

Evaluación *in vitro* de nanomateriales de carbono para aplicaciones biotecnológicas *In vitro* evaluation of carbon nanomaterials for biotechnological applications

M.E. Guerrero-Llamas^a , L.E. Solís-Delgado^b , L.J. Villarreal-Gómez^c , E. Méndez Valenzuela^b ,
Y. Gochi-Ponce^{a,b,*} 

^a Tecnológico Nacional de México, IT de Tijuana, Departamento de Ingeniería Electrónica, Blvd. Alberto Limón Padilla s/n, Mesa de Otay, C.P. 22500 Tijuana, B.C., México.

^b Tecnológico Nacional de México, IT de Tijuana, Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica, Clz. Del Tecnológico 12950, Tomás Aquino, C.P. 22414, Tijuana, B.C., México.

^c Facultad de Ciencias de la Ingeniería y Tecnología, Universidad Autónoma de Baja California, Blvd. Universitario 1000, Unidad Valle de Las Palmas, C.P. 22260, Tijuana, B. C., México.

Resumen

El estudio se centra en la evaluación de la biocompatibilidad hemolítica *in vitro* de nanomateriales de carbono para aplicaciones biotecnológicas. Se analizaron cinco tipos de nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNTs), los cuales son C, A, AD, P, L, además de óxido de grafeno (OG) en concentraciones de 1, 5 y 10 µg/mL, utilizando eritrocitos de acuerdo con el estándar ASTM F756-13. Los resultados mostraron que la concentración influyó significativamente en la hemólisis ($p < 0.001$), con valores inferiores al 5%, clasificándose como no hemolíticos ($< 2\%$) o levemente hemolíticos (2-5%). El tipo de nanomaterial no tuvo impacto significativo ($p = 0.658$). Todos los nanomateriales cumplieron con los criterios de biocompatibilidad hemolítica respaldados por un modelo estadístico validado por el software minitab17. Por lo que en este trabajo se propone que la seguridad y utilidad se potencializan en aplicaciones como la administración de fármacos dirigidos, la regeneración de tejidos, el desarrollo de biosensores, la creación de dispositivos termorreguladores y/o la integración como biomateriales en la mejora de resistencia y conductividad eléctrica.

Palabras Clave: Nanomateriales, hemólisis, biocompatibilidad, ASTM.

Abstract

This study focuses on the evaluation of the *in vitro* hemolytic biocompatibility of carbon nanomaterials for biotechnological applications. Five types of multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs), namely C, A, AD, P, L, and graphene oxide (OG), were analyzed at concentrations of 1, 5, and 10 µg/mL, using erythrocytes according to the ASTM F756-13 standard. The results showed that the concentration significantly influenced hemolysis ($p < 0.001$), with values lower than 5%, classified as non-hemolytic ($< 2\%$) or mildly hemolytic (2-5%). The type of nanomaterial had no significant impact ($p = 0.658$). All nanomaterials met the hemolytic biocompatibility criteria supported by a statistical model validated by the Minitab17 software. Their safety and usefulness are enhanced in applications such as targeted drug delivery, tissue regeneration, biosensor development, the creation of thermoregulatory devices, and/or their integration as biomaterials to improve resistance and electrical conductivity.

Keywords: Nanomaterials, hemolysis, biocompatibility, ASTM.

1. Introducción

Los nanomateriales de carbono han sido objeto de investigaciones intensivas por más de 30 años, tras el descubrimiento de los nanotubos de carbono de pared múltiple por Sumio Iijima, a partir de láminas de óxido de grafeno (Iijima, 1991). Si bien presentan un gran potencial en biotecnología, aún persisten inquietudes en cuanto a su

biocompatibilidad y toxicidad, precisamente ha surgido un gran debate tanto positivo como negativo de acuerdo con su estructura, características y aplicaciones (Jayaprakash, 2024). Abriendo la puerta a diversos avances en el tema, las contradicciones experimentales provenientes de diferentes factores como la carga superficial, la forma, la longitud, el diámetro, la aglomeración y la pureza, que son difíciles de mantener constantes debido a los diferentes procedimientos de

*Autor para la correspondencia: yadira.gochi@tectijuana.edu.mx

Correo electrónico: m24210052@tectijuana.edu.mx (Miriam Elyzabeth Guerrero Llamas), luis.solis@tectijuana.edu.mx (Luis Ernesto Solís Delgado), eduardo.mendez@tectijuana.edu.mx (Eduardo Méndez Valenzuela), luis.villarreal@uabc.edu.mx (Luis Jesús Villarreal Gómez), yadira.gochi@tectijuana.edu.mx (Yadira Gochi Ponce).

Historial del manuscrito: recibido el 01/07/2025, última versión-revisada recibida el 25/10/2025, aceptado el 21/10/2025, publicado el 25/03/2026. DOI: <https://doi.org/10.29057/icbi.v14iEspecial.15389>.



elaboración que implican establecer análisis más específicos (Ying Liu, Y. Z., 2012). En México, diversos métodos de síntesis se han desarrollado para obtener nanotubos con distintas morfologías mediante técnicas como arco eléctrico, deposición química de vapor, ablación láser y microondas por mencionar algunas; produciendo nanotubos semiconductores o metálicos. Lo que conduce a la realización de uniones mixtas de nanoestructuras (S. Rathinavel, 2021), favoreciendo potenciales aplicaciones como la síntesis por pirólisis simple de nanotubos de carbono de pared múltiple como por ejemplo material de electrodo altamente estable para aplicaciones de supercondensadores (Manoranjan Mandal, 2024). También al integrarse como materiales de sistemas de adsorción criogénica (Teng Pan, 2025). Así como recientemente los puntos cuánticos y nanotubos basados en carbono para aplicaciones de orientación contra el cáncer y administración de fármacos (Sudipta Mondal, 2025). Otras aplicaciones como fabricación y caracterización de nanotubos de carbono para tratamiento de aguas residuales aceitosas (M. Geetha Devi, 2025). La aplicación foliar de nanopartículas de selenio sobre nanotubos de carbono multipared estimula el crecimiento de las plantas y el rendimiento en arroz bajo estrés salino, resaltando la importancia de evaluar su seguridad biológica (Tashima Garg, 2025). Aunque estos nanomateriales potencian el crecimiento y rendimiento de cultivos, su interacción en sistemas biológicos exige evaluar posibles efectos tóxicos en células vivas para garantizar su seguridad. Entre estas pruebas, el análisis hemolítico es crucial, pues permite detectar el daño que los nanomateriales podrían causar a las membranas de los glóbulos rojos, lo cual es un indicador estándar y sensible de biocompatibilidad en modelos celulares. Esta evaluación es vital para evitar riesgos no solo para plantas y ecosistemas, sino también para la salud humana y animal en aplicaciones biotecnológicas futuras.

Los nanotubos de carbono empleados en este trabajo fueron seleccionados debido a su alta relación superficie/volumen, su amplio uso en estudios previos de interacción con membranas biológicas (Xiaoming Li, 2012), así como lo reportado en otros trabajos similares. Esto permite enriquecer la investigación, ofrecer un mejor contexto y relevancia como, por ejemplo, el efecto antiproliferativo en líneas celulares de cáncer de mama y cérvico uterino causado por nanotubos de carbono multipared lectina de *Phaseolus lunatus* var. *silvester* Baudet (Jazmín Aguilar-Vázquez, 2021), la mejora de compuestos biomédicos reforzados con ácido poliláctico fibra de carbono (PLA/CFRC) con rellenos de nanotubos de carbono multipared (MWCNT), el estudio comparativo sobre técnicas de refuerzo (Juan Antonio Paz-González, 2025) y la síntesis de conjugados de oligoetileno lineolida de MWCNT con enlace covalente y su actividad antibacteriana contra cepas bacterianas, por mencionar algunos trabajos de nuestro grupo de investigación (José A. Alatorre-Barajas, 2021). Lo anterior confirma la prueba de hemólisis como primera vertiente biológica segura, lo cual favorece el desarrollo de productos y procesos que benefician a la sociedad en áreas como la medicina, la agricultura, la industria y el medio ambiente. En este contexto, la hemocompatibilidad de los nanomateriales es evaluada mediante ensayos de hemólisis *in vitro*, que representa un indicador fundamental de toxicidad.

La interacción con células humanas particularmente sangre, eritrocitos (glóbulos rojos), es rigurosamente analizado aquí. La hemólisis, entendida por la liberación de hemoglobina se ha empleado para determinar la biocompatibilidad tanto de dispositivos médicos como de materiales con potenciales biotecnológicos de acuerdo con la norma (ASTM F756-13). Un material se considera biocompatible si induce <5% de hemólisis. En este trabajo se propone evaluar el efecto del tipo de nanomaterial y concentración de cinco nanotubos de carbono. Las muestras de nanotubos de pared múltiple se prepararon previamente, así como la comparación de una muestra de óxido de grafeno líquido comercial sobre la estabilidad de los eritrocitos humanos, aportando información relevante para la aplicación segura en el campo biotecnológico.

2. Metodología

Se emplearon métodos estandarizados para evaluar los materiales, garantizando la ejecución controlada de los experimentos y la validez de los resultados obtenidos con el propósito de generar datos confiables y reproducibles.

2.1. Materiales

Se adquirieron cinco tipos de nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNTs): comerciales marca sigma aldrich (C), alineados (A), alineados densos (A.D), purificados (P), lineales (L), y una muestra de óxido de grafeno líquido marca sigma aldrich (OG) con un rango de pureza de 70-90%, cada uno a tres concentraciones diferentes (1, 5, 10 $\mu\text{g/mL}$). Se utilizaron eritrocitos humanos obtenidos de 10 donadores sanos, con previo consentimiento informado y siguiendo los procedimientos de la ISO 10993.

2.2. Preparación de suspensión de eritrocitos

Se extrajeron 50 mL de sangre total anticoagulada con citrato de sodio. Posteriormente, se centrifugó a 1500 rpm durante 10 minutos y se realizaron lavados sucesivos con PBS (pH 7.4). Finalmente, la suspensión de ajustó al 2% como se muestra en el proceso esquematizado en la Figura 1.

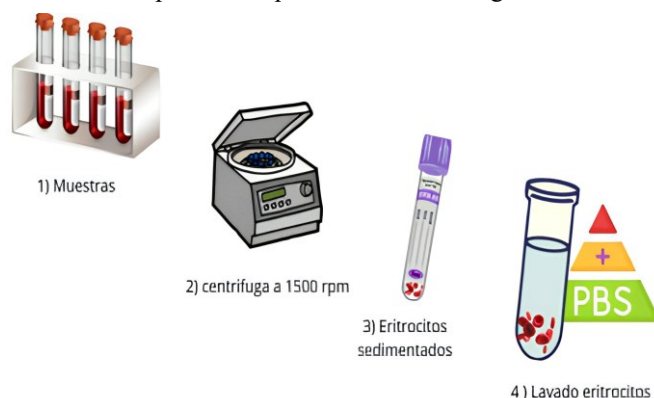


Figura 1: Proceso de suspensión de eritrocitos.

2.3. Preparación de soluciones de nanomateriales

Cada tipo de nanotubo de carbono y el óxido de grafeno líquido, se dispersaron en PBS con 0.05g de polietilenglicol 60 Sigma Aldrich y se sonificaron durante 3 h para preparar soluciones de 1,5 y 10 µg/mL en la Figura 2.

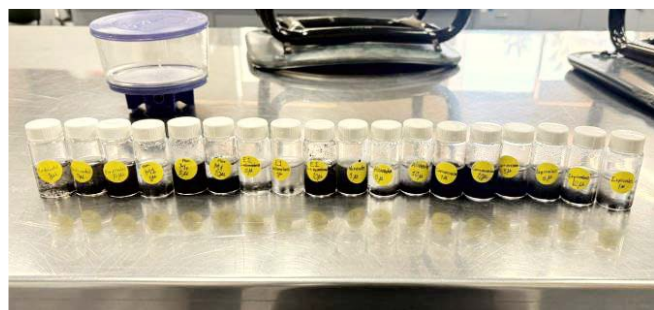


Figura 2: Soluciones de nanomateriales de carbono.

2.4. Procedimiento de hemólisis

Se mezclaron 500 µL de eritrocitos al 2 % con 500 µL de cada solución de nanotubos y óxido de grafeno, se incubaron a 37°C por 3 horas. También se prepararon los controles: PBS (negativo) y agua destilada (positivo). Después de la incubación las muestras se centrifugaron a 1500 rpm por 4 minutos en una centrífuga VWR Clinical 50. Posteriormente, se midió la absorbancia del sobrenadante a 540 nm utilizando un espectrofotómetro UV-Visible SP-UV1000.

2.5. Cálculo del porcentaje hemólisis

Se aplicó la fórmula (1), de acuerdo con la norma ASTM F756-13, donde:

$A_{muestra}$ = Absorbancia promedio de la muestra

F = Coeficiente de correlación 0.9253

C = Concentración total de hemoglobina 212.973

$$\% \text{ hemólisis} = \frac{(A_{muestra} \cdot F)}{C} \quad (1)$$

2.7 Software utilizado

Para evaluar el efecto del nanomaterial de carbono, y la concentración del material, así como la respuesta hemolítica *in vitro*, se utilizó un análisis estadístico mediante un modelo lineal general, utilizando software Minitab 17 (Minitab, Inc., 2014). Esta metodología permitió determinar el efecto individual de cada factor experimental sobre el porcentaje de hemólisis observado. Se presentan los resultados del análisis de varianza (ANOVA), los cuales permiten identificar que variables influyen significativamente en la respuesta biológica obtenida. El proceso estadístico se ilustra en la Figura 3.



Figura 3: Diagrama de proceso estadístico.

3. Resultados y discusión

Los valores de absorbancia que representan la liberación de hemoglobina de los eritrocitos tras el contacto con los nanomateriales mediante el análisis de Espectroscopia UV-vis, permitieron calcular el porcentaje de hemólisis mediante la ASTM F756-13 y evaluar la biocompatibilidad hemática de los materiales. En la Tabla 1.

Tabla 1 Valores de absorbancias.

Nanomateriales	1 µL Rep 1	1 µL Rep 2	1 µL Rep 3
C	0.290	0.183	0.230
A	0.930	0.960	0.665
AD	0.001	0.870	0.587
P	0.148	0.640	0.359
L	0.678	0.570	0.572
OG	0.890	0.780	0.873
Nanomateriales	5 µL Rep 1	5 µL Rep 2	5 µL Rep 3
C	0.175	0.285	0.187
A	0.125	0.125	0.125
AD	0.108	0.105	0.118
P	0.523	0.042	0.135
L	0.046	0.165	0.352
OG	0.124	0.124	0.123
Nanomateriales	10µL Rep 1	10µL Rep 2	10 µL Rep 3
C	0.245	0.228	0.225
A	0.122	0.122	0.122
AD	0.123	0.123	0.123
P	0.030	0.058	0.134
L	0.188	0.126	0.251
OG	0.122	0.122	0.122

Los resultados establecen que la mayoría de las muestras presentan valores menores al 2 %, el óxido de grafeno líquido (OG) y los nanotubos lineales (L) fueron los únicos que se acercaron a ese límite en concentraciones bajas, no obstante, los nanotubos alineados densos (A.D) y purificados (P) mostraron los niveles menores.

Como se presenta en la siguiente Tabla 2 Porcentaje promedio de hemólisis según norma ASTM F756-13.

Tabla 2 Porcentaje de hemólisis.

Nanomateriales 1 µg/mL	Hemólisis %
C	0.102
A	0.289
AD	0.255
P	0.155
L	0.248
OG	0.379

Nanomateriales 5 µg/mL	Hemólisis %
C	0.081
A	0.054
AD	0.051
P	0.058
L	0.152
OG	0.053

Nanomateriales 10 µg/mL	Hemólisis %
C	0.091
A	0.053
AD	0.053
P	0.025
L	0.054
OG	0.053

paredes limpias y sin evidencias de residuos metálicos o impurezas superficiales, Lineales (L) nanotubos distribuidos de forma individual o en pequeños haces, evidenciando una menor interacción entre ellos. Esta morfología facilita la identificación del diámetro y la longitud individual, además de permitir la visualización clara de las paredes y la estructura tubular y el Óxido de grafeno (OG) láminas delgadas, flexibles y parcialmente traslapadas, con bordes irregulares y pliegues característicos. La morfología laminar y la presencia de pliegues son indicativas de una exfoliación parcial y de la existencia de grupos oxigenados que confieren al material una mayor hidrofobicidad y capacidad de interacción con biomoléculas. En la Figura 4.

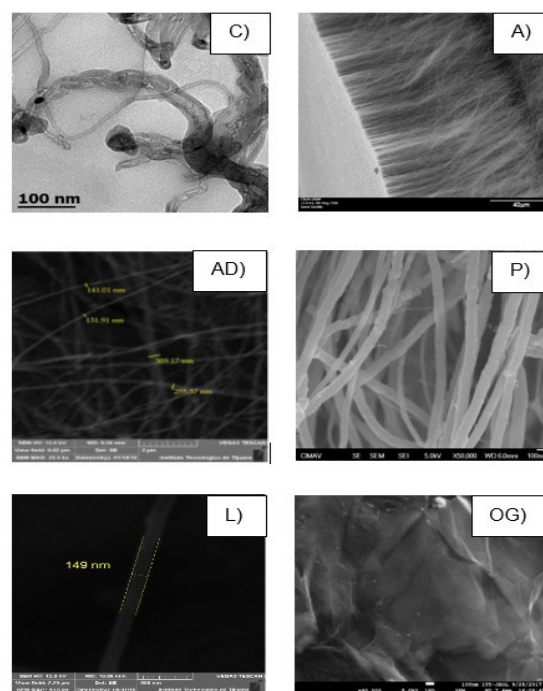


Figura 4: Morfología observada mediante microscopía electrónica de barrido: (C): Comerciales, (A): Alineados, (A.D): Alineados densos, (P): Purificados (L): Lineales (OG): Óxido de grafeno.

3.1. Microscopia electrónica de barrido (SEM)

En la micrografía SEM se observa la morfología característica de los nanotubos de carbono de pared múltiple, mediante estructuras fibrosas con diámetros nanométricos de 10 nm y longitudes en el rango micrométrico 1-5 µm de largo. El cual permitió identificar diferencias estructurales relevantes entre los distintos tipos de nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNTs) se identificaron óxido de grafeno (OG). Estas variaciones reflejan las condiciones de síntesis, confirmando que las muestras presentan una morfología dependiente del tratamiento y tipo de nanotubo, donde la densidad y pureza determinan en gran medida la estructura observada. Los nanotubos de carbono comerciales (C) de morfología heterogénea, con nanotubos entrelazados, aglomerados y presencia aparente de partículas residuales o carbono amorfo. Esta irregularidad sugiere un material sin tratamiento adicional, los nanotubos Alineados (A) de manera paralela o con orientación preferencial. Esta disposición confirma un crecimiento controlado, Alineados Densos (A.D) con un empaquetamiento más cerrado y menor separación entre los tubos, Purificados (P) nanotubos más definidos, con

3.2. Análisis estadístico

Se utilizó un diseño de experimentos Modelo Lineal General análisis de varianza (ANOVA de dos factores) con tres réplicas de las muestras, cuyas absorbancias fueron medidas por triplicado.

El análisis demostró que la concentración tuvo un efecto significativo ($p < 0.001$) lo que indica que, a mayor concentración, aumenta el impacto sobre la hemólisis. Por otro lado, el tipo de nanomaterial no tuvo un efecto estadísticamente significativo sobre la hemólisis ($p = 0.658$) como se presenta en las Figuras 5 y 6 mediante la gráfica de efectos principales se pueden observar diferencias aparentes entre los tipos de nanomateriales, pero el análisis de varianza revela que dichas variaciones no fueron estadísticamente significativas, lo que sugiere que el tipo de nanomaterial no influyó de manera concluyente sobre el porcentaje de hemólisis.

Por el contrario, la concentración sí reveló un efecto significativo, confirmando que el aumento en la concentración incrementa el grado de hemólisis. Para la gráfica de interacción en la que su función es mostrar cómo el efecto de un factor (la concentración) depende o no del otro factor (el tipo de nanomaterial). Se exhibe cómo cambia la hemólisis a medida que aumenta la concentración para cada tipo de material. Esto significa que todos los nanomateriales responden de manera similar al cambio de concentración. Por eso el software indica que no existe interacción significativa entre tipo y concentración, que el efecto importante proviene solo de la concentración. Esto señala que independientemente al tipo de nanomaterial de carbono utilizado no se observaron diferencias importantes en el porcentaje de hemólisis. El modelo presentó una R^2 ajustada del 41.61%, válida para inferencias preliminares.

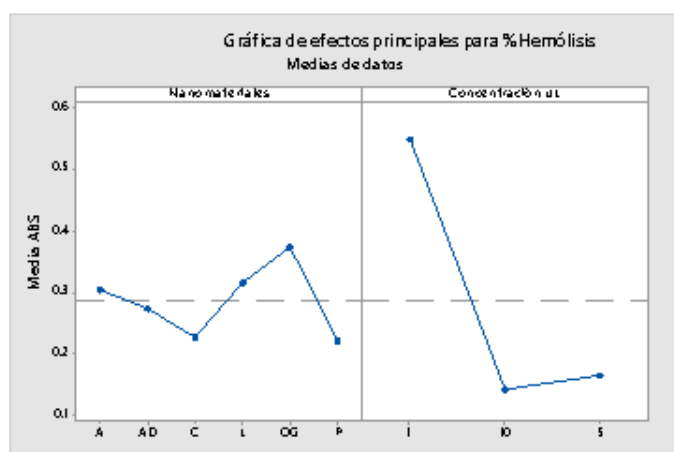


Figura 5 Efectos principales para el porcentaje de hemólisis.

3.3. Evaluación de residuos

Las gráficas de diagnóstico presentadas en la Figura 7 a) Gráfica de probabilidad normal: siguen aproximadamente una línea recta, lo que sugiere que se cumple razonablemente con el supuesto de normalidad, b) Gráfica Residuos Vs valores ajustados: Permiten evaluar la homocedasticidad es decir si la varianza de los residuos es constante a lo largo de los valores predichos esto observa una ligera dispersión creciente, c) El histograma de residuos tiene forma aproximadamente simétrica y centrada en cero, sin sesgo evidente. Esto refuerza el cumplimiento con la normalidad de los errores y respalda la confiabilidad del modelo ajustado, d) Esta gráfica vs Orden evalúa la independencia de los residuos en función del orden en que se recolectaron las observaciones. Aunque se detectan algunos patrones repetitivos no se observan tendencias sistemáticas fuertes. Por lo que las gráficas de residuos siguen una distribución aproximadamente normal y no presentan sesgos graves. Esto valida el modelo aplicado, al cumplir razonablemente con los supuestos de normalidad, homocedasticidad e independencia de los residuos, lo cual permite utilizar el modelo con confianza para interpretar los efectos de los factores sobre el porcentaje de hemólisis.

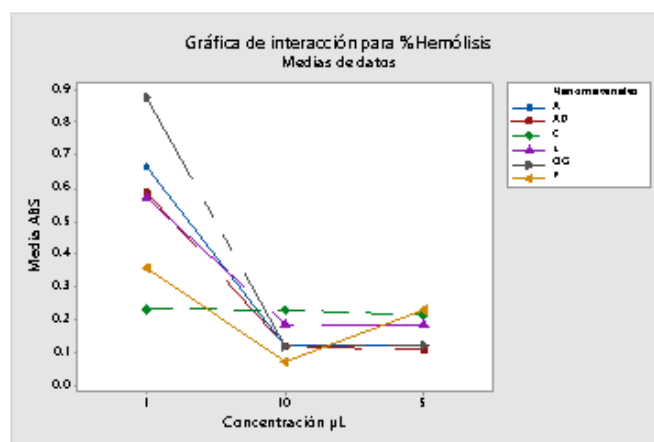


Figura 6: Interacciones para el porcentaje de hemólisis.

4. Conclusiones

El estudio demuestra que la concentración de nanomateriales de carbono tiene un efecto considerable sobre la hemólisis en eritrocitos humanos. El tipo específico de nanotubos no influye significativamente en la toxicidad hemolítica. Estos resultados indican que, dentro del rango estudiado, los nanotubos y óxido de grafeno presentaron una biocompatibilidad hemolítica aceptable, con valores menores al 5% permitiendo su potencial aplicación segura en biotecnología. Se confirmó la validación del Modelo Lineal General mediante los supuestos de normalidad, homocedasticidad e independencia de los residuos, lo cual permite utilizar el modelo con confianza para interpretar los efectos de los factores sobre el porcentaje de hemólisis.

La metodología empleada en este trabajo sirve como base preliminar para estudios más profundos que incluyan pruebas adicionales de citotoxicidad y caracterización fisicoquímica más detallada para validar su uso en aplicaciones biomédicas y ambientales.

Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo económico recibido del proyecto TecNM clave 22448.25-P, así como la colaboración de los alumnos de Posgrado involucrados en este trabajo del IT de Oaxaca e IT de Tijuana, así como el apoyo técnico del Dr. Francisco Paraguay Delgado del CIMAV y Dr. Gabriel Alonso-Núñez del CNYN-UNAM.

Referencias

- ASTM. *ASTM F756-13 Standard Practice for Assessment of Hemolytic Properties of Materials*; (2000). DOI: 10.1520/F0756-13. Copyright International Organization for Standardization. *Biological evaluation of medical devices — Part 4: Selection of tests for interactions with blood* (ISO 10993-4:2023). Geneva: ISO, (2023).
- Iijima, S. (1991). Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature*, 56–58. DOI: 10.1038/354056a0
- Jayaprakash, N. E. (2024). Carbon nanomaterials: Revolutionizing biomedical applications with promising potential. *Nano Materials Science*. DOI: 10.1016/J.NANOMS.2024.11.004

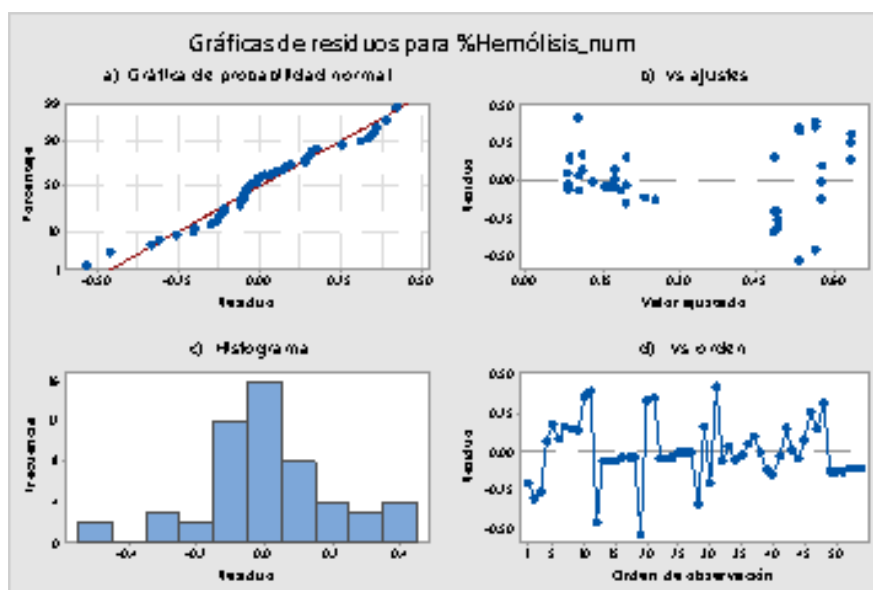


Figura 7: Residuos para el porcentaje de hemólisis: a) Gráfica de probabilidad normal b) Gráfica Residuos Vs valores ajustados c) El histograma d) Residuos vs Orden.

- Jazmín Aguilar-Vázquez, M. d.-C.-P. (2021). Efecto antiproliferativo en líneas celulares de cáncer de mama y cérvicouterino causado por nanotubos de carbono múltipared lectina de *Phaseolus lunatus* var. silvester Baudet. *Revista Biomédica*, 32. DOI: 10.32776/revbiomed.v32i2.863
- José A. Alatorre-Barajas, E. A.-Z.-R.-Z.-T.-P.-A.-N.-L.-N. (2021). Synthesis of covalent bonding MWCNT oligoethylene linezolid conjugates and their antibacterial activity against bacterial strains. 11 (28912–28924.). DOI: 10.1039/d1ra04691h
- Juan Antonio Paz-González, Y. G.-P.-S.-Z.-L.-N.-C.-G. (2025). Enhancing Polylactic Acid/Carbon Fiber-Reinforced Biomedical Composites (PLA/CFRCs) with Multi-Walled Carbon Nanotube (MWCNT) Fillers: A Comparative Study on Reinforcing Techniques. *Journal composites Science*. DOI: 10.3390/jcs9040167
- M. Geetha Devi, M. M.-A. (2025). Fabrication and characterization of carbon nanotubes for oily wastewater treatment applications, Volume 102. DOI: 10.1016/j.jics.2025.101669.
- Manoranjana Mandal, I. A. (2024). Simple pyrolysis synthesis of multi-walled carbon nanotubes as a highly stable electrode material for supercapacitor applications, *Chemical Physics Letters*, Volume 853, 141536. DOI: 10.1016/j.cplett.2024.141536
- Minitab, Inc. (2014). *Minitab 17 Statistical Software* [Computer software]. <https://www.minitab.com>
- Sudipta Mondal, S. D. (2025). Recent progress of carbon-based quantum dots and nanotubes for cancer targeting and drug delivery applications. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, Volume 108, ISSN 1773-2247. DOI: 10.1016/j.jddst.2025.106896.
- Tashima Garg, A. J. (2025). Foliar application of selenium nanoparticles, multiwalled carbon nanotubes and their hybrids stimulate plant growth and yield characters in rice (*Oryza sativa* L.) under salt stress, *Plant Nano Biology*, Volume 11. DOI: 10.1016/j.plana.2025.100146.
- Teng Pan, K. L. (2025). Cryogenic adsorption characteristics of ^3He on carbon nanotubes and the application of adsorption models for ^3He heat switches, *Applied Thermal Engineering*, Volume 276, (ISSN 1359-4311). DOI: 10.1016/j.applthermaleng.2025.126869
- Xiaoming Li, S. C. (2012). Biocompatibility and Toxicity of Nanobiomaterials. *Journal of Nanomaterials*. DOI:10.1155/2012/591278
- Ying Liu, Ying Liu, Y. Z. (2012) Understanding the Toxicity of Carbon. *ACS*, 702-1. DOI: 10.1021/ar300028