

# EFFECTO DE ALGUNOS IONES INORGANICOS SALIVARES EN LAS PROPIEDADES ELECTROKINETICAS DE HIDROXIAPATITA SINTETICA

Edgar Delgado \*

*Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia, A.A. 14490 Santafé de Bogotá.*

Keywords: Electrophoretic mobility, zeta potential, hydroxyapatite, salivary ions.

## RESUMEN

Se estudió por el método microelectroforético la influencia de los iones  $H^+$ ,  $OH^-$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Cl^-$ ,  $Ca^{++}$ , y  $PO_4^{3-}$  sobre el potencial zeta (P.Z.) de hidroxiapatita (HAP) sintética. Se prepararon soluciones de cloruros de sodio, potasio, y calcio que correspondieran al contenido promedio y a la relación  $Na^+/K^+$  de saliva en reposo (SSR) y en secreción (SSS). También se midió el P.Z. de HAP en saliva natural centrifugada (SNC). Se encontró que los iones  $H^+$ ,  $OH^-$ ,  $Ca^{++}$  y  $PO_4^{3-}$  son determinantes. Los iones  $K^+$ ,  $Na^+$  y  $Cl^-$  parecen comportarse indiferentemente cuando son los únicos presentes en solución. Las medidas en SSR y SSS parecen indicar intercambio de sodio por calcio en HAP. Es probable que los iones fosfato y/o sustancias orgánicas adsorbidas desempeñen un papel predominante en determinar el P.Z. de HAP en saliva natural.

## ABSTRACT

The influence of  $H^+$ ,  $OH^-$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Cl^-$ ,  $Ca^{++}$ , and  $PO_4^{3-}$  on the zeta potential (Z.P.) of synthetic hydroxyapatite (HAP) was studied by means of the microelectrophoretic technique. HAP Z.P. was measured in natural centrifuged saliva as well as in aqueous solutions containing sodium, potassium and calcium chlorides in amounts corresponding to those concentrations and  $Na^+/K^+$  ratio of rest saliva (SSR), and saliva secreted at two milliliters per minute.  $H^+$ ,  $OH^-$ ,  $Ca^{++}$  and  $PO_4^{3-}$  were found to be potential determining ions (p.d.i.).  $K^+$ ,  $Na^+$  and  $Cl^-$  appear to be non p.d.i. when alone in solution. Measurements in SSR and SSS seem to indicate substitution of  $Na^+$  for  $Ca^{++}$  on the surface. It is probable that phosphate ions and/or adsorbed organic compounds play a major role in determining the Z.P. of HAP in natural saliva.

## INTRODUCCION

El desarrollo y conocimiento de biomateriales apropiados es la única esperanza de millones de personas que requieren de cirugía ortopédica para solucionar problemas

óseos, artríticos, articulares y dentales. Los materiales biocompatibles pueden ser: a) bioinertes como alfa- $\text{Al}_2\text{O}_3$  y el  $\text{ZrO}_2$ , b) bioactivos resistentes como la hidroxiapatita (HAP) o la wollastonita, y c) bioactivos biodegradables como el  $\beta$ -fosfato tricalcico (TCP). Por su resistencia mecánica pueden dividirse en biomateriales estructurales, como  $\text{TiO}_2$  y no estructurales como HAP, TCP, y el biovidrio (1).

El concepto de bioinercia ha sido reconsiderado ya que cualquier material origina alguna respuesta en contacto con tejidos vivos produciéndose 4 tipos de reacción: (i) si el material es tóxico, el tejido circundante muere; (ii) si no es tóxico y se disuelve, el tejido circundante lo reemplaza; (iii) si el material es atóxico y biológicamente inactivo, se desarrolla una cápsula de tejido fibroso y (iv) si el material es atóxico y biológicamente activo se forma una unión interfacial. Los biomateriales actuales caen en cuatro categorías que son: cerámicas, vidrios bioactivos, biocerámicas vidriadas y materiales compuestos bioactivos. La HAP es tal vez el representante más prominente de las cerámicas (2). Además la HAP es parte inorgánica muy importante de los tejidos duros del cuerpo animal y humano. El contenido de HAP (junto con algunos iones adsorbidos) representa el 35.0%, 45.5, 70.0 y 96.0% de huesos, cemento, dentina y esmalte respectivamente (3,4).

En los estudios de Hench y Wilson (2) y otros (5) es evidente que la HAP puede tener propiedades fisicoquímicas variables por diversas causas, entre las cuales están la presencia de iones en la interfase y el método de preparación. La HAP generada naturalmente por el cuerpo está en contacto con fluidos biológicos como la sangre y la saliva que contienen iones inorgánicos que bien pueden determinar el comportamiento de este material.

De la estructura interfacial biomaterial-fluido biológico puede depender total o parcialmente la respuesta del organismo.

En el presente trabajo se estudió por medio de la técnica electroforética, el efecto ejercido sobre la HAP por los iones inorgánicos más abundantes en la saliva como son  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{OH}^-$ ,  $\text{H}^+$  y  $\text{PO}_4^{3-}$ . Las concentraciones promedio correspondientes a los cuatro primeros iones en saliva total de adultos es 14.4, 20.7, 3.1 y 23.28 meq/L, el pH promedio es 6.4 y el contenido de fósforo inorgánico 149 mg/L (6).

## PARTE EXPERIMENTAL

En este estudio se empleó  $\text{NaCl}$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  para preparar las soluciones. El pH se ajustó con  $\text{NaOH}$  y  $\text{HCl}$ . Todos los reactivos fueron de calidad analítica. El agua fue destilada y desmineralizada con cartuchos de camada mixta y su conductividad fue de  $0.8 \mu\text{S cm}^{-1}$  o menor a  $19^\circ\text{C}$ .

La HAP fue sintetizada en un trabajo de grado (7) por el método de Jarcho (8) excluyendo el  $\text{CO}_2$  completamente. La sinterización se efectuó entre  $1000$  y  $1100^\circ\text{C}$  durante una hora. La relación molar calcio/fósforo fue de 1.67. El producto se caracterizó por I.R. y S.E.M., además pasó las pruebas establecidas por la U.S.P. XXI para el fosfato de calcio tribásico (9). No se aplicó ninguna precaución para evitar el contacto del  $\text{CO}_2$  atmosférico con la HAP durante los experimentos, ya que el dióxido de carbono tiene acceso al esmalte dental y a los tejidos duros a través de los fluidos biológicos.

Las soluciones de electrolitos se prepararon cubriendo un rango de concentraciones que incluyera los valores normales para saliva total de adultos y luego se saturaron con HAP durante 15 días. Se filtraron por membranas de  $0.22\mu\text{m}$  de diámetro de poro y la ausencia de partículas se constató bajo el ultramicroscopio. Los valores de pH inicial y de equilibrio se midieron a  $37^\circ\text{C}$  al preparar las soluciones y después de medir las movilidades. El pH-metro empleado fue el modelo 820 de Schott, Great Lake Instruments con electrodo combinado, previamente calibrado con el patrón de pH del instrumento y dos soluciones tampón en el rango de lecturas. Las conductividades eléctricas se midieron en el conductímetro del zetámetro y además con un conductímetro Schott Geräte CG-857 con celda de inmersión de electrodos de platino platinizado. El zetámetro usado fue el aparato de microelectroforesis Zeta Meter Inc., New York, N.Y. con celda de Plexiglas y electrodos de platino recubierto con platino negro electrodepositado. La celda fue previamente calibrada en cuanto a diámetro, área transversal, distancia efectiva entre electrodos y tamaño de escala.

La relación sodio-potasio varía de 0.7 para saliva en reposo a 1.35 para saliva en secreción de 2 ml/min, mientras que el contenido de  $\text{Ca}^{++}$  no varía (6). Para estudiar el efecto de estos iones en conjunto, se prepararon dos soluciones, la primera con 20.7 meq/L de potasio, relación sodio-potasio 0.7 y 3.1 meq/L de  $\text{Ca}^{++}$ , solución que se denominó saliva sintética en reposo (SSR), la segunda solución con 20.7 meq/L de potasio, relación sodio-potasio de 1.35 y 3.1 meq/L de  $\text{Ca}^{++}$  se denominó saliva sintética en secreción (SSS). Vale la pena anotar que el contenido de sodio en la saliva, a diferencia del potasio, depende del volumen de secreción (6).

Para comprobar el comportamiento de la saliva natural se empleó una muestra de saliva de un donante adulto sano. La filtración a través de la membrana de  $0.22\mu\text{m}$  fue prácticamente imposible, por lo que se centrifugó a 12000 rpm durante 75 minutos para eliminar bacterias, células y otras partículas que pudieran interferir en la determinación de la movilidad electroforética. Esta muestra no se saturó con HAP por contener calcio y fósforo en cantidades que exceden el producto de actividad

Para efecto de calcular el potencial zeta de HAP/SNC no se puede aproximar la viscosidad a la del agua. La SNC se termostató a  $37^\circ\text{C}$  y se le determinó su viscosidad realtiva en viscosímetro de Ubbelohde. La HAP seca se agregó a los electrolitos a  $37^\circ\text{C}$  entre 5 y 10 minutos antes de verter la suspensión a la celda de lectura.

La velocidad de migración de la HAP se midió bajo un gradiente de potencial fijado según la conductividad eléctrica de cada muestra, y se tomaron entre 12 y 20 lecturas de tiempo y distancia, alternando polaridades para evitar la polarización y formación de gases en los electrodos. El área superficial de la HAP fue de  $0.84\text{ m}^2/\text{g}$  y se halló por el método de B.E.T. con nitrógeno a la temperatura del aire líquido.

## CALCULOS

Se halló la movilidad electroforética con los datos de distancia migrada, tiempo promedio, distancia efectiva de electrodo y potencial eléctrico aplicado. El potencial zeta se calculó con la movilidad, por medio de la ecuación de Henry (11).

Con la fuerza iónica se determinó el espesor de la atmósfera iónica ( $l/K$ ) que rodea las partículas suspendidas. Con el valor  $Ka$  (relación de dimensiones del radio "a" de la partícula coloidal respecto a  $l/K$ ) se calculó el valor de la función  $f_1(Ka)$  para cada muestra. La constante dieléctrica ( $D$ ) que se usó en la ecuación de Henry corresponde a la del agua a 37°C. El valor de  $D=74.17$  se interpoló por regresión lineal de datos en un intervalo de temperaturas superiores e inferiores (12). Se tomó la viscosidad del agua a 37 °C ( $6.915 \times 10^{-3} \text{ g cm}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) para los cálculos, por tratarse de soluciones electrolíticas diluidas y suspensiones de baja tracción sólida. La viscosidad medida para la SNC fue de  $8.03 \times 10^{-3} \text{ g cm}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .

## RESULTADOS Y DISCUSION

En la tabla 1 se hallan los datos de potencial zeta y movilidad electroforética obtenidos en función del pH de equilibrio de suspensiones de HAP. El comportamiento se observa en la figura 1. La curva indica que los iones  $H^+$  y  $OH^-$  son iones determinantes de potencial de suspensiones acuosas de HAP. El punto isoeléctrico (P.I.E.) tiene un valor aproximado de 5.3 a 5.4. Los puntos de carga cero (P.C.C.) que son iguales al P.I.E. cuando no hay adsorción específica han sido reportados con valores entre 4.35 y 8.5 (13). Durante la preparación de las soluciones se observó que el pH variaba al saturar con HAP, creciendo los pH bajos y decreciendo los altos. Igual efecto fue reportado por Bell, Posner y Quirk (13) quienes encontraron que los pH iniciales inferiores al P.I.E. crecen y los superiores disminuyen.

TABLA No. 1  
MOVILIDAD ELECTROFORETICA Y POTENCIAL ZETA DE HAP  
EN FUNCION DEL pH

pHeq	$U_e$	Z
3.68	+1.01	+10.95
6.06	-0.55	-5.86
6.71	-1.22	-13.18
7.23	-1.14	-12.08
7.30	-1.22	-12.92
7.66	-1.48	-15.66
10.30	-2.10	-22.21

$$U_e (\text{cm}^2 \text{s}^{-1} \text{V}^{-1}) \times 10^{-4} = 4 \mu\text{m}$$

$$Z (\text{mV})$$

$$\text{pHeq} = \text{pH en equilibrio}$$

La variación del P.Z. con  $I$  de NaCl (tabla 2) señala valores siempre negativos muy similares a los encontrados por el autor de este trabajo con el mismo sistema en un estudio anterior que empleó una muestra diferente de HAP (14).

El NaCl (figura 2) presenta puntos que para una relación lineal tienen un coeficiente de correlación bajo (-0.547), además de una pendiente negativa (-11.64), que indicaría un leve aumento de potencial zeta negativo con la fuerza iónica. Por estas

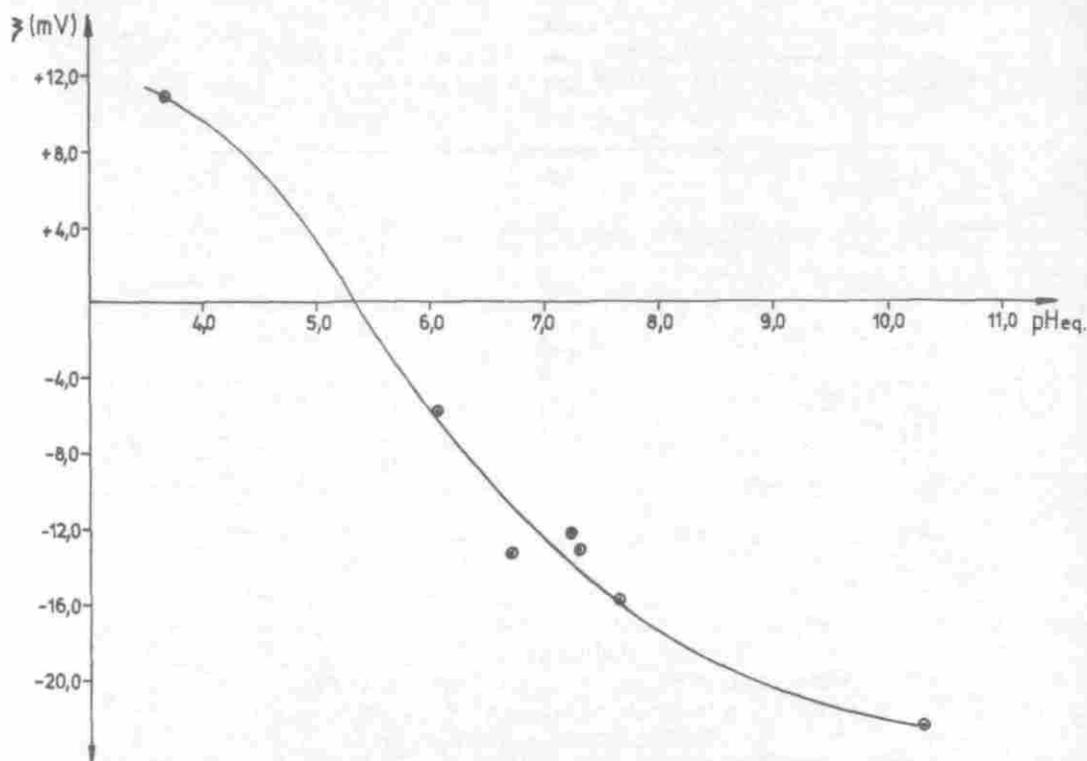


Gráfico 1: Potencial  $Z$  de HAP -vs- pH equilibrio

dos razones y por comparación con la referencia 14 parece mejor relacionar los puntos por una curva. El NaCl ha sido señalado como electrolito indiferente (15) mientras que otros autores (13) lo consideran determinante. El potencial negativo sería originado simplemente porque el pH es superior al PIE.

La curva  $Z$  vs  $l$  para el KCl (tabla 2) tiene un coeficiente de correlación lineal bajo (+0.32), en parte causado porque el pH de la suspensión a  $l=0$  es de 6.71 y el resto de puntos están a pH 7.01-7.08. De cualquier forma la pendiente positiva (+10.44) corresponde a la disminución de  $Z$  con  $l$  creciente por el efecto de compresión de la doble capa (11), que es característico de los electrolitos indiferentes tal como se ha encontrado por técnicas de titulación de superficies (13).

La curva correspondiente al cloruro de calcio (tabla 3, figura 2), muestra que el calcio es un ión determinante muy activo, pues aún a fuerza iónica muy baja es capaz de invertir la polaridad inicialmente negativa. Esta capacidad rebasa la influencia del pH que a valores entre 7.0 y 6.7 debería producir  $P..Z$  negativo (figura 1).

El caso del fosfato es interesante pues tiene dos tendencias opuestas que crecen simultáneamente. Por los datos de la tabla 3 y la figura 2 se nota que el ión fosfato

**TABLA 2**  
**MOVILIDAD ELECTROFORETICA Y POTENCIAL ZETA DE HAP**  
**CONTRA FUERZA IONICA DE NaCl y KCl**

<i>I</i>	pHeq	Ue	Z	
0.00	6.71	-1.22	-13.1	NaCl
0.02	7.05	-1.35	-14.3	NaCl
0.04	7.17	-1.35	-14.3	NaCl
0.08	7.11	-1.23	-13.0	NaCl
0.12	7.07	-1.47	-15.6	NaCl
0.00	6.71	-1.22	-13.1	KCl
0.02	7.08	-1.51	-16.0	KCl
0.04	7.05	-1.21	-12.8	KCl
0.08	7.15	-1.10	-11.6	KCl
0.12	7.01	-1.29	-13.6	KCl

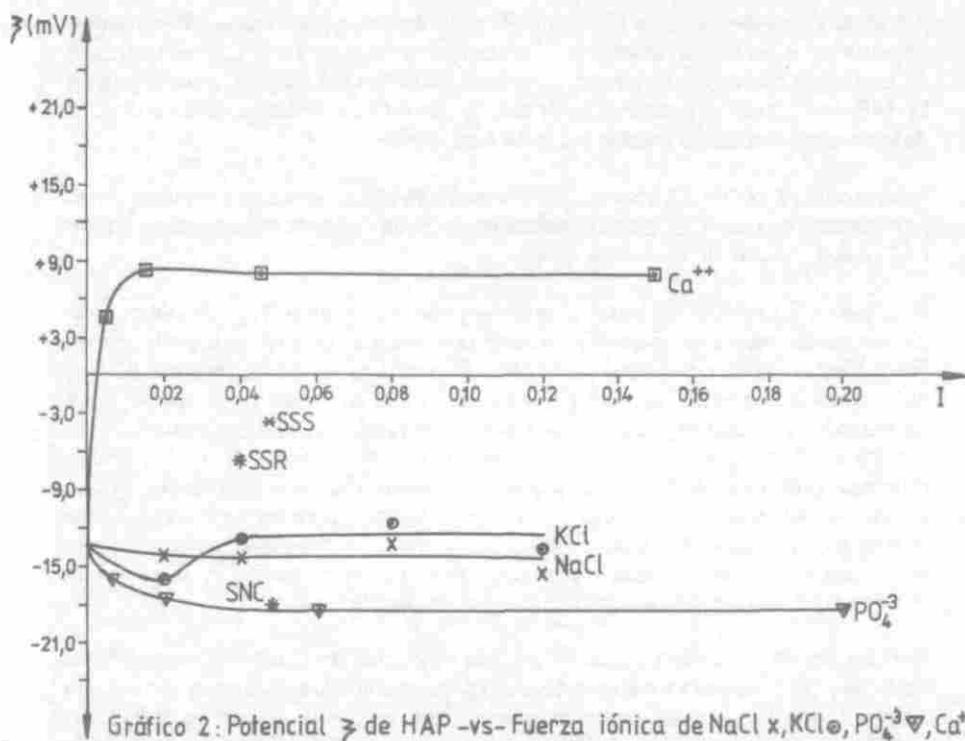
Ue ( $\text{cm}^2\text{s}^{-1} \text{V}^{-1}$ ); Z (mV);  $a=4\mu\text{m}$ ; pHeq = pH en equilibrio

**TABLA No. 3**  
**MOVILIDAD ELECTROFORETICA Y POTENCIAL ZETA**  
**DE HAP EN FUNCION DE FUERZA IONICA DE CaCl<sub>2</sub>**  
**NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, SSR, SSS Y SNC**

<i>I</i>	pHeq	Ue	Z	
0.000	6.71	-1.22	-13.1	CaCl <sub>2</sub>
0.0045	7.00	0.43	4.6	CaCl <sub>2</sub>
0.015	6.72	0.77	8.2	CaCl <sub>2</sub>
0.045	6.73	0.76	8.1	CaCl <sub>2</sub>
0.150	6.76	0.73	8.1	CaCl <sub>2</sub>
0.000	6.71	-1.22	-13.1	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
0.006	6.35	-1.53	-16.2	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
0.020	5.75	-1.65	-17.4	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
0.060	5.22	-1.74	-18.4	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
0.200	4.74	-1.75	-18.5	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
0.0398	6.40	-0.64	-6.7	SSR
0.0476	6.58	-0.36	-3.9	SSS
0.0476	7.15	-1.47	-18.1	SNC

Ue ( $\text{cm}^2\text{s}^{-1}\text{V}^{-1}$ ) $\times 10^{-4}$ ;  $a=4\mu\text{m}$ ; Z (mV); pHeq = pH en equilibrio.

parece acrecentar el potencial ya negativo alcanzando a baja concentración un valor de P.Z. aproximadamente constante. La sal empleada fue  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  que disminuye el pH con el aumento de concentración. Esta sal nos proporciona iones  $\text{H}^+$  y  $\text{PO}_4^{3-}$  que tienden a volver positivo y negativo respectivamente el P.Z. Los puntos



correspondientes a fuerza iónica 0.060 y 0.200 tienen pH inferior al P.I.E. y por lo tanto el potencial debería ser positivo. Sin embargo el efecto del ión fosfato prevalece frente al del pH y en la curva no se nota tendencia a una pendiente positiva en esta zona de la gráfica.

Tanto el  $\text{Ca}^{++}$  como el  $\text{PO}_4^{3-}$  son capaces de contrarrestar el efecto de los iones  $\text{OH}^-$  y  $\text{H}^+$  respectivamente. Se puede decir que probablemente, en cuanto a capacidad de controlar la polaridad, el  $\text{Ca}^{++} = \text{PO}_4^{3-} > \text{OH}^- = \text{H}^+$ . Los iones  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$ , y  $\text{K}^+$  parecen comportarse como electrolitos indiferentes.

El efecto del fosfato es menos notorio que el del calcio por el pH de las suspensiones que causa un corte negativo a  $I=0$ . El efecto comparativo de los dos iones determinantes se podría evaluar mejor si se mantuviera el pH de las soluciones en el P.I.E. y se variara la fuerza iónica de calcio o fosfato.

Para el caso de SSR la fuerza iónica del calcio es suficiente para causar un potencial positivo, sin embargo el potencial es de poca magnitud y negativo. A pH de 6.40 el potencial debería ser del orden de -9.0 mV. El NaCl y el KCl independientemente no parecen afectar el potencial. El calcio es capaz de tornar positivo el potencial negativo causado por el pH, pero en este caso no es así. Cabe pensar en varias posibilidades: a) Que en el lado de la solución se den reacciones que disminuyan la cantidad de calcio disponible (hidrólisis, acomplejamiento por cloruros originados en la disociación del NaCl y el KCl) cosa poco posible por la baja concentración. b)

Adsorción de especies que inhiban la llegada de iones calcio. Esta última puede estar de acuerdo con la referencia 13 en donde se halló que el P.C.C. se desplaza en presencia de NaCl, sugiriendo el reemplazo de  $\text{Na}^+$  por  $\text{Ca}^{++}$  en la superficie de la HAP, con lo cual se podría explicar aquí la aparente disminución de la capacidad determinante del calcio en presencia de NaCl y KCl.

Para el punto Z vs. I de la SSS son cualitativamente válidas las mismas aseveraciones hechas sobre la SSR. En parte la causa de un potencial zeta más cercano a cero podría ser el aumento de fuerza iónica.

El potencial de HAP/SNC, bastante más negativo que el de SSR y SSS se debe al pH un poco más alto, pero aún queda por explicar una tercera parte de su magnitud. La explicación puede yacer en la diferencia de composición entre SNC y las soluciones acuosas SSR y SSS. En la saliva natural se hallan presentes en poca cantidad iones no estudiados en este trabajo como yoduros, magnesio y sustancias orgánicas como úrea, creatinina, aminoácidos, colina, ácido úrico, histamina, mucinas, proteínas, ácido cítrico, láctico, colesterol, vitaminas y enzimas (6) que pueden estar presentes después de la centrifugación y podrían adsorberse sobre la HAP y entonces el efecto de los iones no se ejercería sobre HAP sino sobre una nueva superficie; por ejemplo la adsorción de una proteína con un P.I.E. diferente al de la HAP, alteraría el efecto de los iones estudiados.

El potencial en SNC cae casi sobre la curva de ión fosfato. El resultado de lecturas en SSR y SSS muestra un efecto del calcio muy disminuido. Se podría pensar que es el anión fosfato el que controla el potencial zeta de la HAP en presencia de NaCl y KCl. Por supuesto estas suposiciones requieren más experimentación para evaluar su objetividad. Sería de gran interés estudiar la posible adsorción de especies orgánicas y el papel de los iones inorgánicos en su comportamiento.

#### AGRADECIMIENTOS

Deseo manifestar mi sincero agradecimiento a la Dra. Martha Rodríguez por el suministro de la muestra de HAP

Al Dr. Jesús S. Valencia por la determinación del área superficial.

A las Dras. María Cristina Baquero, Alicia L. Morales y en especial al Dr. Tulio Salcedo C. subgerente de operaciones de la Empresa de Acueducto y Alcantarillado de Bogotá, por su decidida colaboración que hizo posible este trabajo.

#### BIBLIOGRAFIA

1. Guitian F.; Conde-Pumpido R.; Santos C. y Pazo, A. *Bol. Soc. Esp. Ceram. Vidr.*, 1990, 29 (4), 253-257.
2. Hench L.L. and Wilson J., *Science*, 1984, 226, 630-636.
3. Mjor, I.A.; Pindborg, J.J. "*Histología del diente humano*". Editorial Labor. Barcelona, 1974, 1-37.

4. Van Wazer, J.R. "*Phosphorus and its compounds*" Interscience Publishers Inc. New York, 1961, 14-29.
5. Council on Dental Materials, Instruments and Equipment. *J.A.D.A.*, **1984**, 108, 822-831.
6. Konrad Diem y Cornelius Lentner Redactores. "*Documenta Geigy, Tablas científicas*" Ciba Geigy S.A.; Basilea Suiza, 1975.
7. Paredes M.C. y Rodríguez M.D. "Síntesis de hidroxiapatita y su adecuación como material utilizable en prótesis de tejido duro." Tesis de grado, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 1989.
8. Jarcho, M.; Bolen, C.H.; Thomas, M.E.; Bobick, J.; Kay, J.F.; Doremus, R.H. *Journal of materials science*, **1976**, 11, 2027-2035.
9. The United States Pharmacopoeia Convention: The U.S.P. XXI. Mack Printing Co., Easton, Pa., 1984.
10. Davis J.A. and Hayes K.F. Editors; A.C.S. Symposium series 323 American Chemical Society: Washington D.C. 1986, 651.
11. Hunter R.J. "Zeta Potential in Colloid Science". Academic Press: New York, 1981, 71.
12. Weast R.C. editor. "Handbook of Chemistry and Physics" 51 ed. The Chemical Rubber Company, Cleveland, Ohio, 1971.
13. Bell L.C.; Posner A.M. and Quirk J.P.; *Journal of Colloid and Interface Sci.*, **1973**, 42 (2), 250-261.
14. Delgado E. Thesis. an Electrophoretic Study of Some Sparingly Soluble Salts. State University of New York at Buffalo. 1987.
15. Doss, S.K.; *J. Dent. Res.*, **1976**, 55(6), 1067-1075.