse a distancia por iluminación a la longitud de onda correspondiente a la resonancia de su plasmón [6,7]. Este proceso permite el control local de la temperatura en el entorno nanométrico de las NPs en un rango que abarca desde temperatura ambiente hasta más de 90°C [8]. En los últimos tiempos, ha aparecido un creciente interés en este fenómeno. El calentamiento óptico de suspensiones o arreglos de NPs se ha utilizado en aplicaciones que incluyen liberación remota [9], análisis por desnaturalización térmica de DNA[10] y para terapia de cáncer [11]. Los múltiples trabajos sobre el uso de calentamiento plasmónico de nanopartículas individuales abren las puertas para investigaciones térmicas y termodinámicas en la nanoescala [8,12,13].

Por otro lado, las variaciones de temperatura afectan a la mayoría de los fluoróforos activando vías de decaimiento no radiativas, disminuyendo de esta forma su eficiencia cuántica de fluorescencia. Estos cambios de luminiscencia debido a la temperatura pueden ser aprovechados para formar sondas modulables. Es posible, además, producir este efecto de forma controlada, combinando NPs, fluoróforos y muestra de forma específica. Al irradiar las NPs el campo de temperaturas afectará únicamente su entorno nanométrico, por lo que en la señal será posible distinguir la contribución modulada por la temperatura (sondas unidas a las NPs) de la autofluorescencia de la muestra o fluorescencia no específica, que no interactúa con las NPs (Fig. 1).

En este trabajo se desarrolla la investigación de un método novedoso que combina propiedades de fluoróforos y NPs metálicas para crear una sonda de fluorescencia modulable y su aplicación en una plataforma de biosensado.

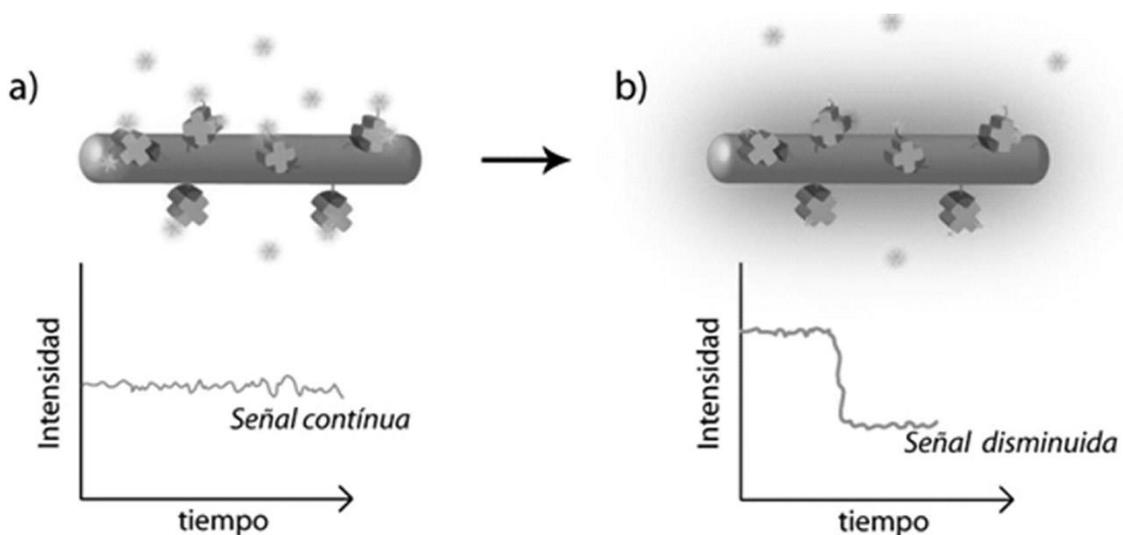


Fig. 1. Utilización del calentamiento plasmónico para generar sondas modulables específicas. a) En ausencia de radiación, estén los fluoróforos adheridos o no a la superficie de la NP, la señal de fluorescencia detectada será continua. b) Al irradiar la muestra con la longitud de onda de calentamiento se genera un campo de alta temperatura en el entorno nanométrico de las NPs, y una consecuente reducción de la emisión de

fluorescencia de las moléculas unidas a las NPs.

Sonda híbrida modulable

Para construir una sonda modulable combinando el calentamiento plasmónico con la respuesta térmica de los fluoróforos, es necesario seleccionar una combinación de fluoróforos y NPs donde la excitación de fluorescencia y el calentamiento plasmónico pueden efectuarse independientemente con dos longitudes de onda distintas.

De manera de cumplir con esta condición se seleccionaron partículas metálicas cuya resonancia plasmónica se encontrara alejada del rango más usual de excitación de fluorescencia (la mayor cantidad de fluoróforos comerciales se encuentran en el rango de 480-680 nm). Por esta razón se decidió trabajar con nanovarillas de oro (AuNR) cuyo plasmón se encuentra en el infrarrojo cercano.

Se utilizaron AuNR biotinilados comerciales (Nanopartz, USA) de 42x10nm ($\sigma = 3,8 \cdot 10^{-4} \mu\text{m}^2$), sección eficaz de absorción reportada por el fabricante y de 90x22nm ($\sigma = 2,4 \cdot 10^{-3} \mu\text{m}^2$). En la Fig. 2 se presentan espectros de absorción e imágenes de microscopía electrónica de las AuNRs utilizados. Al estar biotiniladas las partículas es posible adherirle a la superficie otra especie a través de una estreptavidina.

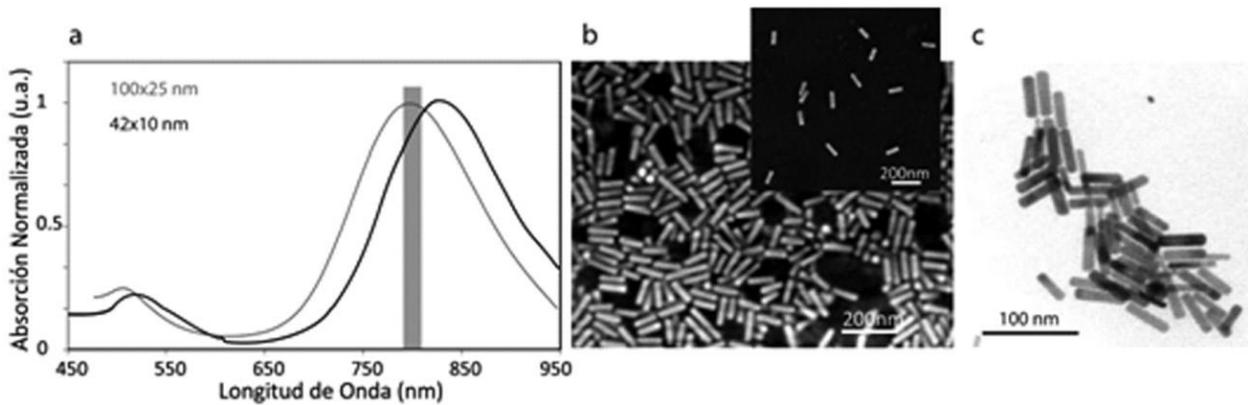


Fig. 2 a) Espectro de absorción normalizado de AuNR de 90x22 (gris) y de 42x10nm (negro). La línea vertical indica la longitud de onda usada para el calentamiento. b) Imágenes de SEM de NP de 100x25nm. c) Imagen de TEM provista por el fabricante (Nanopartz) de partículas de 42x10nm.

Calentamiento plasmónico de AuNRs

La determinación de la distribución de temperaturas en el espacio debido a una NP metálica se basa únicamente en la resolución de la ecuación de calor:

$$\rho(\mathbf{r})c(\mathbf{r})\frac{\partial T(\mathbf{r},t)}{\partial t} = \nabla k(\mathbf{r})\nabla T(\mathbf{r},t) + Q(\mathbf{r},t) \quad (1)$$

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. Y $Q(\mathbf{r},t)$ es la potencia absorbida (y por lo tanto liberada) por una NP que puede ser expresada a partir de la sección eficaz de absorción σ_{abs} ,

$$Q = \sigma_{abs}I \quad (2)$$

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).

Ya que los parámetros involucrados en los cálculos son conocidos o pueden determinarse experimentalmente sin dificultad, es posible resolver numéricamente la ecuación de calor dependiente del tiempo en tres dimensiones para un contorno cilíndrico. Se calculó el campo de temperaturas en torno a una nanopartícula de 22x90nm (dimensiones determinadas a partir de las imágenes de SEM y TEM, se aproximaron las NP por cilindros de puntas chatas) inmersa en agua e irradiada a 785 nm a distintos valores de irradiancia.

En la Fig. 3 a,b) se muestran los mapas de temperatura calculados numéricamente alrededor del AuNR cuando se lo irradia con 600 kW/cm². 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/cm², como se ve en los cortes transversales y longitudinales del campo de temperaturas presentados en las Fig. 3 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 (Fig. 3 c).

De estos cálculos se obtiene también la evolución temporal del calentamiento, como se muestra en la Fig. 3.f) para el caso de 450kW/cm². Se ve que el sistema requiere un poco más de 100 ns para alcanzar el estado estacionario.

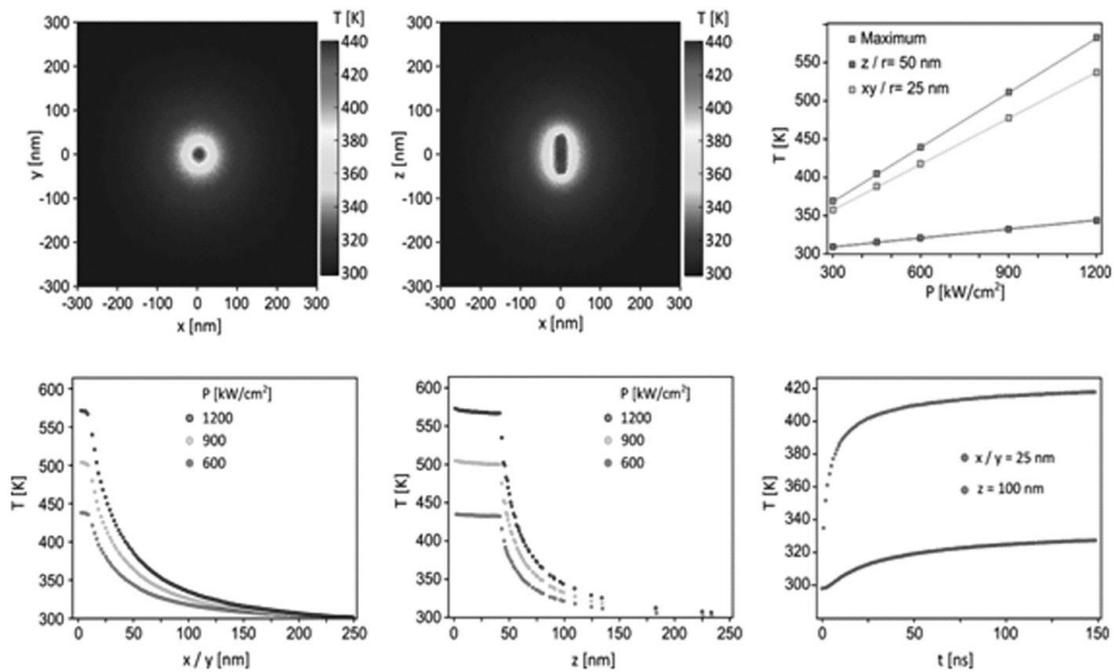


Fig. 3. Cálculos numéricos resolviendo la ecuación de calor en 3D, del calentamiento plasmónico de una AuNR de 22x90nm irradiada a 785nm. a,b) Campo de temperaturas alrededor de una AuNR irradiada a 600kW/cm². c,d) Perfiles de temperatura a lo largo del eje x o y a), y z para irradiancias de 300, 450, 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.

Respuesta con la temperatura de fluoróforos seleccionados

Se decidió trabajar con el fluoróforo AlexaFluor546 (Invitrogen), cuya emisión se encuentra en el rango de 550 a 650 nm, y puede excitarse a 532 nm.

En primer lugar se estudió la respuesta en solución del fluoróforo seleccionados con la temperatura. Se midió el espectro de emisión de AlexaFluor546 y su respuesta se comparó con la de Rodamina B, una sonda de referencia bien estudiada y reportada en la literatura [14,15]. En la Fig. 4 a) 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.

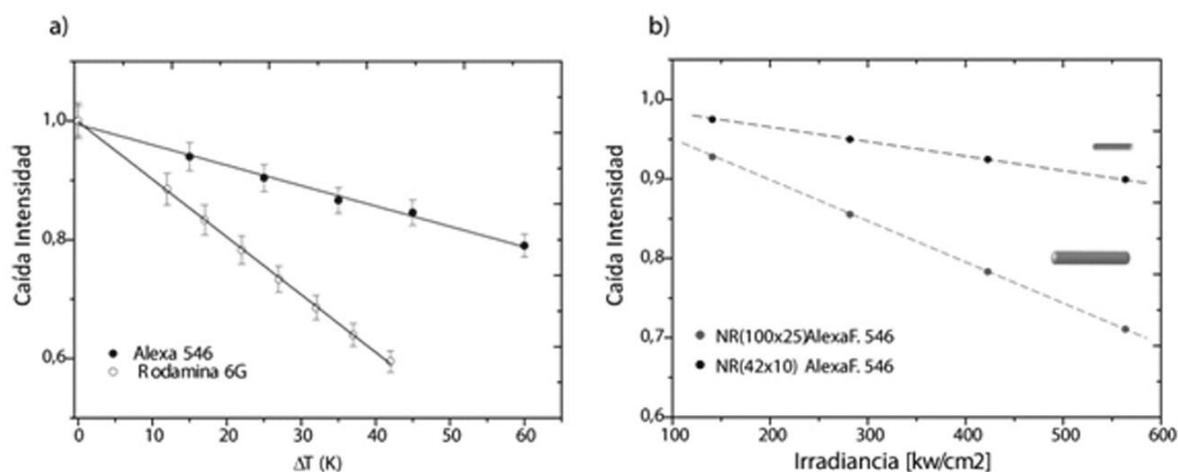


Fig. 4. a) Intensidad de fluorescencia en función de la temperatura de AlexaFluor546 en agua, y de RodaminaB en etanol. b) Caída de intensidad de un fluoróforo colocado en la superficie de un AuNR irradiado a distintas potencias, cálculos realizados para dos tamaños de partículas., 100×25nm y 40×22nm.

Efecto sobre la intensidad de fluorescencia

Los valores de campo de temperatura obtenidos para dos tamaños de partículas, 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 Fig. 4b), 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.

Modulación de fluorescencia en AuNRs individuales y en agregados

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 adicionándole un láser infrarrojo (808nm) enfocado sobre la muestra.

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.

Modulación de fluorescencia en agregados de AuNRs

Se colocó una gota de la solución pre-incubada de AuNR-biotina (90x22nm) + AlexaFluor-estreptavidina sobre un cobre. Esto genera sobre la superficie la formación de diversos aglomerados de AuNRs marcados fluorescentemente. Se investigó la influencia del haz de calentamiento en un sector donde hay AuNRs marcados y sobre otro donde solo hay fluoróforo (Fig. 5). 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 400W/cm² sin observarse degradación de la muestra, ya que al apagarse la iluminación NIR la señal de fluorescencia recupera su intensidad original.

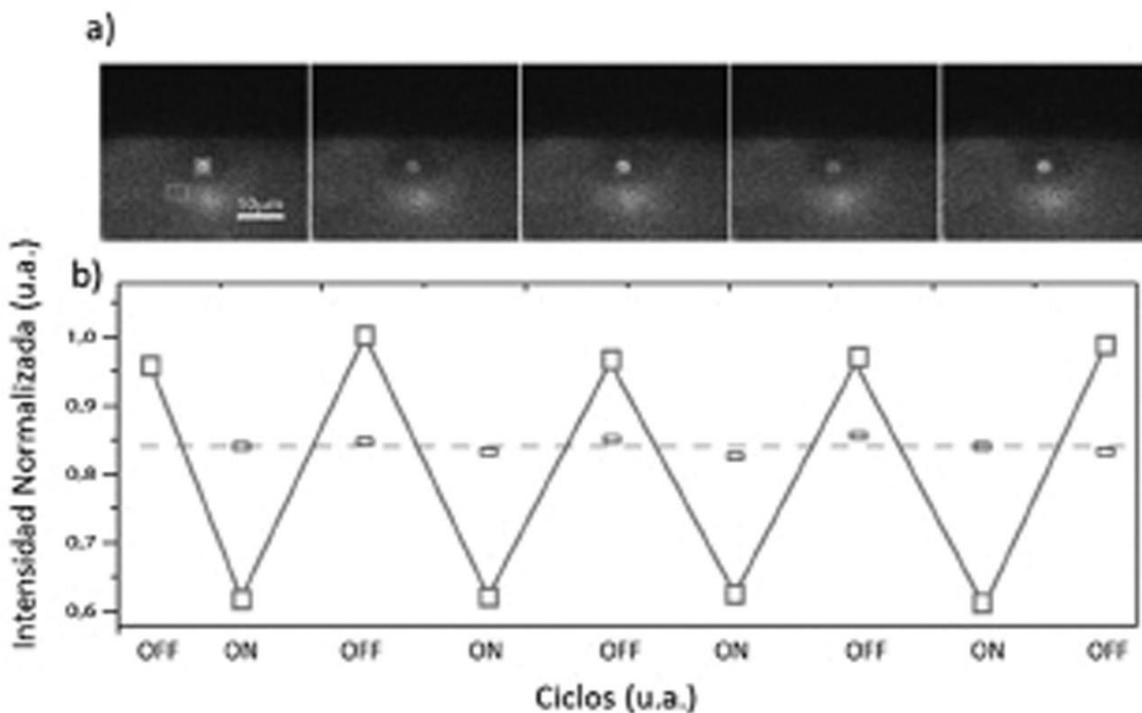


Fig. 5. Análisis del efecto del NIR sobre un agregado de AuNR de 90×22 nm. a) Imágenes de epi fluorescencia con el encendido y apagado del haz de calentamiento. b) Intensidad normalizada en función del tiempo para las zonas marcadas en a). La señal de fondo no se modifica por el haz de calentamiento, mientras que la señal de la zona con AuNRs se reduce en un 40%.

Modulación de fluorescencia de AuNRs individuales

Para lograr una comparación más fiel con los cálculos se realizaron mediciones sobre AuNRs individuales. Con este objetivo se prepararon muestras diluidas y purificadas de AuNRs marcadas fluorescentemente. A su vez se prepararon vidrios funcionalizados con estreptavidina a una densidad controlada (materiales y métodos), de manera de adherir las partículas específicamente a la superficie.

Se prepararon muestras de AuNRs de 90x22nm y de 42x10nm recubiertas con AlexaFluor546. La modulación de fluorescencia se estudió iluminando con un láser NIR modulado con una señal cuadrada de 1 Hz y a una densidad de potencia de 400kW/cm². En la Fig. 6 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 que el campo de temperatura generado dependerá de sus distintos coeficientes de absorción y tamaños (,) en coherencia con la ecuación (2). Comparando los valores medidos con los cálculos presentados en la Fig. 4, se observa que la intensidad de fluorescencia normalizada calculada con respecto a la medida difiere en menos de un 5%. Se observa entonces que el efecto puede ser medido y predicho mediante soluciones numéricas.

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 (Fig. 6 b). Local, puesto que el efecto se observa únicamente en el área alcanzada por el haz (Fig. 5) 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 (Fig. 5).

Por otro lado se observa que las caídas de intensidad medidas para los aglomerados tienden a ser superiores que para el caso de las partículas individuales. Evidentemente, la acumulación de calor entre NPs vecinas es significativa y produce un incremento mayor de temperatura, con una consecuente reducción mayor de fluorescencia.

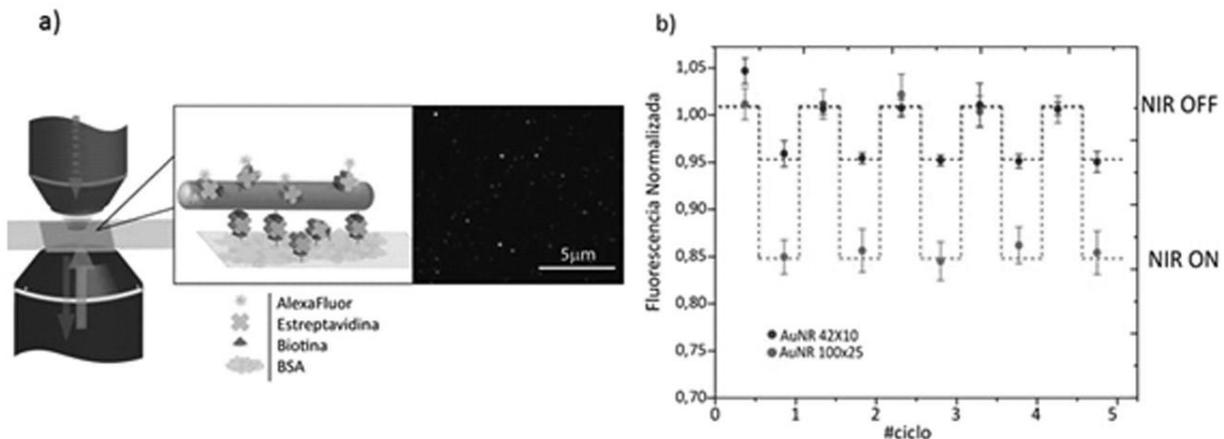


Fig. 6. Variaciones de intensidad de fluorescencia al incidir con NIR modulado, medida sobre una muestra de NP dispersas marcadas con AlexaFluor 546. a) Representación esquemática del experimento realizado en AuNRs aislados. Se funcionaliza un vidrio con BSA-biotina y estreptavidina, de manera de controlar la densidad de AuNR biotinilados. A la izquierda se muestra una imagen tomada con el microscopio de epifluorescencia. b) Se compara el promedio de 10 AuNR tomados al azar y analizados de cada tamaño.

Aplicación en cuantificación de reacciones de bioreconocimiento

La modulación específica de fluorescencia por calentamiento plasmónico puede ser utilizada en el desarrollo de una plataforma de bioreconocimiento para la detección de un analito con relevancia clínica, utilizando los componentes adecuados. Un sistema general, utilizará nanopartículas funcionalizadas superficialmente con una entidad de reconocimiento molecular específica para el analito (RM1). Otra o la misma entidad de reconocimiento molecular (RM2) se une a una o varias especies luminiscentes (Fig. 7). 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, como se demostró en la sección anterior, se genera 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.

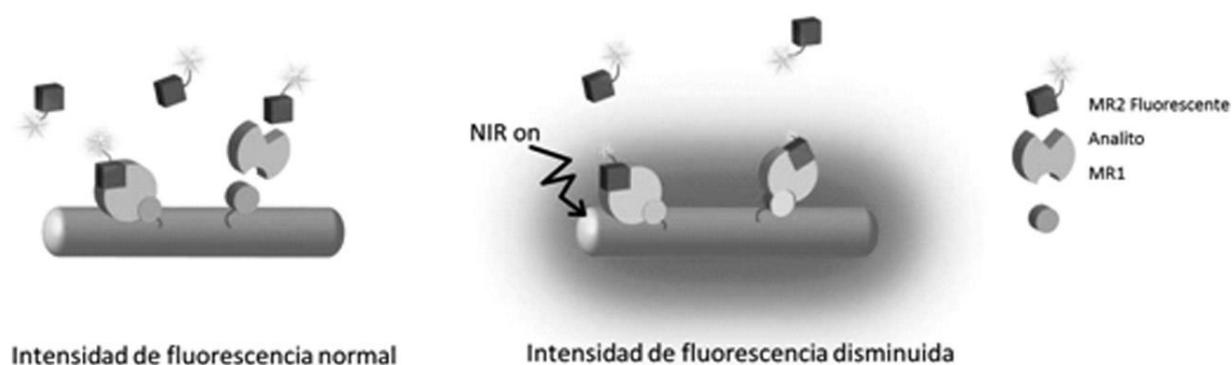


Fig. 7. Principio de funcionamiento del sensor molecular basado en blanqueo de fluorescencia fototérmico. El analito construye un sándwich molecular en conjunto con las unidades de reconocimiento molecular MR1, en la superficie de la nanopartícula, y MR2 marcada con una sonda fluorescente. Al exponer 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.

A fin de demostrar la posibilidad de utilizar el sistema para la cuantificación de un analito, se utilizó como sistema de bio-reconocimiento, biotina-estreptavidina, que es un sistema modelo arquetípico para el testeo de nuevos biosensores. Se utilizaron AuNRs funcionalizados superficialmente con biotina (MR1) y AlexaFluor546 modificada también con biotina (MR2). En este modelo el analito será la estreptavidina.

Para medir la respuesta del sensor a concentraciones crecientes de estreptavidina, se utilizó un microscopio confocal no comercial adaptado para incluir una entrada de excitación adicional. El dispositivo experimental se muestra esquemáticamente en la Fig. 8 a).

Se utilizaron 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.

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 90x22nm 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.

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 Fig. 8 b), 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 específico 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 ellas. 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.

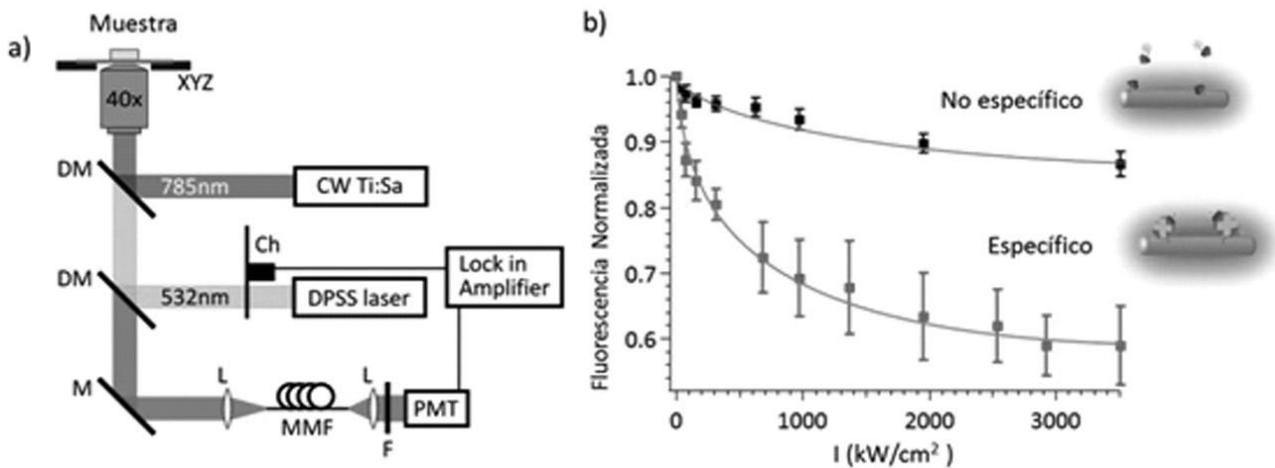


Fig. 8. a) Esquema del dispositivo experimental. DM: espejo dicróico, M: espejo, Ch: chopper mecánico, L: lentes, MMF: fibra multimodo, PMT: tubo fotomultiplicador. b) Intensidad de fluorescencia en función de la irradiancia del haz de calentamiento para una muestra con AlexaFluor546 unida específicamente 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.

Ensayo de biosensado

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 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 (Fig. 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.

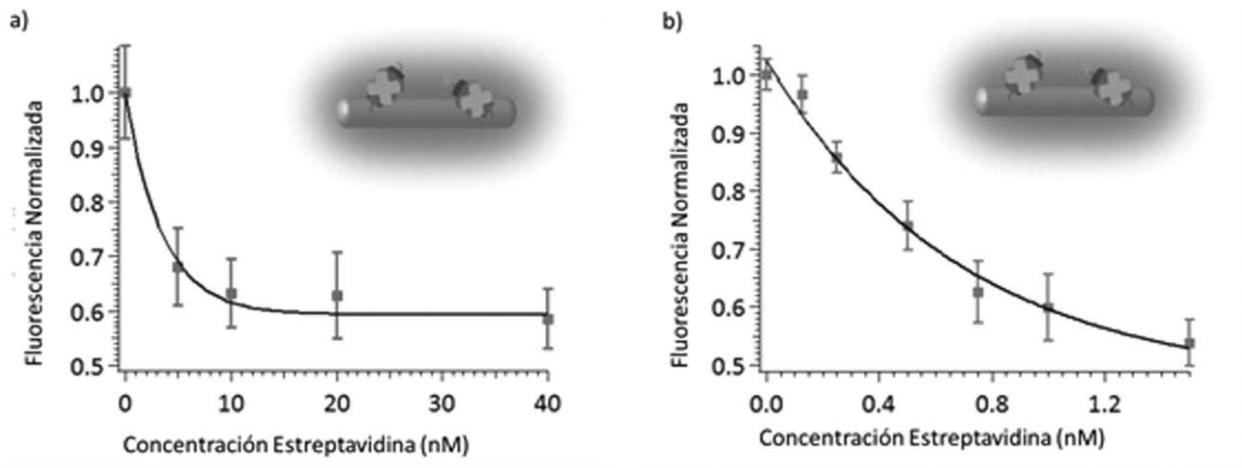


Fig 9. Ensayo sandwich basado en la reducción fototérmica de fluorescencia. Emisión de fluorescencia reducida con 600 kW/cm² de luz NIR en función de la concentración de estreptavidina para los ensayos compuestos por: a) 1nM de AuNR-biotina + 80nM AlexaFluor546-biotina y b) 1nM AuNR-biotina + 5 nM AlexaFluor546-biotina. 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 (185 pg/ml) y b) 0.7 nM (36 pg/ml).

Conclusiones

En primer lugar se demostró que es posible mediante el calentamiento plasmónico de AuNR en solución y fijadas, 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.

Se observó además que es posible detectar concentraciones subnanomolar 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 esféricas [16].

De esta forma al combinar ambas contribuciones (transferencia de energía al metal más efecto fototérmico) se podría obtener una sensibilidad mayor aún.

Materiales y Métodos

Marcación de NPs con fluoróforos para experimentos en gota: Se realizó una marcación 1:300 NP:Fluoróforo en PBS. Se utilizaron AuNR-biotina y fluoróforos con estreptavidina y se dejó reaccionar 90 minutos previo a su utilización.

Preparación de muestras para observación de nanopartículas aisladas: Los cubreobjetos se activaron con HF 0.2%. Luego de lavar apropiadamente se agregó BSA-biotina 1mg/ml con BSA 0.1mg/ml en PBS. Se deja reaccionar 10 horas y se agrega estreptavidina 1 mg/ml y transcurrida una hora se lava con PBS. Por último se colocan los AuNR-biotina y se deja reaccionar 2 horas, se lava el exceso y se agrega el fluoróforo. El exceso se lava luego de 15 minutos.

Arreglo experimental para epifluorescencia: Las mediciones se realizaron en un microscopio Olympus IX71 (Olympus, Japan) de epifluorescencia con un cubo de TRiTC (cubo Olympus con filtros Chroma).

Para colección se utilizó un objetivo Plan Apo (60x, NA 1.42, Olympus, Japan). La señal de fluorescencia es enfocada sobre una cámara iXon-885 EM-CCD (Andor, Belfast, Reino Unido).

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. Un objetivo LUMPLFLN 60x de agua (Olympus) enfoca el haz de calentamiento sobre la muestra.

El láser se moduló con un generador de funciones (RIGOL, DG1022), este generador permite ajustar la frecuencia de la modulación con la que se alimenta el láser.

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 sellar la pérdida de agua.

Simulaciones del campo de temperaturas generado por lo AuNR: Las simulaciones de campos de temperatura fueron realizadas resolviendo numéricamente la ecuación de calor en tres dimensiones, con la fuente. 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). La nanovarilla se centró en el origen (centro de la caja). La fuente 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 diferencias finitas para discretizar el tiempo, para un tiempo total de 150ns, 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 su 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.

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, para evitar pérdidas de material por pegado inespecífico al vidrio, 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.

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 Fig. 8.a).

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 dicróicos 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 dicróicos 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.

Referencias

- [1] R. Roy, S. Hohng & T. Ha, Nat. Methods 5, 507 (2008).
- [2] S. W. Hell & J. Wichmann, Opt. Lett. 19, 780 (1994).

- [3] T. Dertinger, R. Colyer, G. Iyer, S. Weiss & J. Enderlein, PNAS 106, 22287 (2009).
- [4] A. E. Jablonski, R. B. Vegh, J. Hsiang, B. Bommarius, Y. Chen, K. M. Solntsev, A. S. Bommarius, L. M. Tolbert & R. M. Dickson, J. Am. Chem. Soc. 135, 16410 (2013).
- [5] G. Marriott, S. Mao, T. Sakata, J. Ran, D. K. Jackson, C. Petchprayoon, T. J. Gomez, E. Warp, O. Tulyathan, H. L. Aaron, E. Y. Isacoff & Y. Yan, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 105, 17789 (2008).
- [6] Z. Krpetić, P. Nativo, V. Sée, I. a Prior, M. Brust & M. Volk, Nano Lett. 10, 4549 (2010).
- [7] D. Bartczak, O. L. Muskens, T. M. Millar, T. Sanchez-Elsner & A. G. Kanaras, Nano Lett. 11, 1358 (2011).
- [8] a S. Urban, M. Fedoruk, M. R. Horton, J. O. Rädler, F. D. Stefani & J. Feldmann, Nano Lett. 9, 2903 (2009).
- [9] A. G. Skirtach, C. Dejughnat, D. Braun, A. S. Sussha, A. L. Rogach, W. J. Parak, H. Möhwald & G. B. Sukhorukov, Nano Lett. 5, 1371 (2005).
- [10] J. Stehr, C. Hrelescu, R. A. Sperling, G. Raschke, M. Wunderlich, A. Nichtl, D. Heindl, K. Kurzinger, W. J. Parak, T. A. Klar & J. Feldmann, Nano Lett. 8, 619 (2008).
- [11] L. R. Hirsch, R. J. Stafford, J. A. Bankson, S. R. Sershen, B. Rivera, R. E. Price, J. D. Hazle, N. J. Halas & J. L. West, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100, 13549 (2003).
- [12] T. K. Sau, A. S. Urban, S. K. Dondapati, M. Fedoruk, M. R. Horton, A. L. Rogach, F. D. Stefani, J. O. Rädler & J. Feldmann, Colloids Surfaces A, Physicochem. Eng. Asp. 342, 92 (2009).
- [13] A. S. Urban, A. A. Lutich, F. D. Stefani & J. Feldmann, Nano Lett. 10, 4794 (2010).
- [14] C. E. Estrada-Pérez, Ya. Hassan & S. Tan, Rev. Sci. Instrum. 82, 074901 (2011).
- [15] V. K. Natrajan & K. T. Christensen, Meas. Sci. Technol. 20, 015401 (2009).
- [16] S. Mayilo, M. a Kloster, M. Wunderlich, A. Lutich, T. a Klar, A. Nichtl, K. Kürzinger, F. D. Stefani & J. Feldmann, Nano Lett. 9, 4558 (2009).

Trabajo recibido el 14 de abril de 2015
Aceptado el 24 de abril de 2015.