

## NANOSENSORES POTENCIOMÉTRICOS PARA EL ANÁLISIS EN TIEMPO DE REAL DE IONES EN CÉLULAS

Francisco Baños-Costa<sup>1</sup>, Águeda Molinero-Fernández<sup>1</sup>, Gastón A. Crespo<sup>1,2</sup>, María Cuartero<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>UCAM-SENS, Universidad Católica San Antonio de Murcia, UCAM HiTech, 30107 Murcia, España

<sup>2</sup>Department of Chemistry, KTH Royal Institute of Technology, Teknikringen 30, SE-114 28 Estocolmo, Suecia  
mariaquartero@ucam.edu, www.ucam-sens.com, X: @UCAM\_SENS

### Abstract

La monitorización de iones a nivel intracelular es fundamental para comprender ciertas funciones fisiológicas, así como diversas patologías. En UCAM-SENS, la unidad de investigación de sensores químicos de la UCAM, una de nuestras líneas de investigación se enfoca en desarrollar herramientas analíticas para la determinación de iones en medios intra- y extracelulares. En concreto, trabajamos con nanosensores potenciométricos de contacto sólido, por ejemplo, un electrodo selectivo de ion potasio ( $K^+$ ) como electrodo indicador, que, junto con un electrodo de referencia insertado en la misma célula, forman una celda potenciométrica funcional en la nanoescala. Primero se optimizan las condiciones de fabricación de los nanoelectrodos (indicador y referencia) y se evalúan sus características analíticas. Después, la aplicación se demuestra en sistemas celulares, mediante mediciones intracelulares de iones como el  $K^+$ . Se pretende alcanzar la determinación de iones en medios intra y extracelulares, así como sus flujos a nivel celular en presencia de agentes externos que los desencadenen o modifiquen.

### 1. Introducción

La monitorización de iones como el pH, potasio ( $K^+$ ), sodio ( $Na^+$ ), cloruro ( $Cl^-$ ) o bicarbonato ( $HCO_3^-$ ) en medios extra- e intracelulares es de gran relevancia en el estudio de los sistemas biológicos, debido a su papel crítico en la fisiología celular. Los iones están implicados en procesos celulares fundamentales, entre los que se encuentran el establecimiento del potencial de membrana, procesos de señalización celular, actividad enzimática y comunicación intercelular [1,2]. Estudios recientes han demostrado que células de un mismo tipo, previamente consideradas idénticas en todos los niveles, presentan características y comportamientos diferentes. Esta heterogeneidad es un factor clave en procesos complejos como el desarrollo de patologías e interacción con el medio, así como en la respuesta a ciertos tratamientos clínicos como la quimioterapia. En concreto, se cree que la monitorización de iones a nivel de una sola célula puede ayudar a descifrar la complejidad del comportamiento de células sanas o que cursan algún tipo de enfermedad cuando se encuentran en una misma muestra celular aparentemente homogénea [3].

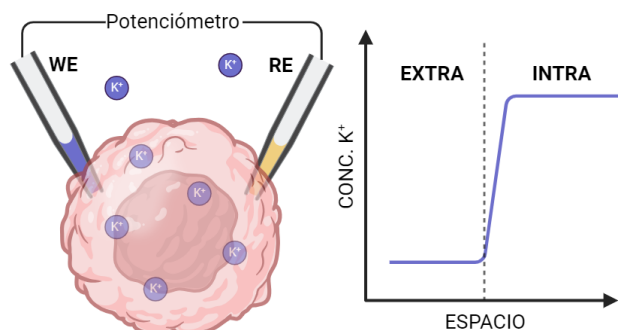
Además, la determinación de iones en células individuales tiene un papel importante en el descubrimiento y

desarrollo de fármacos. Muchos agentes farmacéuticos actúan sobre transportadores y canales iónicos, por lo que la medición precisa de las concentraciones de iones permitiría demostrar su eficacia y seguridad antes de su testeo en sistemas biológicos más complejos. Así, los investigadores, especialmente en el área clínica, pueden beneficiarse de este tipo de análisis para identificar nuevas dianas farmacológicas, cribar posibles terapias y predecir con mayor precisión las respuestas individuales a un tratamiento, permitiendo el desarrollo de tratamientos personalizados [4].

Para hacer frente a la necesidad de obtener información a los niveles descritos, es necesario disponer de herramientas analíticas miniaturizadas que sean suficientemente sensibles, específicas, y que ofrezcan tiempos de respuesta cortos, así como permitir una monitorización *in situ* (en medios extra- e intracelular) con gran resolución espaciotemporal, sin generar interrupciones en el sistema (la célula). En este sentido, los nanosensores potenciométricos en forma de electrodos selectivos de iones (Ion-selective electrodes, ISEs) de contacto sólido se proponen como herramientas innovadoras para la detección y monitoreo de iones en sistemas biológicos a nivel celular, demostrándose por primera vez para la detección de pH [5]. A diferencia de los sensores potenciométricos clásicos (es decir, los que contienen un elemento de referencia interno con parte líquida), los ISEs de contacto sólido eliminan la necesidad de disoluciones internas, lo que aporta ventajas significativas. Por una parte, son más fáciles de fabricar y miniaturizar a nivel micro y nano. También, esta configuración presenta una mayor estabilidad a largo plazo gracias a la ausencia de componentes líquidos que puedan evaporarse o filtrarse a la muestra, ofreciendo una mayor durabilidad y tiempo de vida útil, a la vez que respetando la integridad de la muestra que se mide [6,7].

Los nanosensores potenciométricos que estamos desarrollando en UCAM-SENS están basados en nanopipetas de carbono a las que se le incorpora una membrana selectiva al ion analito (por ejemplo,  $K^+$ ) a nivel de nanoporo. Esta nueva generación de sensores ofrece una plataforma robusta y versátil para la detección precisa de iones que sean fisiológicamente relevantes. La morfología y dimensiones de los electrodos permiten atravesar la membrana celular sin perturbar la función fisiológica normal de la célula, permitiendo así ver cambios intracelulares en tiempo real y en continuo [8]. En concreto, tanto el electrodo indicador como el de referencia necesarios para la medida potenciométrica se

insertan dentro de la misma célula, donde se pueden medir cambios en la concentración de iones como respuestas a estímulos externos. Además, se puede trazar el perfil de concentración del ion cuando los electrodos se mueven desde el espacio extracelular al intracelular y viceversa (Fig. 1).

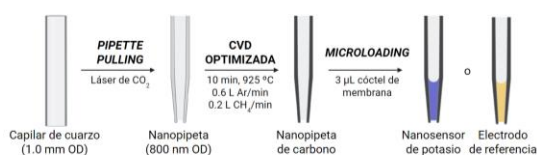


**Fig. 1.** Representación esquemática de una medida potenciométrica de  $K^+$  a nivel celular, así como el perfil espacial de concentración que se espera (de menor a mayor concentración de  $K^+$  pasando del medio extra- al intracelular). Figura creada con BioRender.

## 2. Metodología

### 2.1. Fabricación del electrodo selectivo de $K^+$ y el electrodo de referencia

La fabricación de los electrodos a partir de nanopipetas de carbono se basa en un protocolo desarrollado en colaboración con el laboratorio del Prof. Dr. Andrew Ewing (Universidad de Gotemburgo, Suecia) y que se resume en la Fig. 2 [5]. El electrodo indicador está constituido por una membrana selectiva a un ion, así como una capa interna de carbono que proporciona conducción a la nanopipeta y actúa a su vez como contacto sólido en el proceso de transducción (típicamente descrito en potencimetría). La membrana selectiva de ion, en este caso  $K^+$ , está compuesta por poliuretano (32.5% en peso), sebacato de dioctilo (65%), valinomicina (2.2%) y tetrakis-[3,5-bis-(trifluorometil)-fenil]-borato de potasio (0.9%) disueltos en 2 mL de tetrahidrofurano. Estos compuestos actúan como matriz polimérica plastificada, ionóforo (receptor selectivo) de  $K^+$  e intercambiador iónico, respectivamente. El electrodo de referencia tiene la misma estructura, pero se utiliza una membrana de referencia basada en un coloide de plata (butiral de polivinilo al 34% en peso, NaCl al 44% y  $AgNO_3$  al 22%, disueltos en 1 mL de metanol que se expone a luz UV para facilitar la reducción de  $AgCl$  a plata metálica) [5].



**Fig. 2.** Esquema del proceso de fabricación de nanosensores potenciométricos basados en nanopipetas de carbono. CVD: deposición química de vapor (por sus siglas en inglés). Figura creada con BioRender.

Partiendo de capilares de cuarzo (1.0 mm O.D., 0.7 mm I.D., Sutter Instrument, Novato, EE. UU.), se producen nanopipetas de 800 nm con un *puller* de láser de  $CO_2$  (P-2000, Sutter Instrument). El diámetro de la punta se comprueba mediante microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM Apreo S, Thermo Fisher Scientific) (Fig. 3A). Posteriormente, se deposita una capa de carbono en el interior de las nanopipetas mediante un proceso de deposición química de vapor (CVD, por sus siglas en inglés), pasando un gas precursor de carbono (como es el metano,  $CH_4$ ) a través de un tubo estanco bajo una atmósfera inerte de argón (Ar).

Posteriormente, las nanopipetas de carbono se rellenan con volúmenes específicos de la membrana correspondiente, la selectiva de  $K^+$  o la de referencia. Para ello se utilizan *microloaders* (BIOZOL, Múnich, Alemania) que se instalan en el orificio trasero de la micropipeta, y se deja evaporar el disolvente de la membrana con la punta de la pipeta dispuesta hacia abajo durante 24 horas. Entonces, se realiza una observación de la membrana al microscopio óptico para comprobar su homogeneidad y correcta deposición, alcanzando el nanoporo (Fig. 3B). Convenientemente, las condiciones de deposición del carbono resultan en una capa translúcida, lo que permite inspeccionar el interior de la nanopipeta usando la fuente de iluminación del microscopio.

Finalmente, los electrodos selectivos a  $K^+$  se acondicionan en una disolución de KCl 0.1 M durante 24 horas, y los de referencia en una disolución de KCl 3M durante una semana.

### 2.2. Medidas potenciométricas

La fuerza electromotriz (EMF por sus siglas en inglés) de la celda electroquímica formada entre los electrodos indicador y de referencia cuando se introducen en la muestra se midió usando un potenciómetro de 16 canales (Lawson Labs, Malvern, EE. UU.). El nanoelectrodo de  $K^+$  y el de referencia se conectaron al potenciómetro por un cable compuesto por la conexión BNC, una pinza de cocodrilo y un hilo de acero inoxidable (diámetro 0.5 mm, Thermo Fisher Scientific) situado en el interior de las nanopipetas de carbono.

El estudio *in vitro* de la respuesta dinámica del nanoelectrodo de  $K^+$  se llevó a cabo mediante el método de adiciones estándar, utilizando KCl y un electrodo de referencia comercial de unión doble  $Ag/AgCl$  (disolución externa: LiOAc 1 M; disolución interna: KCl 3M; 6.0726.100 Metrohm Nordic, Suecia). Por su parte, la calibración del nanosensores previamente a las medidas intracelulares en células (por ejemplo, oocitos de *Xenopus laevis*) se realizó introduciendo sucesivamente el nanosensores (es decir, electrodo de  $K^+$  y el de referencia) en 3 disoluciones de KCl, abarcando el rango esperado en los medios extra- e intracelulares (1 mM – 150 mM), y registrando el EMF de cada disolución. Los coeficientes de actividad usados en las calibraciones se calcularon teniendo en cuenta la aproximación de Debye-Hückel.

Los oocitos de *Xenopus laevis* (diámetro 1.1. mm y predominantemente en etapa VI de desarrollo) se

obtuvieron en través de Ecocyte Bioscience (Dortmund, Alemania). Estos fueron conservados en placas de Petri a 5 °C en medio modificado de Barth, piruvato 1 mM y gentamicina 50 µg/mL hasta la realización de los experimentos. Las medidas intracelulares se realizaron aproximando los dos electrodos a la vez en direcciones opuestas hasta su introducción en el medio intracelular en la misma célula (Fig. 3C). Este proceso se monitoriza gracias a un cambio en la EMF y a una deformación leve y no dañina de la membrana debido a la presión aplicada.

La instrumentación utilizada para las medidas en oocitos incluye 2 sistemas de micromanipulación de 3 ejes (MMO-4, Narishige, London, UK) y el microscopio invertido Nikon Eclipse Ti2-E (Nikon Instrument, Amstelveen, Países Bajos) que facilita el control de la posición de los electrodos en tiempo real.

### 3. Resultados

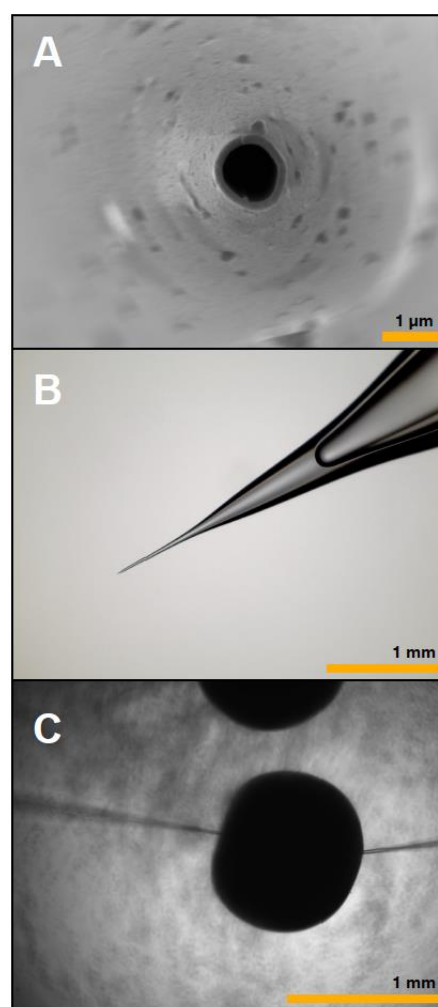
#### 3.1. Optimización de la fabricación de los nanosensores

El proceso de CVD utilizado para depositar la capa interna de carbono en las nanopipetas de cuarzo tuvo que ser optimizado al usar un horno con un diámetro de tubo y longitud de la zona de calentamiento diferentes a los de nuestro trabajo previo [5]. Los parámetros que se han trabajado son: 1) diámetro interno del tubo, 2) tiempo de deposición, 3) flujo de gas total, 4) relación CH<sub>4</sub>/Ar y 5) temperatura del horno. El objetivo de esta optimización era la deposición de una capa de carbono en el interior de las nanopipetas y no en el exterior, y sin bloquear el nanoporo de la punta. Se encontró que, a temperaturas superiores a 850 °C, ocurre la descomposición térmica del metano en carbono. Esta descomposición en la cara interna de la pipeta se debe a que las moléculas de metano se mueven a menor velocidad dentro que fuera de esta, por lo que su tiempo de residencia y número de colisiones contra las paredes aumenta, superando así la barrera de energía necesaria para su descomposición en carbono [9]. El diámetro interno del tubo del horno resultó ser un factor determinante para conseguir la selectividad necesaria en la deposición. Al reducirlo de los 50 mm iniciales a 25 mm, se aumentó la velocidad lineal del gas precursor fuera de las nanopipetas, reduciendo su tiempo de residencia y, en consecuencia, no depositándose carbono en la cara externa.

#### 3.2. Caracterización *in vitro* del nanosensor de K<sup>+</sup>

El nanoelectrodo selectivo de K<sup>+</sup> se caracterizó primero *in vitro* frente a un electrodo de referencia comercial, para demostrar la eficiencia de los diferentes pasos de su fabricación. Después, se obtuvieron de forma sistemática las figuras analíticas de mérito: sensibilidad, rango lineal, respuesta en los medio extra- e intracelular (efecto matriz), reproducibilidad, repetibilidad, reversibilidad, tiempo de respuesta y estabilidad. Se buscaba que el nanoelectrodo responda de acuerdo a la ecuación de Nernst (es decir, pendiente próxima a 59 mV por década de concentración de K<sup>+</sup>) en el rango de concentración de

K<sup>+</sup> de 1–150 mM (lo que incluye los niveles celulares), con un tiempo de respuesta de no más de una decena segundos (para ser capaz de monitorizar cambios de concentración en respuesta a estímulos externos) y una buena reversibilidad y estabilidad (variaciones menores del 5%) que garantice la veracidad y precisión de las medidas. Así, la optimización del proceso de fabricación se enfocó a la obtención de dichos requisitos. Además, se realizó un estudio de selectividad que para demostrar la posibilidad de su utilización en presencia de las diferentes interferencias iónicas que se esperan en el entorno celular tanto intra-, como extracelular. Por ejemplo, Na<sup>+</sup> (10–15 mM), Mg<sup>2+</sup> (0.5–11 mM), PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> (60 mM) y Ca<sup>2+</sup> (0.1 mM) para medidas intracelulares, y Na<sup>+</sup> (140–150 mM), HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (27–28 mM) y Ca<sup>2+</sup> (1–2.5 mM) para medidas extracelulares.



**Fig. 3.** A: Imagen FESEM mostrando la punta de la nanopipeta. B: Micrografía óptica mostrando la membrana selectiva a iones dentro de una nanopipeta. C: Micrografía óptica mostrando dos electrodos dentro de un oocito de *Xenopus laevis*.

Después, se caracterizó el nanoelectrodo de referencia. Para ello se investigó su estabilidad a concentraciones crecientes de Cl<sup>-</sup> (10<sup>-5</sup>–10<sup>-1</sup> M), y a un pH en el rango fisiológico (6.0–8.5). El objetivo es que el nanoelectrodo de referencia no responda antes estas variaciones que pueden

existir entre los espacios extra- e intracelulares. Además, se estudió su estabilidad a medio plazo (2 h) obteniéndose una deriva aceptable en cuanto a suponer un error significativo en las medidas finales de concentración. Una vez que se constató la adecuación del electrodo de referencia, este se utilizó junto con el indicador para unos calibrados de  $K^+$  en fondo de tampón fosfato salino y en disolución isotónica, confirmándose que la respuesta nernstiana se mantenía independientemente del electrodo de referencia, así como del medio utilizado. Es decir, que el electrodo de referencia comercial y el nanoelectrodo de referencia desarrollado tenían las mismas prestaciones, y que estas eran independientes del medio matriz de la muestra.

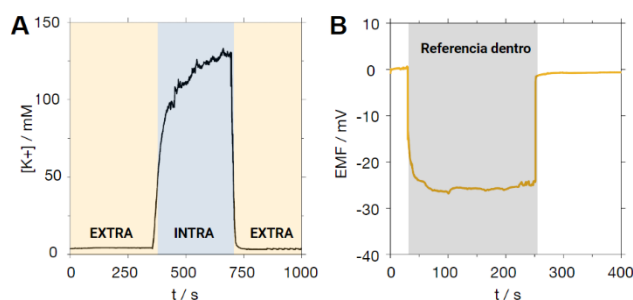
### 3.3. Detección de $K^+$ en medios celulares

En cuanto a la aplicación de los sensores en medidas intracelulares, se realizó una primera aproximación usando como modelo celular oocitos de *Xenopus laevis* comerciales. Los oocitos de *Xenopus laevis* son usados como para tal fin debido a: i) tamaño elevado en comparación con otras células, y ii) capacidad para expresar canales iónicos. Así, estas células tienen un diámetro en torno a 1 mm, lo que facilita la inserción de varios electrodos y llevar a cabo medidas intracelulares. Además, son robustas y han sido ampliamente empleadas para técnicas electrofisiológicas [10]. Por todo ello, fueron seleccionadas como modelo biológico para estudios preliminares de aplicabilidad de nuestros sensores en sistemas *in vivo*. La idea es expandir la tecnología a otros tipos de células en un futuro próximo.

Con el objetivo de validar nuestras medidas, se valoró el empleo de fluoróforos comerciales selectivos para  $K^+$ . Estas sondas fluorescentes intracelulares son herramientas ampliamente utilizadas para estudiar procesos dentro de las células debido a su alta sensibilidad, especificidad y capacidad para proporcionar información espacial y temporal en tiempo real. Sin embargo, el sistema biológico seleccionado se caracteriza por una opacidad parcial que dificulta la observación directa del interior del oocito, lo que impide la validación de los resultados. Aunque se espera poder utilizar esta estrategia en estudios futuros con otros tipos de células, esto resalta el gran potencial de nuestros sensores para monitorizar iones intracelulares en una amplia variedad de sistemas biológicos. Además, estas sondas fluorimétricas suelen presentar problemas como el fotoblanqueo y la fototoxicidad, inconvenientes que son completamente evitados con el uso de las nanopipetas presentadas en este trabajo.

En la Fig. 4A se observa un perfil de concentración de  $K^+$  cuando se va desde el medio extracelular al intracelular y viceversa. La concentración de  $K^+$  pasa de en torno a 5 mM hasta 125 mM, para después volver a los valores iniciales. Este retorno demuestra la reversibilidad del nanosensor. Además, las observaciones cuantitativas están en concordancia con determinaciones previas de la concentración de  $K^+$  intracelular ( $108 \pm 12$  mM) por medio de otras técnicas analíticas [10].

Es importante mencionar que se comprobó la integridad de las células después de la inserción con el nanosensor observando el potencial de membrana al introducir solo el electrodo de referencia. Esta integridad es esencial para poder estudiar flujos de iones y el efecto de fármacos en la actividad de canales iónicos. Básicamente, cuando el electrodo indicador está dentro de la célula y el de referencia fuera (y viceversa), el EMF que mide el sistema tiene que coincidir con el potencial de membrana de la célula correspondiente. Como se muestra en la Fig. 4B, se observa una diferencia de potencial de alrededor de  $-25$  mV. En *Xenopus laevis*, este potencial de membrana varía en los diferentes estados de desarrollo de los oocitos, y el valor encontrado se encuadra entre los publicados en la bibliografía [10].



**Fig. 4. A:** Perfil dinámico de concentración de  $K^+$  pasando del medio extra- al intracelular y viceversa en oocitos de *Xenopus laevis*. **B:** Observación del potencial de membrana cuando se inserta el electrodo de referencia en un oocito (zona gris de la figura).

## 4. Conclusiones

Se ha desarrollado un nanosensor potenciométrico basado en nanopipetas de carbono para la detección de  $K^+$  en sistemas biológicos. Primero, la caracterización *in vitro* de los electrodos indicadores y de referencia se realiza para demostrar la capacidad del nanosensor de monitorizar  $K^+$  en las concentraciones fisiológicas tanto intra- como extra-celulares. Para esto se requiere además un tiempo de respuesta corto, compatible con la detección rápida de fluctuaciones de iones (decenas de segundos), así como la adecuación del electrodo de referencia. Después, la capacidad de medir concentraciones de  $K^+$  en células individuales se evalúa preliminarmente con oocitos de *Xenopus laevis*, lo que permitió observar perfiles de concentración coherentes con estudios previos. Es importante destacar que la robustez de estos nanosensores sostiene su utilidad en el desarrollo de fármacos dirigidos a canales y transportadores iónicos, proporcionando una herramienta analítica avanzada para investigar mecanismos fisiológicos complejos y para aplicaciones biomédicas que requieren una detección precisa de iones.

## Agradecimientos

Esta publicación es parte del proyecto de I+D+i PID2022-140418NA-I00, financiado por

MICIU/AEI/10.13039/501100011033/ y por FEDER/UE. Los autores agradecen a la SEQA y a la revista *Analytical Methods* la concesión del premio al póster presentado en la XXIV Reunión de la Sociedad Española de Química Analítica acerca de este trabajo.

## Referencias

- [1] L. Galera-Laporta, C.J. Comerci, J. Garcia-Ojalvo, G.M. Süel, IonoBiology: The functional dynamics of the intracellular metallome, with lessons from bacteria, *Cell Syst.* 12 (2020) 497-508. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2021.04.011>
- [2] X. Yin, Z. Xue, L. Feng, S. Tan, K. Li, Y. Jiang, Quantitative analysis of biomolecules in single cells by mass spectrometry, *TrAC Trends Anal. Chem.* 171 (2024) 117503. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2023.117503>
- [3] M.A. Zaydman, J.R. Silva, J. Cui, Ion channel associated diseases: overview of molecular mechanisms, *Chem. Rev.* 112 (2012) 6319-6333. <https://doi.org/10.1021/cr300360k>
- [4] M.L. Garcia, G.J. Kaczorowski, Ion channels find a pathway for therapeutic success, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113 (2016) 5472-5474. <https://doi.org/10.1073/pnas.1605669113>
- [5] M. Aref, E. Ranjbari, J.J. García-Guzmán, K. Hu, A. Lork, G.A. Crespo, A.G. Ewing, M. Cuartero, Potentiometric pH nanosensor for intracellular measurements: Real-time and continuous assessment of local gradients, *Anal. Chem.* 93 (2021) 15744-15751. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c03874>
- [6] F. Criscuolo, M.I.N. Hanitra, I. Taurino, S. Carrara, G. De Micheli, All-solid-state ion-selective electrodes: A tutorial for correct practice, *IEEE Sens. J.* 21 (2021) 22143-22154. <https://doi.org/10.1109/jsen.2021.3099209>
- [7] J. Hu, A. Stein, P. Bühlmann, Rational design of all-solid-state ion-selective electrodes and reference electrodes, *TrAC Trends Anal. Chem.* 76 (2016) 102-114. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.11.004>
- [8] X. Zhang, A. Hatamie, A.G. Ewing, Nanoelectrochemical analysis inside a single living cell, *Curr. Opin. Electrochem.* 22 (2020) 94-101. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.coelec.2020.05.008>
- [9] R. Singhal, S. Bhattacharyya, Z. Orynbayeva, E. Vitol, G. Friedman, Y. Gogotsi, Small diameter carbon nanopipettes, *Nanotechnology*, 21 (2009) 015304. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/21/1/015304>
- [10] W.M. Weber, Ion currents of *Xenopus laevis* oocytes: state of the art, *Biochim. Biophys. Acta-Biomembr.* 1421 (1999), 213-233. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(99\)00135-2](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(99)00135-2)