

Trabajo Práctico Virtual n°1 *Desmineralización Ácida*

La presente guía de trabajos prácticos describe el procedimiento para cuantificar la desmineralización de muestras mineralizadas (diente, hueso, conchas de moluscos, cáscara de huevo, etc.), lo cual puede efectuarse mediante diversas técnicas. Está considerada como una actividad no presencial.

Se presenta la descripción de los procedimientos y una cápsula audiovisual, preparada por estudiantes de cursos superiores, adicionalmente se agrega material adicional que pudiera complementar esta actividad.

Se añade una pequeña explicación de la metodología espectrofotométrica, que, a pesar de haber sido revisada en la UTE precedente, no está de más repasar, añadimos en esta ocasión el acceso a un simulador para decantar los principios de la ley de Beer y la respuesta de soluciones coloreadas de distinta concentración ante luz de una determinada longitud de onda.

Finalmente se entrega un set de datos experimentales obtenidos por alumnos de generaciones anteriores, de tal suerte que puedan hacer el análisis de los datos.

Se ha considerado que puedan utilizar el tiempo asignado a laboratorio para esta actividad, por esta razón se consigna esta actividad en el programa, no obstante, la gestión del tiempo es resorte de cada estudiante en particular.

A través del foro pueden hacer sus preguntas para socializarlas y ayudar a concretar de la mejor manera posible este trabajo práctico.

Set de Videos y sitios por revisar¹.

Tema	Enlace
1. Cápsula: Trabajo práctico Desmineralización Ácida."	https://youtu.be/CvjuYDGrjvE
Material Complementario	
2. Medición Espectrofotométrica de Fosfato.	https://www.youtube.com/watch?v=p0w_P3ErVGE&list=PLRkAL_FzNWoy5Sas2FxN88oFFZOKDd2pv
3. Ley de Beer y soluciones coloreadas, simulador en línea	https://phet.colorado.edu/sims/html/beers-law-lab/latest/beers-law-lab_es.html
4. Espectrofotometría (Recordatorio)	https://www.youtube.com/watch?v=laHsQIUUaJ4

¹ También se encuentran como enlaces en U-cursos.

I. INTRODUCCIÓN

La parte dura de un diente está compuesta por tres tejidos mineralizados: esmalte, dentina y cemento. El esmalte es de origen epitelial bucal y tiene características químicas - biológicas únicas. La dentina y cemento son de origen mesodérmico y tienen características químicas - biológicas similares al hueso. El esmalte adulto tiene solo un 0,5% de proteína en peso, en comparación con el 20% de hueso y dentina. El esmalte humano tiene un componente inorgánico entre un 95-96%, para dentina, cemento y hueso estos valores están alrededor de un 70%. Los componentes minerales de esmalte, dentina, cemento y hueso están formados por cristales de fosfato de calcio básicos con una distribución espacial de sus átomos equivalentes a la hidroxiapatita mineral. La disolución del tejido mineral dentario, es el mecanismo principal de la caries. Los factores que controlan la disolución es un proceso complejo, donde factores como impurezas, tamaño del cristal, defectos cristalinos, afectan la velocidad de disolución.

El proceso de desmineralización dental puede ser producto de la acción de los ácidos generados a partir del metabolismo bacteriano (caries), o de la ingesta de bebidas y alimentos que contienen sustancias ácidas (erosión dental). En este trabajo práctico se estudiará el efecto desmineralizante del ácido acético que puede emular la producción de ácidos producto del metabolismo bacteriano y el consumo de alimentos.

Además del tejido óseo y dental (Hidroxiapatita), se utilizarán otros dos tejidos biomineralizados, la cáscara de huevo y la concha de un molusco bivalvo, los cuales se encuentran constituidos de fases cristalinas del carbonato de calcio (Aragonita y Calcita); con el propósito de poder comparar su respuesta al proceso de desmineralización respecto a la hidroxiapatita.

II. OBJETIVOS

- Evaluar la desmineralización ácida de apatita en tejido mineralizado (diente y/o hueso), determinando espectrofotométricamente la concentración de fosfato como uno de sus productos de disolución.
- Comparar el grado de desmineralización entre los tejidos óseos, dental y de carbonato de calcio.

III. ENSAYOS

1. Desmineralización ácida de tejidos mineralizados

1.1 Materiales.

- Trozos de huesos.
- Piezas dentales.
- Cascara de huevo previamente secada.
- Concha de “machas” (*Mesodesma donacium*)
- Ácido Acético 5% m/v
- Tubos de ensayo
- Pinzas

1.2 Procedimiento:

1) Tome dos trozos de hueso, dos porciones de conchas, 2 piezas dentales y dos trozos de cascara de huevo y colóquelos en tubos de ensayo rotulados, agrégueles 10 ml de la solución de ácido acético y manténgalos en contacto con ella durante 10 minutos para un set y 30 minutos para otro set, agitando esporádicamente.

2) Retire los trozos de hueso de cada tubo con una pinza y rotule las soluciones obtenidas indicando la solución ácida y el número de su grupo. Ésta solución obtenida se utilizará para determinar fosfato y calcio como medida de desmineralización.

2. Determinación de fosfatos.

2.1 Principio:

El fosfato de naturaleza inorgánica presente en el material biológico, forma con el molibdato de sodio un fosfomolibdato, que por reducción, se convierte en azul de molibdeno, determinable por espectrofotometría; y que es proporcional a la cantidad de fosfato inorgánico presente:

2.2 Materiales

- Espectrofotómetro (Jenway, Unicam).
- Reactivo 1: Solución Bisulfito -Borato: $0,19 \text{ M} - 5,2 \times 10^{-2} \text{ M}$.
- Reactivo 2: Solución Molibdato de Sodio- Ácido Sulfúrico: $0,1 \text{ M} - 2,6 \text{ N}$.
- Reactivo 3: Solución Reductora (Sulfato P-Metilaminofenol)-Bisulfito: $2,9 \times 10^{-2} \text{ M} - 0,32 \text{ M}$.
- Reactivo 4: Solución Sulfito- Carbonato (Desproteinizadora) $5,5 \times 10^{-2} \text{ M} - 0,4 \text{ M}$
- Reactivo 5: Solución Patrón Fosfato: $5 \text{ mg P} / 100 \text{ ml}$ solución.
- Matraces aforados de 10 ml o tubos de ensayo
- Pipetas de 1 ml graduadas al 0,1
- Pipetas de 2 ml
- Agua destilada.

2.3 Curva de Calibración

- Marque 5 matraces aforados de 10 ml según la siguiente tabla y agregue a cada uno de ellos los reactivos correspondientes y en el orden determinado. Cumpla con cada etapa de la reacción:
- Agregue a cada matraz o tubo:
 - 1,0 ml de Reactivo 1
 - 0,2 ml de Reactivo 2
 - 0,2 ml de Reactivo 3
- Tapar los matraces, mezclar bien y dejar reposar por 15 minutos a temperatura ambiente.
- Agregar a cada matraz 2 ml de reactivo 4.
- Mezclar bien, enrasar con agua a 10 ml.
- Transfiera parte de la solución a una cubeta de plástico para espectrofotometría, mida transmitancia o absorbancia a 750 nm, según el espectrofotómetro usado.
- Complete la siguiente tabla y calcule $A = 2 - \log T$ en caso de ser necesario.

Matraz n°	Reactivo 5 (ml)	Conc. Fosfato (mgP/100ml)	%T	A
1	0	0,00		
2	0.1	0,05		
3	0.2	0,10		
4	0.3	0,15		
5	0.4	0,20		

- Grafique en una planilla de cálculo Absorbancia v/s la concentración de Fosfato (mg/100 ml) y calcule a partir de estos datos la ecuación de regresión lineal correspondiente (ecuación de la recta).

2.4 Mediciones espectrofotométricas de las muestras.

- Tome 1ml de las soluciones de desmineralización, transfíralas a matraces de aforo de 10 ml.
- Luego agregue los reactivos (reactivo 1, 2, 3 y 4) en la secuencia antes indicada (ver 2.3).
- Mida Absorbancia o Transmitancia a 750 nm según corresponda.

Cálculos:

Calcule la concentración de fosfato en cada muestra, utilizando la ecuación de la recta de la curva de calibración. Para esto reemplace el valor de la Absorbancia en la ecuación ($C = mA + b$). El valor de concentración obtenido se multiplica por 10 para obtener la concentración real de Fosfato en la muestra (mg/100ml).

3. CuadroResumen:

Complete el siguiente cuadro con sus resultados experimentales.

	<i>Especie</i>	<i>Tiempo de desmineralización (min)</i>	<i>Concentración de Fosfato (mg/100ml)</i>
1	<i>Diente</i>	10	
		30	
2	<i>Hueso</i>	10	
		30	
3	<i>Cáscara de</i>	10	
		30	
4	<i>Concha de Macha</i>	10	
		30	

NOTA: Si utiliza tubos de ensayo, complete a 10ml sumando los volúmenes utilizados y completando con agua destilada por diferencia.

IV. Cuestionario.

- 5.1 ¿Cuál es la similitud entre el ácido acético y los ácidos sindicados como causantes de caries dental?
- 5.2 ¿Cómo es el grado de desmineralización en el hueso respecto al diente? ¿De qué factores depende este proceso?
- 5.3 ¿Cómo podría expresar sus resultados para que ellos reflejaran velocidad de disolución de apatita del tejido mineralizado?
- 5.4 ¿Podría usted determinar la masa de tejido desmineralizado? Explique como lo haría teórica y experimentalmente.
- 5.5 ¿Qué similitudes y diferencias puede señalar entre los tejidos mineralizados que tratará con ácido acético?
- 5.6 ¿Qué otros ácidos pueden tener características similares a los que se producen o permanecen en el ambiente bucal?
- 5.7 ¿Qué otros iones puede usted medir para dar cuenta del proceso de desmineralización?

Anexo: FUNDAMENTOS DE ESPECTROFOTOMETRÍA

I. Introducción

La espectrofotometría es un método de análisis ampliamente utilizado en diferentes áreas. Éste método se basa en la relación que existe entre la absorción de luz por parte de un compuesto y su concentración. Cuando se hace incidir luz monocromática (de una sola longitud de onda) sobre un medio homogéneo, una parte de la luz incidente es absorbida por el medio y otra transmitida. Como consecuencia de esta interacción la intensidad del rayo de luz es atenuada desde P_0 a P , siendo P_0 la intensidad de la luz incidente y P la intensidad del rayo de luz transmitido. Dependiendo del compuesto y el tipo de absorción a medir, la muestra puede estar en fase líquida, sólida o gaseosa. En las regiones visibles y ultravioleta del espectro electromagnético, la muestra es generalmente disuelta para formar una solución.

Cada sustancia tiene su propio espectro de absorción, el cual es una curva que muestra la cantidad de energía radiante absorbida por la sustancia, conocida como **Absorbancia (A)**. Este valor es específico para cada longitud de onda del espectro electromagnético. De este modo, a una determinada longitud de onda de la energía radiante, cada sustancia absorbe una cantidad de radiación que es distinta de la absorbida por otro compuesto (Fig. 1).

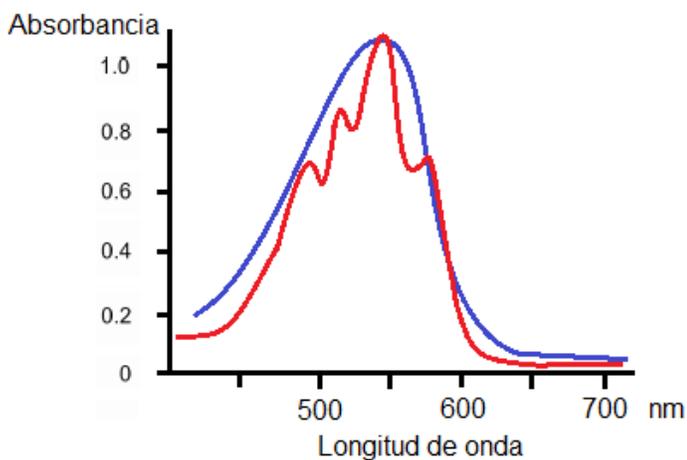


Fig.1 Espectro de absorción de dos compuestos diferentes.

El método espectrofotométrico se rige por dos leyes fundamentales: Ley de Lambert y Ley de Beer.

1. Ley de Lambert.

Esta ley establece que cuando pasa luz monocromática por un medio homogéneo, la disminución de la intensidad del haz de luz incidente es proporcional al espesor del medio, lo que equivale a decir que

la intensidad de la luz transmitida disminuye exponencialmente al aumentar aritméticamente el espesor del medio absorbente (Fig. 2).

La siguiente relación matemática da cuenta de esta ley:

$$P/P_0 = e^{-kb}$$

P₀: Intensidad de la luz incidente

P: Intensidad de la luz transmitida

b: Espesor del medio absorbente

k: Constante, cuyo valor depende de la naturaleza

del soluto, de la longitud de onda de la luz incidente, del espesor del medio absorbente y de la naturaleza del medio.

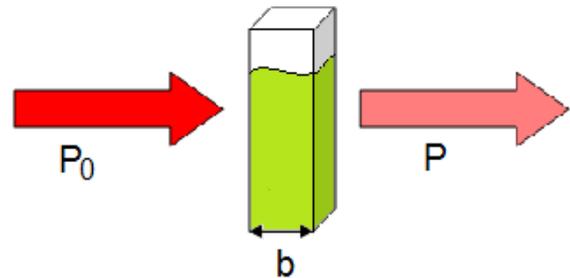


Fig. 2 Ley de Lambert

2. Ley de Beer.

La intensidad de un haz de luz monocromática disminuye exponencialmente al aumentar aritméticamente la concentración de la sustancia absorbente, cuando este haz pasa a través de un medio homogéneo (Fig. 3). La relación matemática que da cuenta de esta ley se muestra a continuación:

$$P/P_0 = e^{-k'c}$$

P₀: Intensidad de la luz incidente

P: Intensidad de la luz transmitida

C: Concentración de la solución

k': Constante, cuyo valor depende de la naturaleza del soluto, de la longitud de onda de la luz incidente, de la concentración de la solución, y frecuentemente, de la naturaleza del medio.

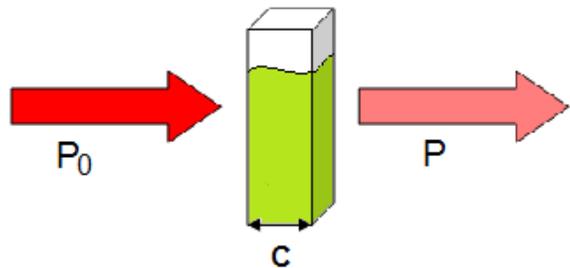


Fig. 3 Ley de Beer

Ambas leyes se combinan en una sola, generando la Ley de Lambert-Beer

$$\log (P_0 / P) = a b c \quad \text{ó} \quad A = a b c$$

$$A = \log (P_0 / P) = - \log T$$

Donde

a : Absortividad.

b : Longitud o espesor del medio
(longitud de la cubeta).

c: Concentración de la solución.

P/P₀= **T** : Transmitancia

Los términos absorbancia y transmitancia son definidos a continuación

Transmitancia (T): Es la razón entre la luz monocromática transmitida (P) por una muestra y la energía o luz incidente (P_0) sobre ella. Tanto la energía radiante incidente como la transmitida deben ser medidas a la misma longitud de onda.

$$T = P / P_0 = 10^{-abc} \quad \text{ó} \quad \%T = 100 P / P_0$$

Se acostumbra a considerar la transmitida como la razón de la luz transmitida por la muestra y la luz transmitida por un estándar arbitrario. Este estándar puede ser el líquido (solvente) en que esta disuelta la muestra, aire, blanco analítico (solución que contiene todos los componentes de la solución problema menos la sustancia problema) u otra sustancia elegida arbitrariamente. Debido a que la transmitancia de este estándar no es necesariamente 100%, es necesario especificar el estándar con el cual la muestra es comparada.

Absorbancia (A): Se define como la cantidad de energía radiante absorbida por una sustancia pura o en solución. Matemáticamente, corresponde al logaritmo negativo de la transmitancia (T), transmitancia expresada como porcentaje (%T).

$$A = -\log T = 2 - \log \%T$$

Pero.

$$T = P / P_0 = 10^{-abc}$$

Luego

$$A = -\log (P / P_0) = -\log 10^{-abc}$$

$$A = abc$$

Esta ecuación indica que la absorbancia es una función lineal de la concentración, donde a es una constante de proporcionalidad llamada absorptividad. La magnitud depende de las unidades de b y c. Si la concentración c está expresada en moles por litro y la longitud de la cubeta b en centímetros, la constante a recibe el nombre de absorptividad molar (ξ). Luego

$$A = \xi bc$$