

Bio-nanocomposites: nuevos materiales ecológicos, biocompatibles y funcionales

Resumen: Los materiales denominados bio-nanocomposites constituyen un novedoso grupo de compuestos de naturaleza híbrida organo-inorgánica que están basados en el ensamblaje entre polímeros de origen natural y sólidos inorgánicos a través de interacciones a escala nanométrica entre ambos componentes. Al igual que los nanocomposites convencionales basados en polímeros sintéticos, poseen interesantes propiedades mecánicas, térmicas y de barrera al paso de gases, incorporando además el carácter biocompatible y biodegradable asociados al biopolímero. Por ello, estos materiales de naturaleza bio-nanohíbrida pueden recibir aplicación como bioplásticos para el envasado de alimentos, como implantes y sistemas dispensadores de fármacos en biomedicina, e incluso como componentes en dispositivos electroquímicos del tipo de los sensores selectivos y los biosensores cuando el material presenta también otras propiedades funcionales adecuadas.

Introducción

Los materiales complejos constituidos por dos o más fases sólidas reciben comúnmente el nombre de materiales compuestos ("composites"), siendo los más comunes aquellos constituidos por un polímero orgánico que constituye la fase continua (matriz) y un sólido inorgánico como fase dispersa que actúa como agente o carga reforzante del polímero. El resultado de la interacción entre ambos componentes orgánico e inorgánico es un efecto sinérgico que conduce a la mejora de las propiedades del material con respecto a las que muestran los componentes de forma individual. Cuando la fase dispersa presenta al menos una dimensión en la escala nanométrica, estos materiales híbridos de naturaleza organo-inorgánica se denominan "nanocomposites".*[1,2] La nanoestructuración de los componentes incrementa el número de interacciones a nivel nanométrico entre el polímero orgánico y el sólido inorgánico, dando lugar a materiales con propiedades estructurales muy superiores a las de los microcomposites.[3,4] Dependiendo de las propiedades aportadas por el polímero o por el sólido inorgánico, estos materiales híbridos nanoestructurados pueden presentar también propiedades funcionales adecuadas para muy diversas aplicaciones como catalizadores heterogéneos, componentes de sensores químicos y en dispositivos ópticos, opto-electrónicos, magnéticos y electroquímicos.[1,5-9]

Hace ahora dos décadas que se empezó a utilizar el término nanocomposite a raíz de la aparición de varios artículos que describían la preparación de los sistemas polipirrol/FeOCl,[10] nylon/arcilla,[11] poliestireno/fluorohectorita[12] y polióxido de etileno/silicato laminar.[13,14] A partir de estos trabajos, el desarrollo de este tipo de materiales híbridos ha experimentado una progresión espectacular, como demuestra el incremento de publicaciones sobre este tema en los últimos

* El término *nanocomposite* originariamente expresado en inglés se refiere a materiales nanocompuestos (o a nanomateriales compuestos) siendo aceptado prácticamente de forma universal en otros idiomas, incluido el castellano. Análogamente esta terminología es aplicable a los *bio-nanocomposites*.

Instituto de Ciencia de Materiales de Madrid,
CSIC, 28049 Madrid, España
e-mail: darder@icmm.csic.es



Margarita Darder*



Pilar Aranda



Eduardo Ruiz-Hitzky

10 años, que crece desde unos 100 artículos hasta más de 1500 publicaciones científicas por año (base de datos ISI Web of Knowledge). Aunque todavía hay pocas aplicaciones que hayan alcanzado el nivel comercial, existen ya diversos usos que aprovechan las excelentes propiedades estructurales y funcionales de los nanocomposites, principalmente los basados en arcillas.[8,15] En efecto, no se han cumplido todas las expectativas que existían sobre comercialización de nanocomposites para aplicaciones estructurales. Con respecto a las aplicaciones funcionales son cada vez más prometedores los resultados dirigidos a su empleo como materiales de barrera para protección de alimentos, retardantes de llama, componentes en dispositivos ópticos, eléctricos o electroquímicos, así como en diversas aplicaciones biomédicas.

Por ejemplo, su empleo como componentes en automóviles radica en la mejora de propiedades mecánicas como los módulos de flexión y de tensión por efecto de la dispersión de nanopartículas de arcilla en polímeros termoplásticos, sin producir un aumento sensible de peso. En otros casos, también son destacables sus propiedades de barrera al paso de gases, siendo por ello empleados como materiales para envasado de alimentos, almacenaje de líquidos o, incluso, como recubrimiento interno en pelotas de tenis para retardar la pérdida de la presión

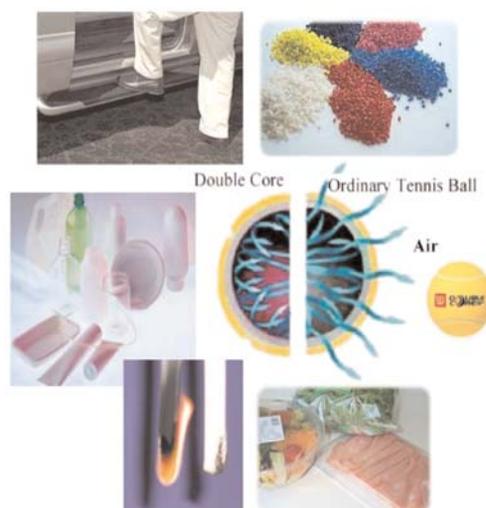


Figura 1. Diversas aplicaciones comerciales de los nanocomposites polímero-arcilla (adaptada de Refs. 8 y 16).

interna inicial y prolongar así su tiempo de uso. Otras aplicaciones están relacionadas con la estabilización de pigmentos para pinturas y recubrimientos, así como con su empleo como retardantes de llama dada la elevada estabilidad térmica de este tipo de materiales (Fig. 1).

En las aplicaciones mencionadas se emplean habitualmente polímeros sintéticos derivados del petróleo como las poliolefinas (polipropileno y polietileno) y poliamidas (nylon), que presentan tiempos largos de degradación y generan residuos muy difíciles de eliminar. Para paliar este inconveniente, varios grupos de investigación han comenzado en la última década a desarrollar nuevos nanocomposites basados en biopolímeros, esto es polímeros disponibles en la naturaleza. La finalidad es producir materiales avanzados que además de presentar las excelentes propiedades mecánicas de los nanocomposites, ofrezcan la ventaja añadida de ser respetuosos con el medio ambiente y biodegradables, además de poder presentar biocompatibilidad y determinadas propiedades funcionales.

Nanocomposites basados en materiales de origen natural

Los polímeros de origen natural comienzan a sustituir parcialmente a los polímeros sintéticos en la preparación de nanocomposites, principalmente en el envasado de alimentos y aplicaciones biomédicas. Los nuevos nanocomposites que se están obteniendo con este concepto son más respetuosos con el medio ambiente y además son reciclables, por lo que han sido denominados nanocomposites verdes (*green nanocomposites*)^[17,18] o bio-nanocomposites.^[19,20] Especialmente relevante es el caso en que el substrato inorgánico es también de origen natural como son los silicatos incluidos en la familia de los minerales de la arcilla.

En muchos casos, los organismos vivos producen nanocomposites naturales, esencialmente con propiedades estructurales o con una finalidad de protección, que presentan una extraordinaria estructuración de sus componentes a nivel nanométrico, como es el caso del nácar,^[21–23] el marfil,^[24,25] el hueso^[26,27] o el exoesqueleto de los crustáceos.^[28] Gran número de los bio-nanocomposites que se están sintetizando pueden considerarse como materiales biomiméticos o bioinspirados, ya que tratan de imitar la disposición jerarquizada de los componentes en estos materiales naturales con el fin de conseguir propiedades análogas.^[29–31] Pero la Naturaleza no solo supone una excelente fuente de inspiración, sino también la fuente de la que podemos extraer los componentes necesarios para la preparación de estos materiales bio-híbridos. Así, podemos establecer tres categorías de biopolímeros según su fuente de obtención: i) los extraídos directamente de la biomasa (celulosa, almidón, pectina, alginato, quitina...); ii) los sintetizados a partir de un monómero bio-derivado (ácido poliláctico); y iii) los producidos por microorganismos (goma xantano, polihidroxibutirato...). La gran abundancia y la disponibilidad de biopolímeros como la celulosa, el almidón o la quitina son otras de las razones que han impulsado a sustituir polímeros no degradables por polímeros de origen natural. Una característica importante de los bio-nanocomposites basados en celulosa, almidón o ácido poliláctico^[17,18,32] es su biodegradabilidad,^[33] gracias a la cual se reducen la producción de residuos y la contaminación am-

biental. Los microorganismos son capaces de descomponer estos materiales en agua y dióxido de carbono, los cuales vuelven así a la naturaleza contribuyendo a un desarrollo sostenible (Fig. 2). Esta cualidad convierte a los bio-nanocomposites, dotados de las propiedades estructurales y funcionales adecuadas, en una excelente alternativa a los nanocomposites no degradables empleados en las industrias del automóvil o en la de alimentos, mencionadas previamente.

Por otra parte, la biocompatibilidad de los polímeros naturales hace que la aplicación de los bio-nanocomposites resultantes pueda extenderse a un área tan vital como es el de la biomedicina.^[35] Así, se están desarrollando materiales que tratan de imitar la composición y la organización del hueso, principalmente basados en hidroxiapatito combinado con colágeno u otras proteínas estructurales, de utilidad para su aplicación como implantes para la regeneración de tejido óseo.^[36–38] Asimismo, son destacables otras aplicaciones biomédicas basadas en el uso de bio-nanocomposites como sistemas para transporte y liberación controlada de fármacos o como vectores no víricos para terapia génica.^[39,40] De este modo, los materiales bio-nanohíbridos pueden encuadrarse en un nuevo campo de investigación ubicado en la frontera de las Ciencias de la Vida, la Ciencia de Materiales y la Nanotecnología.

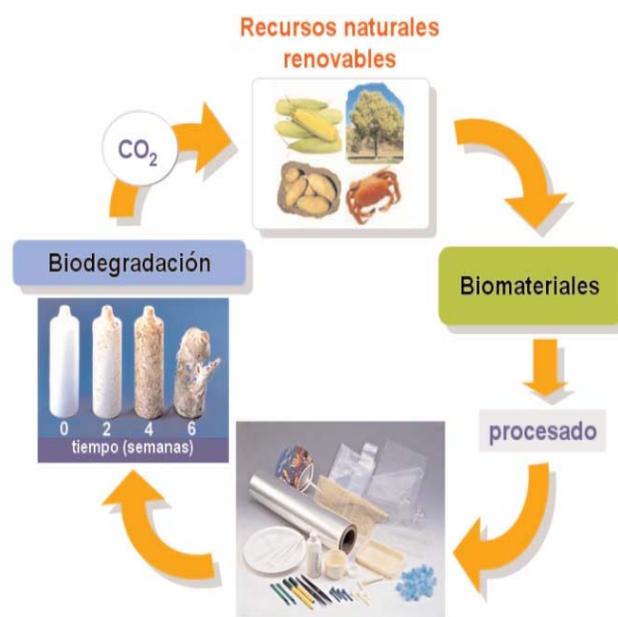


Figura 2. Contribución de los biomateriales al desarrollo sostenible (adaptada de Ref. 34).

Estrategias de síntesis de bio-nanocomposites

Los diferentes tipos de nanocomposites pueden englobarse en cinco familias, según la clasificación establecida por Komarneni.^[1] Así, podemos distinguir entre (i) nanocomposites preparados por el método sol-gel a bajas temperaturas; (ii) los basados en intercalación (y deslaminación) en sólidos de tipo laminar; (iii) los resultantes del atrapamiento en sólidos con una estructura tridimensional como las zeolitas; (iv) los electrocerámicos, derivados de materiales ferroeléctricos, dieléctricos y superconductores; y (v) los nanocomposites cerámicos estructurales, preparados mediante los métodos

Bio-nanocomposites: nuevos materiales ecológicos, biocompatibles y funcionales

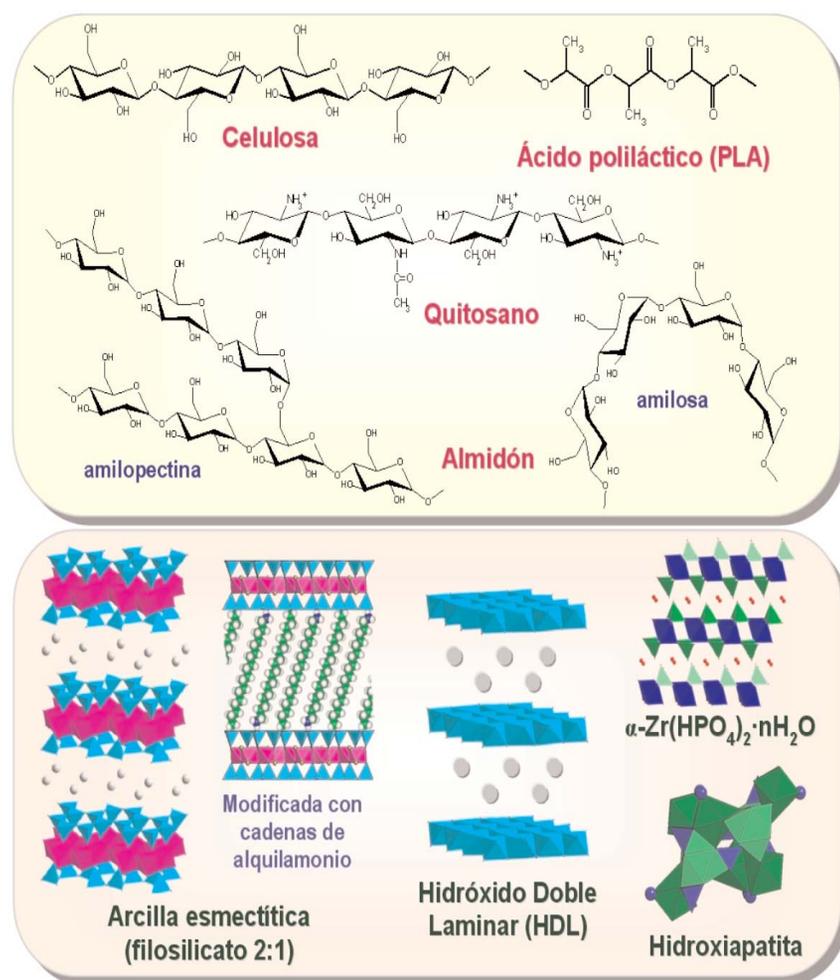


Figura 3. Estructuras de los biopolímeros y sólidos inorgánicos más comunes en la síntesis de bio-nanocomposites

tradicionales a altas temperaturas. De entre estos métodos, los dos primeros son los más utilizados para la preparación de nanocomposites basados en la combinación de un sólido inorgánico y un polímero, ya sea sintético o de origen natural. En el caso de los bio-nanocomposites, la mayor parte de los trabajos recogidos en la bibliografía muestran como método de síntesis habitual la intercalación de los biopolímeros en sólidos laminares, produciéndose entre ambas interacciones de tipo electrostático, de enlace de hidrógeno, coordinación ion-dipolo, etc.^[19,20] La síntesis de estos bio-nanocomposites basados en sólidos 2D se consigue aplicando las mismas estrategias descritas para la preparación de nanocomposites,^[3,4] es decir: (i) intercalación directa del biopolímero, que se dispone entre las láminas del sólido hospedante; (ii) intercalación de un monómero, seguida de su polimerización en el espacio interlaminar; (iii) deslaminación del sólido y posterior reapilamiento en presencia del biopolímero, que queda así atrapado en el sólido; y (iv) síntesis del sólido inorgánico en presencia del biopolímero, que actúa como una plantilla. Los sólidos empleados con mayor frecuencia son arcillas laminares del tipo de las esmectitas (montmorillonita, hectorita) y sus derivados con alquilamonio,^[41] hidróxidos dobles laminares (HDLs), el α -fosfato de zirconio (α -ZrP) o perovskitas de tipo laminar.^[19,20] En la Figura 3 se muestran las estructuras de algunos de los biopolímeros y sólidos inorgánicos más utilizados en la preparación de bio-nanocomposites.

También se han descrito otros bio-nanocomposites en cuya composición intervienen sólidos no laminares. Este es el caso de los sistemas híbridos basados en la combinación de biopolímeros con arcillas de tipo fibroso, como la sepiolita y la paligorskita, o bien con hidroxiapatito, carbonato cálcico y sílice. Estos últimos generalmente son considerados materiales biomiméticos o bio-inspirados, ya que en su preparación se trata de imitar los procesos de mineralización que tienen lugar en la Naturaleza.^[42,43] Así, se ha comprobado que proteínas y polisacáridos como colágeno, carragenatos, alginato, derivados de celulosa, quitosano y quitina son capaces de promover la precipitación de sílice, a partir de precursores como el tetrametilortosilicato (TMOS) o el tetrakis(2-hidroxietil)ortosilicato (THEOS), o bien de carbonato y fosfato cálcico, actuando el biopolímero como una plantilla que controla la organización estructural del material híbrido resultante.^[44-46] De esta forma, la incorporación de material biológico (proteínas, ADN y ARN, antígenos, células, etc.) en la matriz silícica genera bio-nanocomposites en los que se preserva la funcionalidad del material bioactivo, siendo adecuados para aplicaciones como sensores, biosensores y catalizadores.^[47]

Aplicaciones de los bio-nanocomposites

• *Bioplásticos:*

Desde hace unas décadas se están comercializando los denominados bioplásticos, derivados de biopolímeros muy abundantes obtenidos de productos naturales, tales como el almidón de maíz o patata, la celulosa de distintas plantas o el ácido poliláctico, obtenido a partir del ácido láctico resultante de la acción de diversos microorganismos sobre el almidón. El impacto medioambiental provocado por los desechos de plásticos no degradables es enorme y esto hace necesario el disponer de materiales alternativos como los bioplásticos. Aunque la mayor parte de la producción de bioplásticos se dedica al embalaje y envasado de alimentos, también se utilizan en otros campos como la agricultura, la construcción, los productos sanitarios, sistemas dispensadores de fármacos, implantes médicos o hilos de sutura, etc, gracias a su biodegradabilidad, no toxicidad y la facilidad de procesado. Diversos estudios han demostrado que la adición de sólidos inorgánicos al biopolímero (*nanocargas*) mejora las propiedades mecánicas del material resultante, incrementando su estabilidad frente a la degradación térmica y confiriéndole una mayor rigidez y mayor resistencia al impacto. Esto es consecuencia del incremento de interacciones a nivel nanométrico entre ambos componentes en los nanocompos-

ites resultantes, que pueden ser compuestos de intercalaci3n si la arcilla conserva su disposici3n laminar o bien de exfoliaci3n si se produce una dispersi3n de las nanoláminas (Fig. 4).[3] Así, se ha comprobado que la incorporaci3n de arcillas, naturales o modificadas previamente con compuestos alquilamonio, en la matriz de biopolímero (almid3n, celulosa, o PLA generalmente) origina bio-nanocomposites con propiedades superiores a los bioplásticos no reforzados.[17,32,48-50] Esta funci3n de agente reforzante para la mejora de las propiedades mecánicas del polímero es análoga a la que ejercen las partículas anisotr3picas de sepiolita, un silicato de magnesio hidratado de morfología microfibrosa muy abundante en España, al ser combinadas con otro polímero de origen natural como es el caucho.[51, 52]

Aparte de la mejora en las propiedades mecánicas del bio-nanocomposite con respecto al biopolímero puro, tambi3n destaca la mejora introducida en las propiedades de barrera al paso de gases. La dispersi3n de las láminas del s3lido inorgánico en la matriz biopolim3rica crea "camino tortuosos" que dificultan el paso de gases a trav3s del material (Fig. 4), siendo esta propiedad muy importante para las aplicaciones de estos bioplásticos en el área de envasado y conservaci3n de alimentos. Hay que destacar tambi3n que varios estudios se han centrado en el control de la biodegradabilidad de bio-nanocomposites basados en PLA, variando la disposici3n de la arcilla en la matriz de PLA[53] o incorporando un titanato laminar para acelerar la degradaci3n del material en presencia de luz solar.[54] Este último efecto es muy importante con vistas a que estos nuevos materiales sean buenos candidatos para reemplazar a los plásticos tradicionales y alcanzar una reducci3n del volumen de residuos generados.

• *Aplicaciones biom3dicas:*

El objetivo de la denominada ingeniería de tejidos es la regeneraci3n del tejido dañado mediante la incorporaci3n de un

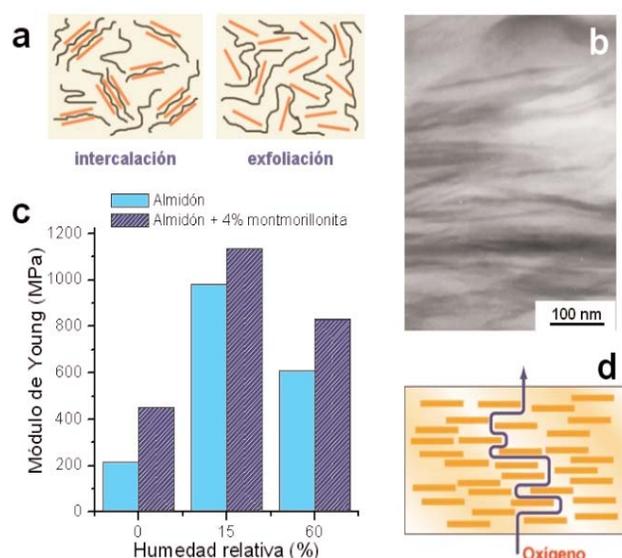


Figura 4. Características y propiedades de los nanocomposites biopolímero-arcilla: (a) disposici3n de la arcilla en los nanocomposites: intercalada o exfoliada; (b) imagen de TEM mostrando la intercalaci3n de almid3n en cloisita-Na (adaptado de Ref. 48); (c) mejora del m3dulo de Young en un bio-nanocomposite almid3n-montmorillonita y su variaci3n en funci3n de la humedad relativa (adaptado de Ref. 50); (d) efecto de barrera al paso de gases.

soporte artificial favorable para el crecimiento celular que conduzca al desarrollo de nuevo tejido, conservando la forma y dimensiones del implante. Para ello, es importante que este soporte posea una porosidad adecuada, que sea fácil de conformar con el tamaño y la forma deseados, que sea biocompatible y, sobre todo, biodegradable, es decir, que el biomaterial implantado pueda ser eliminado por el propio organismo una vez realizada su funci3n de soporte para la regeneraci3n del tejido. En la bibliografía pueden encontrarse numerosos ejemplos de biomateriales para la regeneraci3n de tejido 3seo, neural o cardiovascular,[36] aunque la mayor parte de los bio-nanocomposites han sido estudiados para regenerar tejido 3seo como implantes que tratan de imitar la composici3n del hueso o el cartílago para lograr una perfecta integraci3n (Fig. 5). Generalmente se componen de hidroxiapatito combinado con una amplia variedad de biopolímeros: polisacáridos como el alginato,[55] poli3steres basados en el ácido poliláctico [56,57] y diversas proteínas estructurales del tipo del colágeno[37,58,59] o la fibroína de seda.[60] La nanoestructuraci3n de los componentes del implante, originando una superficie con rugosidad en la escala nanom3trica similar a la del hueso natural, parece favorecer la proliferaci3n de los osteoblastos y resulta muy adecuada para la regeneraci3n del tejido.[61] Muchos estudios se han centrado en los procesos de preparaci3n de materiales híbridos, por ejemplo combinando nanopartículas de hidroxiapatito con seroalbumina bovina[62] o quitosano,[63] generalmente inspirados en los procesos de biomineralizaci3n que tienen lugar en la naturaleza. Es muy importante obtener biomateriales no s3lo con buenas propiedades mecánicas, sino tambi3n provistos de una arquitectura conveniente, es decir, con una estructuraci3n y porosidad determinadas que favorezcan la adecuada proliferaci3n de osteoblastos. Para el control de la porosidad se han empleado diversas estrategias alternativas a la liofilizaci3n, como la síntesis del biocomposite HAP-caseinato s3dico en una emulsi3n de aceite y agua,[64] o bien utilizando CO₂ supercrítico para la preparaci3n de los nanocomposites basados en HAP o  -fosfato tricálcico con ácido poliláctico.[57]

Además del hidroxiapatito, el colágeno tambi3n ha sido combinado con sepiolita originando bio-nanocomposites con excelentes propiedades mecánicas para ser utilizados como implantes 3seos.[66,67] El colágeno muestra una gran afinidad por las fibras de sepiolita, orientándolas en la misma direcci3n que las cadenas del biopolímero, lo que origina un material con un alto grado de organizaci3n. La persistencia del

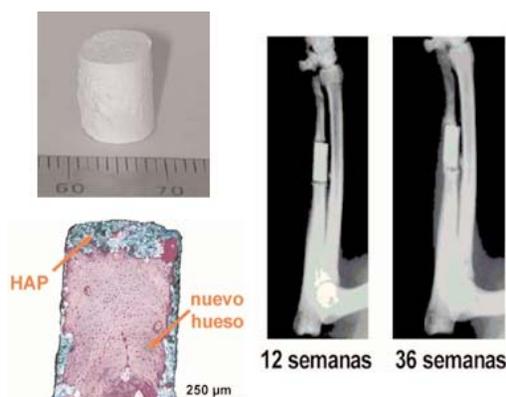


Figura 5. Implantes basados en hidroxiapatito (HAP) para regeneraci3n de tejido 3seo (adaptada de Refs. 55 y 65).

Bio-nanocomposites: nuevos materiales ecológicos, biocompatibles y funcionales

material implantado en el organismo puede ser modificada mediante tratamiento del composite colágeno-sepiolita con pequeñas cantidades de un entrecruzante como el glutaraldehído, de forma que aumente la resistencia del material y pueda permanecer el tiempo necesario para lograr la formación de nuevo tejido.^[68]

En algunos estudios el nanocomposite no sólo actúa como soporte, sino también como sistema dispensador de compuestos bioactivos que pueden favorecer la regeneración tisular y la cicatrización de heridas, como es el caso de los nanocomposites de hidroxiapatito ensamblado con alginato y colágeno^[55] o con gelatina^[69] en los que se atrapa una proteína morfogenética o un fármaco antibiótico.

Otros sistemas bio-nanohíbridos han sido desarrollados con el objetivo de actuar como vehículos para la distribución controlada de fármacos. Con este fin el grupo de Livage ha desarrollado recientemente un nuevo sistema biohíbrido sílice/alginato en forma de partículas de dimensiones variables según el método de preparación, llegando a presentar dimensiones que alcanzan la escala nanométrica cuando se usa la técnica preparativa de *spray-drying*.^[70] Así, las nanopartículas resultantes son capaces de penetrar en el espacio intracelular de los fibroblastos usados como modelo, por lo que se contempla su uso como un eficiente sistema dispensador de fármacos.

La incorporación de ADN en sólidos inorgánicos del tipo de los hidróxidos dobles laminares (HDLs) fue descrita hace unos años por el grupo de Choy.^[39] Los HDLs presentan la propiedad de intercambio aniónico, por lo que las cadenas de ADN, con una carga global negativa, pueden penetrar en el espacio interlaminar, como se confirma por difracción de rayos X. Se observa un incremento en la distancia entre láminas consecutivas (*espaciado basal*) de 2,39 nm que indica que la incorporación del ADN se efectúa en doble hélice dispuesta de forma paralela a las láminas inorgánicas.^[71] Estos bio-nanocomposites ADN-HDL han sido estudiados como vectores no víricos para la transferencia del ADN al núcleo celular (Fig. 6). El apantallamiento de la carga negativa del ADN por el sólido inorgánico facilita su paso a través de la membrana (endocitosis) y, una vez en el lisosoma, el pH ligeramente ácido del medio produce la disolución del HDL liberando las cadenas de ADN que pueden ser transferidas al núcleo de la célula.^[39] Se ha realizado también un estudio de la citotoxicidad del HDL utilizado, tipo hidrotalcita (hidróxido doble de Mg y Al), confirmando la biocompatibilidad de este material y su aptitud para ser empleado en terapia génica.^[40]

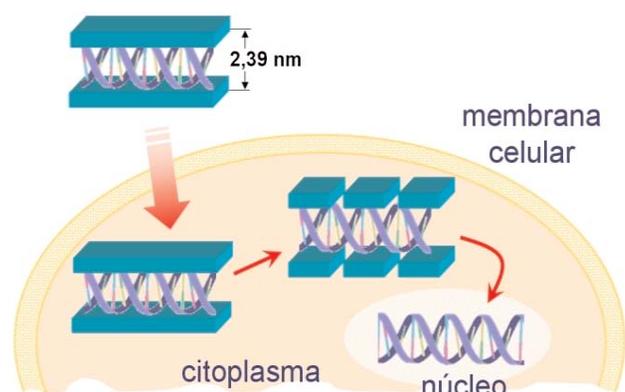


Figura 6. Bio-nanohíbrido ADN-HDL como vector no vírico en transferencia génica.

• Aplicaciones en dispositivos electroquímicos:

Un reciente campo de aplicación de los bio-nanocomposites es su uso como fase activa en dispositivos electroquímicos. La primera aplicación de este tipo fue la construcción de sensores potenciométricos basados en un bio-nanocomposite quitosano-montmorillonita cuya capacidad de cambio iónico puede ser regulada en función de la cantidad de biopolímero incorporada.^[72,73] Debido a que el quitosano es un polielectrolito catiónico a valores de pH inferiores a 6,3, puede ser intercalado directamente en el espacio interlaminar de las esmectitas en forma de monocapa o de bicapa como muestra la difracción de rayos X (Fig. 7). En este último caso de intercalación en bicapa, parte de los grupos amino protonados del quitosano quedan sin interactuar con la arcilla, ya que exceden la capacidad de cambio catiónico inicial de unos 75 mEq/100 g en el caso de la montmorillonita utilizada. Este exceso de grupos amino protonados actúa como centros de cambio aniónico, transformándose así la capacidad de cambio catiónica en aniónica en el material resultante. Este bio-nanocomposite presenta también excelentes propiedades mecánicas que facilitan su incorporación como fase activa del sensor sin necesidad de añadir los aglomerantes típicos (Fig. 7). Los sensores desarrollados han sido aplicados con éxito en la determinación potenciométrica de diferentes aniones mostrando una marcada selectividad hacia los aniones monovalentes, lo que puede ser consecuencia del confinamiento de las cadenas de quitosano en el espacio interlaminar de la arcilla (Fig. 7).

Este mismo biopolímero catiónico, el quitosano, es capaz de unirse a las microfibras de sepiolita mediante interacciones electrostáticas, dada la capacidad de cambio catiónico de esta arcilla.^[74] Además se establecen enlaces de hidrógeno entre los numerosos grupos hidroxilo del biopolímero y los grupos silanoles presentes en la superficie de la sepiolita.^[75] Se ha comprobado mediante determinaciones potenciométricas que variando la cantidad de polímero adsorbido en la sepiolita es posible modificar su capacidad de cambio, llegando incluso a transformarla en un intercambiador de tipo aniónico cuando hay un exceso del biopolímero cargado positivamente.

En el caso de los HDLs, conocidos como arcillas inversas por su capacidad de cambio aniónica, se demostró que su combinación con polisacáridos cargados negativamente, tales como alginato, pectina o ι -carragenato, origina bio-nanocomposites con una capacidad de cambio catiónica.^[76,77] La estrategia de síntesis seguida en esta ocasión fue la denominada síntesis con plantilla, haciendo precipitar el hidróxido doble de Zn y Al mediante adición de NaOH a una disolución que contiene el biopolímero además de los cloruros correspondientes. De esta manera, el biopolímero queda atrapado entre las láminas del sólido inorgánico que se forma, permaneciendo unido a ellas mediante interacciones de tipo electrostático. Los difractogramas de rayos X confirman la incorporación de alginato y pectina en una conformación de monocapa ($\Delta d_L = 0,84$ nm), mientras que el ι -carragenato parece quedar incorporado en forma de bicapa o quizás de doble hélice ($\Delta d_L = 1,15$ nm).^[77] La transformación del HDL en un intercambiador catiónico se debe a que una fracción de los grupos carboxilato, en el alginato o la pectina, o sulfato, en el ι -carragenato, no interactúan con las láminas quedando por tanto disponibles como centros de intercambio catiónico.

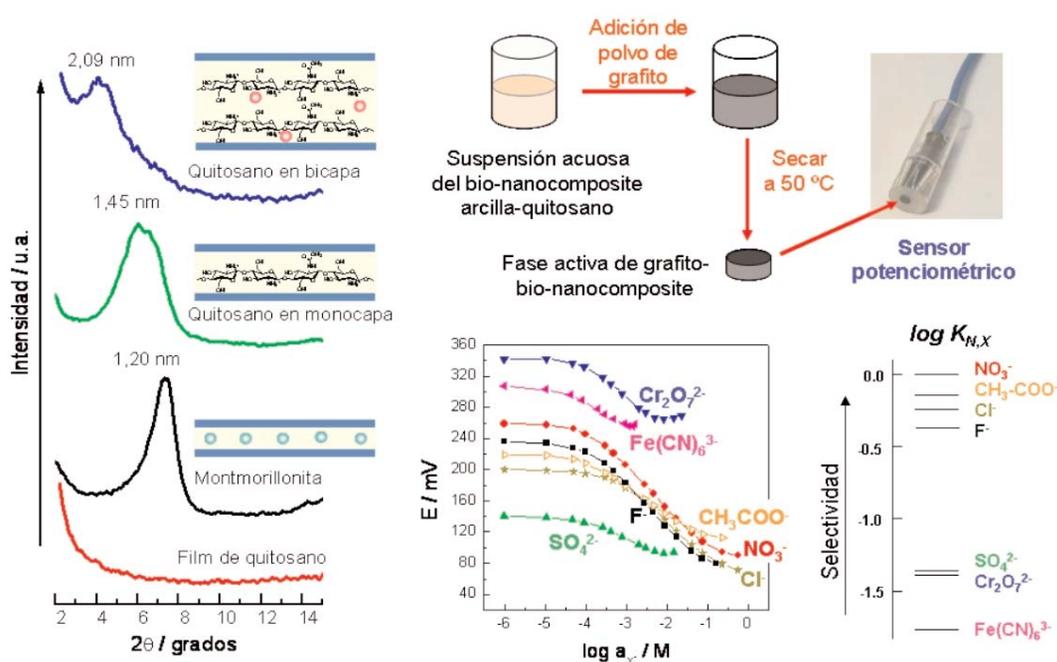


Figura 7. Difractogramas de rayos X confirmando la formación del bio-nanocomposite por intercalación en montmorillonita de quitosano en configuración de monocapa o de bicapa (izquierda del gráfico). Preparación de sensores electroquímicos y empleo de este bio-nanocomposite como fase activa de sensores potenciométricos para la determinación de aniones, mostrando una marcada selectividad hacia los aniones monovalentes.

Dada la capacidad de estos biopolímeros de gelificar en presencia del ion calcio, por un mecanismo de formación de complejos, los sensores basados en los bio-nanocomposites resultantes ($[Zn_2Al(OH)_6](\text{biopolímero}) \cdot nH_2O$) pueden aplicarse a la determinación potenciométrica de este catión.^[77]

Aparte del empleo de los bio-nanocomposites en el desarrollo de sensores iónico-selectivos, también se han estudiado sistemas análogos para otros tipos de aplicaciones electroquímicas. Este es el caso de los nanocomposites caramelo-arcilla preparados por el método de polimerización *in situ* de sacarosa mediante irradiación de microondas.^[78] En este proceso el caramelo resultante se intercala en el espacio interlaminar de la montmorillonita, aumentando el espaciado basal de 1,40 nm en la arcilla de partida a 1,92 nm en el bio-nanocomposite. Este sistema es un excelente precursor de nanocomposites carbono-arcilla, ya que mediante un tratamiento térmico se produce la pirólisis y carbonización del caramelo. El gran incremento de conductividad eléctrica, desde menos de 10^{-12} S/cm en el sistema caramelo-arcilla a 10^{-1} S/cm tras su tratamiento a 750 °C, permite la aplicación de estos nanocomposites en diversos dispositivos electroquímicos como baterías recargables, supercondensadores, sensores y biosensores.^[9]

Podemos considerar que el trabajo descrito por Talibudeen en 1950^[79] sobre la combinación de gelatina, una proteína estructural, con arcillas esmectíticas, fue realmente un estudio pionero sobre la preparación de lo que actualmente se consideran bio-nanocomposites. Hoy en día sigue existiendo un gran interés por este tipo de materiales basados en gelatina y diversos sólidos inorgánicos como el α -ZrP,^[80] diversas arcillas,^[81,82] o perovskita.^[83] En este último caso, el sólido inorgánico es un niobato cálcico laminar perteneciente a la serie de perovskitas tipo Dion-Jacobson, que tras una serie de tratamientos en medio ácido y con sales de amonio cuaterna-

rias (tetraetilamonio, TEA⁺, o tetrabutilamonio, TBA⁺) origina una dispersión coloidal provocada por la exfoliación de las nanoláminas del óxido mixto. La adición de gelatina a este sistema coloidal produce el reapilamiento de las nanoláminas que se autoensamblan con una orientación ordenada preferencial en un mismo plano y que permanecen homogéneamente distribuidas en la matriz polimérica (Fig. 8).^[83] En este tipo de bio-nanocomposites es el sólido inorgánico el que aporta las propiedades funcionales, concretamente las propiedades dieléctricas del sistema híbrido, lo que se refleja en el aumento de la constante dieléctrica y de la conductividad dc a medida que aumenta el contenido de perovskita en el material (Fig.8). Gracias a dichas propiedades, estos bio-nanocomposites gelatina-perovskita podrían ser aplicados en dispositivos de alta frecuencia y en la industria de microondas.

Además de los bio-nanocomposites basados en proteínas estructurales, existe un enorme interés en la incorporación de proteínas funcionales que doten al material híbrido resultante de las propiedades necesarias para su incorporación en biosensores y reactores enzimáticos. En la bibliografía pueden encontrarse numerosos ejemplos de biosensores en los que se hace uso de diversos sólidos inorgánicos, principalmente arcillas esmectíticas y HDLs, como membranas para la inmovilización de enzimas en la superficie del electrodo.^[84] Pero en estos casos, la interacción entre ambos componentes inorgánico y biológico no se produce a nivel nanométrico, por lo que no podemos hablar de la formación de un nanocomposite, aunque queda confirmada la capacidad de estas arcillas para crear un ambiente favorable para la retención y conservación de las enzimas. A diferencia de estos materiales, recientemente varios trabajos sí describen la preparación de verdaderos bio-nanocomposites enzima-sólido inorgánico, tratándose en estos casos de bio-nanohíbridos basados en sólidos laminares del tipo de las arcillas esmec-

Bio-nanocomposites: nuevos materiales ecológicos, biocompatibles y funcionales

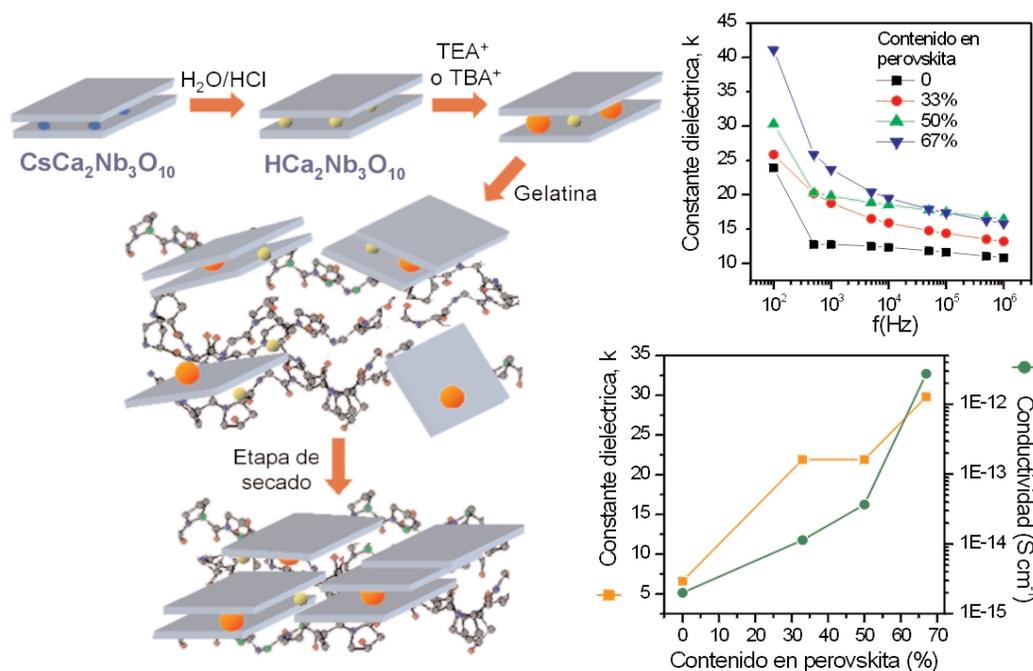


Figura 8. Síntesis del bio-nanocomposite gelatina-perovskita mediante la estrategia de deslaminación-reapilamiento y variación de su constante dieléctrica y conductividad en función de la frecuencia y del contenido en perovskita.

t ticas, fosfatos, trifosfocalcogenuros, silicatos s dicos laminares y perovskitas. La intercalación del componente biológico en estos sólidos inorgánicos tiene como objetivo crear un ambiente adecuado para protegerlo de la degradación microbiana y evitar su desnaturalización preservando la estructura terciaria y, por lo tanto, conservando su actividad enzimática. Uno de los trabajos pioneros, fue el de McLaren y Peterson en 1961 describiendo la incorporación de lisozima, lactoglobulina, pepsina y quimotripsina en el espacio interlaminar de la montmorillonita mediante un mecanismo de intercalación directa (Fig. 9a).^[85] El objetivo del estudio era determinar las dimensiones de las proteínas intercaladas a partir del incremento en el espaciado basal determinado por difracción de rayos X, es decir, utilizando la arcilla como un sustrato calibrador. Más recientemente y utilizando otro sólido laminar como el fosfato de zirconio $\alpha\text{-Zr}(\text{HPO}_4)_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ($\alpha\text{-ZrP}$) se han obtenido resultados similares con hemoglobina, mioglobina, lisozima, quimotripsina, protamina y glucosa oxidasa.^[86] Del mismo modo, otros autores han conseguido intercalar con idéntico éxito lisozima en un trifosfocalcogenuro de manganeso (MnPS_3),^[87] mioglobina y hemoglobina en un silicato sódico como la magadiita ($\text{Na}_2\text{Si}_4\text{O}_{29} \cdot n\text{H}_2\text{O}$)^[88], hemoglobina en el niobato laminar $\text{HCa}_2\text{Nb}_3\text{O}_{10}$ (perovskita)^[89] o mioglobina, hemoglobina y glucosa oxidasa en un filosilicato de magnesio sintético.^[90] La preparación de estos bioh bridos se realiza mediante un proceso de deslaminación-reapilamiento, siendo necesaria en todos ellos una expansión previa del sólido laminar, generalmente con sales de amonio cuaternarias, para facilitar la incorporación posterior de la especie biológica (Fig. 9b). En todos estos trabajos, la técnica de difracción de rayos X es fundamental para confirmar la intercalación de estos enzimas y proteínas globulares entre las láminas del sólido, obteniéndose en cada caso incrementos del espaciado basal que concuerdan con las dimensiones de cada una de ellas.

Recientemente se ha descrito la inmovilización de los en-

zimas $\beta\text{-D}$ -glucanasa y D -galactosidasa en un material distinto a los sólidos laminares mencionados, como es un nanocomposite formado por sílice y polisacáridos (xantano, goma de semilla de algarrobo y derivados de celulosa). Este material bio-nanohíbrido resulta ser una matriz excelente para la retención de ambas enzimas, ya que conservan su actividad enzimática prolongando su tiempo de uso unas cien veces, presentando además una porosidad que facilita la difusión de sustratos y productos.^[91]

La preservación de la actividad enzimática, o incluso en algunos casos la producción de un ligero incremento de su actividad debido al efecto protector del sólido inorg nico^[86] (Fig. 9c), tiene como consecuencia directa el aumento del tiempo de uso de los biosensores. Además, la estructura abierta de las láminas inorgánicas facilitando el acceso del sustrato al componente biológico permitirá obtener dispositivos con tiempos de respuesta cortos. Puede afirmarse que el empleo de este tipo de bio-nanocomposites ofrece nuevas alternativas a los métodos clásicos de inmovilización de enzimas para el desarrollo tanto de dispositivos biosensores como de reactores enzimáticos.

Conclusiones

Se ha pretendido ofrecer una visión global acerca de un nuevo tipo de materiales complejos denominados bio-nanocomposites, los cuales resultan de la combinación de polímeros de origen natural con sólidos inorgánicos. La interacción a escala nanométrica de ambos componentes confiere a estos materiales híbridos no solo excelentes propiedades mecánicas, sino otras como son las de barrera al paso de gases y una mayor estabilidad térmica con respecto a los sistemas con interacciones a mayor escala (composites convencionales). A estas propiedades, comunes a todos los materiales nanocomposites, se suman ahora las que aportan los biopolímeros, tales como la biocompatibilidad y la biodegradabilidad. Esto

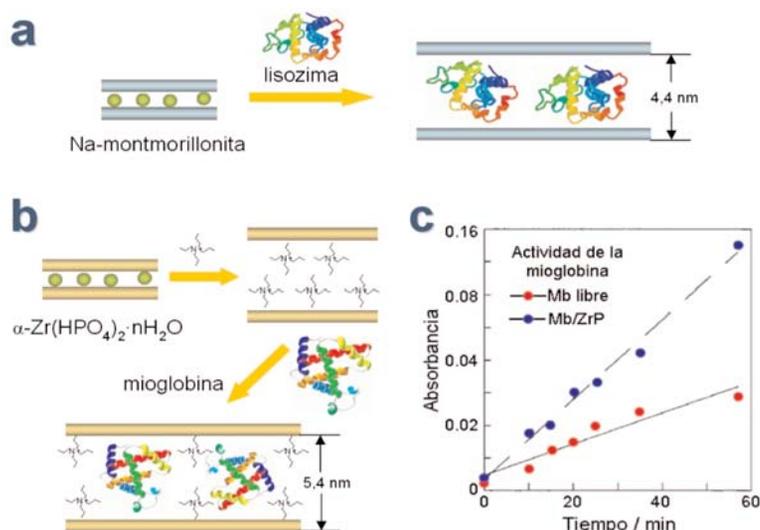


Figura 9. Intercalaci3n de prote3nas en s3lidos laminares siguiendo estrategias de intercalaci3n directa (a) y deslaminci3n previa con sales de amonio cuaternarias (b). Aumento de la actividad de mioglobina intercalada en $\alpha\text{-ZrP}$ con respecto a la prote3na libre (adaptada de Ref. 86) (c).

supone una ventaja añadida a la gran abundancia y disponibilidad de estos productos, lo que permitirá en un futuro pr3ximo reemplazar parcialmente los pol3meros derivados del petr3leo, disminuyendo la cantidad de desechos no biodegradables y contribuyendo as3 a la conservaci3n del medio ambiente. Si bien las principales aplicaciones se están desarrollando por el momento en el área de los bioplásticos para envasado de alimentos y en el campo de la biomedicina como implantes para regeneraci3n tisular, otros usos como componentes en dispositivos electroqu3micos tales como sensores i3no-selectivos y biosensores son un ejemplo de la innovaci3n prometedora de los bio-nanocompuestos.

Agradecimientos

Los autores desean expresar su agradecimiento a la CICYT (proyecto MAT2006-03356), la Comunidad de Madrid (proyecto S-0505/MAT/000227) y la Junta de Andaluc3a (proyecto IFAPA-2002.000890). M.D. desea agradecer al CSIC por la financi3n recibida a trav3s de un contrato I3P postdoctoral.

Referencias

[1] S. Komarneni, *J. Mater. Chem.* **1992**, *2*, 1219-1230.
 [2] G. A. Ozin, *Adv. Mater.* **1992**, *4*, 612-649.
 [3] M. Alexandre, P. Dubois, *Mater. Sci. Eng. R* **2000**, *28*, 1-63.
 [4] E. Ruiz-Hitzky, A. Van Meerbeeck, en *Handbook of Clay Science*, (Eds.: F. Bergaya, B.K.G. Theng, G. Lagaly), Elsevier, **2006**, pp. 583-621.
 [5] E. Ruiz-Hitzky, *Adv. Mater.* **1993**, *5*, 334-340.
 [6] E. Ruiz-Hitzky, P. Aranda, B. Casal, J. C. Galván, *Adv. Mater.* **1995**, *7*, 180-184.
 [7] P. G3mez-Romero, C. Sanchez, Eds., *Functional Hybrid Materials*, Wiley-VCH, Weinheim, **2004**.
 [8] C. Sanchez, B. Juli n, Ph. Belleville, M. Popall, *J. Mater. Chem.* **2005**, *15*, 3559-3592.
 [9] P. Aranda, M. Darder, R. Fernández-Saavedra, M. L3pez-Blanco, E. Ruiz-Hitzky, *Thin Solid Films* **2006**, *495*, 104-112.
 [10] M. G. Kanatzidis, L. M. Tonge, T. J. Marks, H. O. Marcy, C. R. Kannewurf, *J. Amer. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 3797-3799.
 [11] Y. Fukushima, S. Inagaki, *J. Incl. Phenom.* **1987**, *5*, 473-482.

[12] R.A. Vaia, H. Ishii, E. P. Giannelis, *Chem. Mater.* **1993**, *5*, 1694-1696.
 [13] E. Ruiz-Hitzky, P. Aranda, *Adv. Mater.* **1990**, *2*, 545-547.
 [14] P. Aranda, E. Ruiz-Hitzky, *Chem. Mater.* **1992**, *4*, 1395-1403.
 [15] Q. H. Zeng, A. B. Yu, G. Q. Lu, D. R. Paul, *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2005**, *5*, 1574-1592.
 [16] <http://www.laviosa.it/>; <http://www.wilson.com/>; <http://www.nanocor.com/>
 [17] H. M. Park, M. Misra, L. T. Drzal, A. K. Mohanty, *Biomacromol.* **2004**, *5*, 2281-2288.
 [18] J. K., Pandey, R. P. Singh, *Starch/St rke* **2005**, *57*, 8-15.
 [19] E. Ruiz-Hitzky, M. Darder, P. Aranda, *J. Mater. Chem.* **2005**, *15*, 3650-3662.
 [20] E. Ruiz-Hitzky, P. Aranda, M. Darder, en *Bottom-Up Nanofabrication: Supramolecules, Self-Assemblies, and Organized Films* (Ed.: K. Ariga) American Scientific Publishers (en prensa).
 [21] C. M. Zaremba, D. E. Morse, S. Mann, P. K. Hansma, G. D. Stucky, *Chem. Mater.* **1998**, *10*, 3813-3824.
 [22] B. L. Smith, T. E. Schaeffer, N. Viani, J. B. Thompson, N. A. Frederick, J. Kindt, A. Belcher, G. D. Stucky, D. E. Morse, P. K. Hansma, *Nature* **1999**, *399*, 761-763.
 [23] D. R. Katti, S. M. Pradhan, K. S. Katti, *Rev. Adv. Mater. Sci.* **2004**, *6*, 162-168.
 [24] X. W. Su, F. Z. Cui, *Mater. Sci. Eng. C* **1999**, *7*, 19-29.
 [25] M. B. Jakubinek, C. J. Samarasekera, M. A. White, *J. Mater. Res.* **2006**, *21*, 287-292.
 [26] P. Fratzl, H. S. Gupta, E. P. Paschalis, P. Roschger, *J. Mater. Chem.* **2004**, *14*, 2115-2123.
 [27] H. Peterlik, P. Roschger, K. Klaushofer, P. Fratzl, *Nature Mater.* **2006**, *5*, 52-55.
 [28] D. Raabe, P. Romano, C. Sachs, A. Al-Sawalmih, H.-G. Brokmeier, S.-B. Yi, G. Servos, H. G. Hartwig, *J. Crystal Growth* **2005**, *283*, 1-7.
 [29] G. Ozin, A. Arsenault, *Biomaterials and Bioinspiration, en Nanochemistry: A Chemical Approach to Nanomaterials*, Royal Society of Chemistry, London, **2005**, pp. 473-526.
 [30] A. Sellinger, P. M. Weiss, A. Nguyen, Y. Lu, R. A. Assink, W. Gong, C. J. Brinker, *Nature* **1998**, *394*, 256-260.
 [31] Z. Tang, N. A. Kotov, S. Magonov, B. Ozturk, *Nature Mater.* **2003**, *2*, 413-418.
 [32] S. S. Ray, M. Okamoto, *Macromol. Rapid Comm.* **2003**, *24*, 815-840.

- [33] S. S. Ray, M. Bousmina, *Progr. Mater. Sci.* **2005**, *50*, 962–1079.
- [34] http://www.bpsweb.net/02_english/03_new_e/what_g/what.htm
- [35] M. S. Widmer, A. G. Mikos, en *Frontiers in tissue engineering* (Eds C. W. Patrick Jr., A. G. Mikos, L. V. McIntire) Elsevier Science Ltd, Oxford, **1998**, pp. 107–120.
- [36] H. Shin, S. Jo, A. G. Mikos, *Biomater.* **2003**, *24*, 4353–4364.
- [37] A. Yokoyama, M. Gelinsky, T. Kawasaki, T. Kohgo, U. König, W. Pompe, F. Watari, *J. Biomed. Mater. Res. B* **2005**, *75B*, 464–472.
- [38] V. Thomas, D. R. Dean, Y. K. Vohra, *Curr. Nanosci.* **2006**, *2*, 155–177.
- [39] J. H. Choy, S. Y. Kwak, Y. J., Jeong, J. S. Park, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 4042–4045.
- [40] S. Y. Kwak, Y. J. Jeong, J. S. Park, J. H. Choy, *Solid State Ionics* **2002**, *151*, 229–234.
- [41] T. J. Pinnavaia, G.W. Beall, Eds., *Polymer-Clay Nanocomposites*, John Wiley & Sons, West Sussex, 2000.
- [42] S. Mann, *J. Mater. Chem.* **1995**, *5*, 935–946.
- [43] P. J. López, C. Gautier, J. Livage, T. Coradin, *Curr. Nanosci.* **2005**, *1*, 73–83.
- [44] Y. A. Shchipunov, T. Y. Karpenko, *Langmuir* **2004**, *20*, 3882–3887.
- [45] D. Eglin, G. Mosser, M.-M. Giraud-Guille, J. Livage, T. Coradin, *Soft Matter* **2005**, *1*, 129–131.
- [46] G. Falini, S. Fermari, *Tissue Eng.* **2004**, *10*, 1–6.
- [47] I. Gill, *Chem. Mater.* **2001**, *13*, 3404–3421.
- [48] H.-M. Park, W.-K. Lee, C.-Y. Park, W.-J. Cho, C.-S. Ha, *J. Mater. Sci.* **2003**, *38*, 909–915.
- [49] M.-A. Paul, M. Alexandre, P. Dege , C. Henrist, A. Rulmont, P. Dubois, *Polymer* **2003**, *44*, 443–450.
- [50] M. Avella, J. J. De Vlieger, M. E. Errico, S. Fischer, P. Vacca, M. G. Volpe, *Food Chem.* **2005**, *93*, 467–474.
- [51] L. González, A. Rodríguez, L. Ibarra, *J. Appl. Polym. Sci.* **2003**, *43*, 1327–1333.
- [52] L. Bokobza, J.-P. Chauvin, *Polymer* **2005**, *46*, 4144–4151.
- [53] S. S. Ray, K. Yamada, M. Okamoto, K. Ueda, *Macromol. Mater. Eng.* **2003**, *288*, 203–208.
- [54] R. Hiroi, S. S. Ray, M. Okamoto, T. Shiroi, *Macromol. Rapid Commun.* **2004**, *25*, 1359–1364.
- [55] S. Sotome, T. Uemura, M. Kikuchi, J. Chen, S. Itoh, J. Tanaka, T. Tateishi, K. Shinomiya, *Mater. Sci. Eng. C* **2004**, *24*, 341–347.
- [56] K. J. L. Burg, S. Porter, J. F. Kellam, *Biomater.* **2000**, *21*, 2347–2359.
- [57] L. M. Mathieu, T. L. Mueller, P.-E. Bourban, D. P. Pioletti, R. M ller, J.-A. E. M nson, *Biomater.* **2006**, *27*, 905–916.
- [58] Y. J. Wang, C. R. Yang, X. F. Chen, N. R. Zhao, *Adv. Eng. Mater.* **2006**, *8*, 97–100.
- [59] S. Yunoki, T. Ikoma, A. Monkawa, K. Ohta, M. Kikiuchi, S. Sotome, K. Shinomiya, J. Tanaka, *Mater. Lett.* **2006**, *60*, 999–1002.
- [60] L. Wang, R. Nemoto, M. Senna, *J. Nanoparticle Res.* **2002**, *4*, 535–540.
- [61] E. Palin, H. Liu, T. J. Webster, *Nanotechnology* **2005**, *16*, 1828–1835.
- [62] A. Sinha, S. Nayar, A. Agrawal, D. Bhattacharyya, P. Ramachandrarao, *J. Am. Ceram. Soc.* **2003**, *86*, 357–359.
- [63] V. M. Rusu, C.-H. Ng, M. Wilke, B. Tiersch, P. Fratzl, M. G. Peter, *Biomater.* **2005**, *26*, 5414–5426.
- [64] C. Ritzoulis, N. Scoutaris, E. Demetriou, K. Papademetriou, S. Kokkou, S. Stavroulias, C. Panayiotou, *J. Biomed. Mater. Res.* **2004**, *71A*, 675–684.
- [65] <http://herkules oulu.fi/isbn9514264789/html/x1059.html>; <http://www.opnews.com/articles/july2002/articles.php>
- [66] N. Olmo, M. A. Lizarbe, J. G. Gavilanes, *Biomater.* **1987**, *8*, 67–69.
- [67] J. I. Herrera, N. Olmo, J. Turnay, A. Sicilia, A. Bascones, J. G. Gavilanes, M. A. Lizarbe, *Biomater.* **1995**, *16*, 625–631.
- [68] N. Olmo, J. Turnay, J. I. Herrera, J. G. Gavilanes, M. A. Lizarbe, *J. Biomed. Mater. Res.* **1996**, *30*, 77–84.
- [69] H. W. Kim, J. C. Knowles, H. E. Kim, *J. Biomed. Mater. Res. B* **2005**, *74B*, 686–698.
- [70] M. Boissiere, P. J. Meadows, R. Brayner, C. H lary, J. Livage, T. Coradin, *J. Mater. Chem.* **2006**, *16*, 1178–1182.
- [71] J. H. Choy, S. Y. Kwak, J. S. Park, Y. J., Jeong, J. Portier, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 1399–1400.
- [72] M. Darder, M. Colilla, E. Ruiz-Hitzky, *Chem. Mater.* **2003**, *15*, 3774–3780.
- [73] M. Darder, M. Colilla, E. Ruiz-Hitzky, *Appl. Clay Sci.* **2005**, *28*, 199–208.
- [74] E. Ruiz-Hitzky, *J. Mater. Chem.* **2001**, *11*, 86–91.
- [75] M. Darder, M. L pez-Blanco, P. Aranda, A. J. Aznar, J. Bravo, E. Ruiz-Hitzky, *Chem. Mater.* **2006**, *18*, 1602–1610.
- [76] F. Leroux, J. Gachon, J.-P. Besse, *J. Solid State Chem.* **2004**, *177*, 245–250.
- [77] M. Darder, M. López-Blanco, P. Aranda, F. Leroux, E. Ruiz-Hitzky, *Chem. Mater.* **2005**, *17*, 1969–1977.
- [78] M. Darder, E. Ruiz-Hitzky, *J. Mater. Chem.* **2005**, *15*, 3913–3918.
- [79] O. Talibudeen, *Nature* **1950**, *166*, 236–236.
- [80] Y. Ding, D. J. Jones, P. Maireles-Torres, J. Rozi re, *Chem. Mater.* **1995**, *7*, 562–571.
- [81] J. P. Zheng, P. Li, Y. L. Ma, K. D. Yao, *J. Appl. Polym. Sci.* **2002**, *86*, 1189–1194.
- [82] M. Darder, A. I. Ruiz, P. Aranda, H. Van Damme, E. Ruiz-Hitzky, *Curr. Nanosci.* **2006**, *2*, 231–241.
- [83] A. I. Ruiz, M. Darder, P. Aranda, R. Jiménez, H. Van Damme, E. Ruiz-Hitzky, *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2006**, *6*, 1602–1610.
- [84] C. Mousty, *Appl. Clay Sci.* **2004**, *27*, 159–177.
- [85] A. D. McLaren, G. H. Peterson, *Nature* **1961**, *192*, 960–961.
- [86] C. V. Kumar, A. Chaudari, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 830–837.
- [87] T. Coradin, A. Coupé, J. Livage, *J. Mater. Chem.* **2003**, *13*, 705–707.
- [88] S. Peng, Q. Gao, Q. Wang, J. Shi, *Chem. Mater.* **2004**, *16*, 2675–2684.
- [89] L. Gao, Q. Gao, Q. Wang, S. Peng, J. Shi, *Biomater.* **2005**, *25*, 5267–5275.
- [90] A. J. Patil, E. Muthusamy, S. Mann, *J. Mater. Chem.* **2005**, *15*, 3838–3843.
- [91] Y. A. Shchipunov, T. Y. Karpenko, I. Y. Bakunina, Y. V. Burtseva, T. N. Zvyagintseva, *J. Biochem. Biophys. Methods* **2004**, *58*, 25–38.