

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



PROPUESTA DE ANALISIS QUIMICO DE CONCENTRACION DE ALFA-
AMILASA, COMO PRUEBA PRESUNTIVA DE SOMNOLENCIA AL VOLANTE
EN ACCIDENTES DE TRANSITO

INFORME FINAL DEL TRABAJO DE GRADO EN MODALIDAD CURSO DE
ESPECIALIZACION

MARVIN OMAR ACOSTA PLEITEZ
LIGIA MARIA OSORIO ZECEÑA

PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIADO(A) EN QUIMICA Y FARMACIA

NOVIEMBRE 2022

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

MAESTRO ROGER ARMANDO ARIAS ALVARADO

SECRETARIO GENERAL

ING. FRANCISCO ANTONIO ALARCON SANDOVAL

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANA

LICDA. REINA MARIBEL GALDAMEZ

SECRETARIO INTERINO

MAE.ROBERTO EDUARDO GARCÍA ERAZO

DIRECCION DE PROCESOS DE GRADO

DIRECTORA GENERAL

MSC. ENA EDITH HERRERA SALAZAR

TRIBUNAL EVALUADOR

ASESORAS

MAE. NANCY ZULEYMA GONZÁLEZ SOSA

LICDA. ARIANA LISSETTE GARCÍA DE VENTURA

TUTORA

LICDA. LORENA MARGARITA RAMÍREZ MERCADO

AGRADECIMIENTOS

A Dios. Por darnos la sabiduría y fuerza para culminar esta etapa académica.

A nuestras tutoras del curso de especialización, Licda. Lorena Margarita Ramírez Mercado y Maestra Nancy Zuleyma González Sosa. Por su guía, comprensión, paciencia, entrega y valiosos consejos y observaciones a lo largo del proceso de investigación.

MARVIN OMAR ACOSTA PLEITEZ
LIGIA MARIA OSORIO ZECEÑA

DEDICATORIA

A Dios todo poderoso, por darme todo lo necesario para poder culminar exitosamente ésta etapa de mi vida.

A la Santísima Virgen María por su intercesión ante su hijo, para llevar a feliz término éste proyecto académico.

A mi Mamá, Brumilda de Jesús Pleitez, por educarme en valores y virtudes, por darme todo el apoyo durante toda la vida.

A mi esposa, Noris Edelmira Merlos de Acosta, por ser mi mano derecha, por su comprensión y apoyo incondicional.

A mi hermana, Karina Estefany Pleitez y su fallecido esposo, Mario Edgardo Pleitez, por ayudarme económicamente en mis necesidades académicas.

A licenciada Deysi Nohemi Ramirez, Maestra Elida del Carmen Magaña, Presbítero Reino De los Ángeles Morán por ese impulso y confianza que pusieron en mí, porque me hicieron creer que la mano de Dios estaría conmigo, y porque financiaron incondicionalmente parte de mis estudios.

A mi tía, Francisca Pleitez, por brindarme toda su hospitalidad incondicionalmente.

A mi compañera, Ligia María Osorio Zeceña, por esa dedicación y esmero inagotables expresados a lo largo de esta investigación, si los cuales no se habría conseguido tan buen trabajo.

Marvin Omar Acosta Pleitez

DEDICATORIA

A Dios por darme salud, sabiduría y la fortaleza en momentos difíciles, por la voluntad para culminar mis estudios.

Una dedicatoria especial a mi padre Alfredo Osorio, quien fue y sigue siendo mi ejemplo a seguir, siempre permanecerás en mi mente y corazón.

A mi madre Nicomedes Zeceña le dedico todo mi esfuerzo, gracias por tu ayuda incondicional, cariño, comprensión y amor brindado en todo momento.

A mis hermanos Cristina y Luis Osorio, por que sin ellos nada sería igual, gracias por todos los momentos juntos compartidos.

A toda mi familia que son un pilar fundamental en mi vida, especialmente a mi abuela Teresa Osorio y mis tías Hilda, Marta y Cristina, quienes me apoyaron de gran manera en los momentos que más lo necesite, agradezco sus consejos y cariño incondicional. Gracias por todo.

Le agradezco a mi compañero Marvin por todo el esfuerzo, ayuda y dedicación brindada a lo largo de nuestro proyecto.

A mis amigos, compañeros y profesores que contribuyeron a este logro, gracias por compartir su sabiduría y por brindarme su ayuda.

Ligia María Osorio Zeceña

INDICE GENERAL

	N.º pág.
Resumen	
Capitulo I	
1.0 Introduccion	XII
Capitulo II	
2.0 Objetivos	
Capitulo III	
3.0 Marco teorico	18
3.1 Accidentes de Tráfico y la Somnolencia al Volante	18
3.2 El Sueño	19
3.2.1 Fases del Sueño	19
3.2.2 Control Circadiano del sueño	21
3.2.3 Somnolencia diurna	22
3.3 El Estrés y su Relación con la Somnolencia	24
3.3.1 Respuesta del organismo ante los estímulos del estrés	24
3.4 La Saliva	25
3.4.1 Cantidad y Composición de la Saliva	26
3.4.2 Control nervioso de la secreción bucal	27
3.4.3 Alfa-amilasa	27
3.4.4 Factores que afectan el flujo salival	28
3.5 Fundamentos químicos referentes a la cuantificación de alfa-amilasa salival.	29

Capitulo IV	
4.0 Diseño metodologico	32
4.1 Tipo de Estudio	32
4.2 Investigación bibliográfica:	32
4.3 Procedimiento	33
4.3.1 Búsqueda del material bibliográfico para su selección.	33
4.3.2 Análisis y selección del material consultado.	33
4.3.3 Diseño de una Práctica de laboratorio	34
Capitulo V	
5.0 Práctica de laboratorio	36
Capitulo VI	
5.0 Conclusiones	51
Capitulo VII	
6.0 Recomendaciones	53
Bibliografia	
Anexos	

INDICE DE TABLAS

Tabla N. °		N.° pág.
1	Estudios que han permitido comparar la concentración de la AASH	29
2	Dilución de las soluciones para la curva estándar.	43
3	Recolección de las absorbancias para la curva estándar.	43
4	Información de recolección de muestra de alfa-amilasa.	45
5	Recolección de las absorbancias para las muestras (por triplicado) y el blanco.	48

INDICE DE FIGURAS

Figura N. °		N.° pág.
1	Reacción de oxidación de azúcares reductores, método DNS	39
2	Pasos para recolección de muestra de saliva.	44
3	Esquema de dilución de la muestra.	45
4	Especificaciones del espectrofotómetro Shimadzu UV-1800	64
5	Especificaciones de la incubadora con agitación orbital	65
6	Preparación de reactivos	67
7	Elaboración del reactivo de color	68
8	Elaboración del Estándar de maltosa 0.2% p/v	69

INDICE DE ANEXOS

ANEXO N.º

- 1 Datos estadísticos de accidentes de vehículo de motor o sin motor, tipo de vehículo no especificado.
- 2 Lineamientos de la práctica de laboratorio
- 3 Especificaciones del Espectrofotómetro Shimadzu uv-1800
- 4 Especificaciones de la Incubadora con agitación orbital TE-4200
- 5 Preparación de reactivos
- 6 Hoja de resultados

RESUMEN

La somnolencia provocada por la falta de descanso y los efectos que esta ocasiona en el organismo, disminuyen las habilidades de un conductor y su capacidad de respuesta, aumentando así la probabilidad de accidentes de tránsito.

La presente investigación tuvo como objetivo la elaboración de una “propuesta de análisis químico de concentración de alfa-amilasa, como prueba presuntiva de somnolencia al volante en accidentes de tránsito”. La metodología utilizada fue bibliográfica y documental. Realizando primeramente la búsqueda del material bibliográfico para su selección, delimitando el material consultado y finalmente diseñando una práctica de laboratorio.

La investigación realizada de la relación entre alfa amilasa, la somnolencia o falta de descanso como causa significativa de accidentes de tránsito, permitió obtener como producto final la elaboración de una propuesta de práctica de laboratorio de análisis químico de concentración de alfa-amilasa, como prueba presuntiva de somnolencia al volante en accidentes de tránsito.

La práctica de laboratorio propuesta consiste en la realización de un análisis cuantitativo indirecto de la concentración de la alfa amilasa salival utilizando como muestra de análisis la saliva humana; aplicando el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico. Esta propuesta ofrece una potencial respuesta a la necesidad de nuevas alternativas de análisis químico dentro de las investigaciones forenses, teniendo en cuenta que la técnica utilizada es de baja complejidad, bajo costo de implementación, requiere de equipo poco sofisticado, por lo cual, se recomienda la implementación de la propuesta de la práctica en el laboratorio de Química Forense y Toxicología de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.

CAPITULO I

INTRODUCCION

1.0 INTRODUCCION

La alta incidencia de accidentes automovilísticos en El Salvador, según información proporcionada por La Dirección General de Estadística y Censos de El Salvador (DIGESTYC), evocó la necesidad de investigar las causas que los provocan, considerando que dicha incidencia es la segunda causa de muerte a nivel de las Américas.

La somnolencia a causa de falta de descanso, genera efectos en el organismo que disminuyen las habilidades del conductor y su capacidad de respuesta para evadir colisiones en la carretera, aumentando así la probabilidad de los accidentes de tránsito.

El conductor somnoliento no se encuentra catalogado como “conductor temerario” dentro del Reglamento General de Tránsito y Seguridad Vial de El Salvador, sin embargo, este tipo de conductor puede ocasionar accidentes con implicaciones legales, especialmente cuando el suceso conlleva la pérdida de vidas humanas o materiales. A pesar de los grandes avances en cuanto a métodos de análisis en escenas de accidentes de tránsito, a la fecha no se registran estudios de análisis químico que puedan dar resultados certeros del estado de somnolencia de un conductor implicado en tal acontecimiento vial.

En investigaciones que anteceden a ésta se hace referencia a la necesidad de monitorear e investigar los trastornos del sueño, puesto que con ello se podría reducir la probabilidad de los accidentes de tránsito que conlleva a lesiones y la pérdida de vidas humanas asociadas, así mismo se establece que la concentración proteica salival, y por ende la concentración de la alfa amilasa salival se ve disminuida durante el sueño nocturno, lo cual indica que una persona en estado de somnolencia por falta de descanso, al no experimentar dicha disminución durante el ciclo nocturno, ha de presentar una significativa elevación de la concentración de tal enzima.

Como resultado de la investigación bibliográfica y documental llevada a cabo en el curso de especialización “Análisis Químico Aplicado a la Investigación Criminal” de la Facultad de Química y Farmacia, de la Universidad de El Salvador, se diseñó una práctica de laboratorio tomando en cuenta la relación existente entre las concentraciones salivales de alfa-amilasa, la somnolencia al volante y su repercusión en accidentes de tránsito, la finalidad de dicha práctica es la cuantificación indirecta de la alfa amilasa salival, como potencial biomarcador del estado de somnolencia por falta de descanso.

CAPITULO II

OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Proponer un análisis químico de concentración de alfa-amilasa como prueba presuntiva de somnolencia al volante en accidentes de tránsito.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Realizar una búsqueda bibliográfica exhaustiva que contenga información relacionada a la alfa-amilasa y la relación de esta con la somnolencia y los accidentes de tránsito.

2.2.2 Seleccionar la información pertinente mediante la lectura y análisis crítico de todo el material bibliográfico consultado.

2.2.2 Diseñar una práctica de laboratorio para cuantificar la presencia de alfa-amilasa salival en una muestra de saliva humana.

CAPITULO III
MARCO TEORICO

3.0 MARCO TEORICO

3.1 Accidentes de Tráfico y la Somnolencia al Volante

Se calcula que cada año 1.2 millones de accidentes automovilísticos se deben a conductores somnolientos, y causan cerca del 20% de todas las lesiones graves y muertes por estos incidentes. El tiempo de reacción (de las acciones evasivas) se afecta igual con la falta de sueño por 24 h que con una concentración sanguínea de alcohol de 0.10 g/100 mL (lo cual, legalmente, se considera estado de ebriedad en los 50 estados de E.U.)¹; considerando a una persona que se encuentre en ese porcentaje de alcoholemia en El Salvador como: conductor temerario.

Los accidentes de tráfico son aquellos sucesos eventuales relacionados con la circulación de vehículos por las diferentes vías y que, generalmente, son consecuencia de una colisión que causa una alteración del desplazamiento normal y que ocasiona daños en los elementos implicados: vehículos, personas, cargas e infraestructuras.²

Los accidentes de tráfico pueden producirse por factores como²:

Factor humano: es considerada la causa del mayor porcentaje de accidentes de tráfico. Dentro de este mismo se consideran otros factores como la conducción bajo el efecto del consumo de sustancias depresoras del sistema nervioso como las drogas, alcohol y medicamentos; causas orgánicas como pérdida de visión, también se consideran las maniobras y el incumplimiento de normas y señales de tránsito.

Factor Mecánico: La circulación de vehículos en mal estado y mantenimiento inadecuado.

Factor climatológico: con frecuencia se dan por la lluvia, el hielo y la niebla.

Factores de la calzada: Pueden dar lugar a accidentes, un firme en mal estado, una carretera mal señalizada, elementos extraños que impidan la adherencia de los neumáticos, curvas mal diseñadas, excesiva o deficiente señalización y otras.

Los accidentes de tráfico se pueden clasificar según la gravedad de las lesiones a las personas y los daños materiales que pueden causar: accidentes solo con daños materiales (sin víctimas), accidentes solo con víctimas (sin daños materiales) y accidentes con víctimas y daños materiales.

En los accidentes de tráfico mortales hay intervención de comisiones judiciales y de médicos forenses, se elabora un atestado policial con carácter de denuncia y consta de los datos del accidente, del vehículo y de las personas que han sido implicadas, el clima al momento del accidente, el estado de las calzadas, el estado y las declaraciones de los implicados; por lo tanto, el atestado es un documento muy importante, debido a que con estos datos se realizan posteriores análisis y estudios.

3.2 El Sueño

Definiciones:

Para algunos autores, el sueño se va a definir como “el estado de inconsciencia del que puede ser despertada una persona mediante estímulos sensitivos o de otro tipo”.³

También el sueño es definido, según el Diccionario de Términos Médicos de la Real Academia Nacional de Medicina de España (2012)⁴ como: Estado fisiológico del adulto que ocurre normalmente cada 24 horas acoplado a la

noche. Es el más evidente de los ritmos biológicos circadianos y se caracteriza por una reducción de la vigilancia, que revierte espontáneamente o ante estímulos que provocan el despertar. El sueño no es un estado uniforme a lo largo de la noche. Mediante los estudios poligráficos (electroencefalograma, electromiograma, electrooculograma, movimientos respiratorios, electrocardiograma, etc.) se distinguen dos grandes tipos de sueño: el sueño no REM (Movimientos Oculares Rápidos, según sus siglas en inglés), que a su vez tiene cuatro fases en función de los diferentes ritmos del electroencefalograma, y el sueño REM, caracterizado por las salvas de movimientos rápidos oculares conjugados y durante el cual ocurren los ensueños. La organización y la duración del sueño varían con la edad y entre unas y otras personas de manera fisiológica. El sueño está regulado autónomamente por diferentes centros cerebrales y es en gran parte independiente de los cambios fisiológicos que se producen en otros órganos del cuerpo.

Se ha postulado que el sueño sirve para muchas funciones, entre las cuales se mencionan: la madurez nerviosa, la facilitación del aprendizaje o la memoria, la cognición y la conservación de energía metabólica.³

3.2.1 Fases del Sueño

Al dormir se atraviesan dos fases de sueño que de forma normal ocurren siempre en el mismo ciclo: sueño de movimientos oculares rápidos (REM) y el sueño de ondas lentas (no REM).

El sueño no REM tiene cuatro etapas:

La etapa 1 (somnolencia) se caracteriza por una ligera desaceleración del EEG (Electro Encefalograma), es la transición de la vigilia al sueño; la etapa 2 (sueño superficial) tiene husos y complejos K de alta amplitud, durante este periodo el tono muscular se reduce; Las etapas 3 y 4 tienen ondas delta lentas

y de gran amplitud, refleja una reducción adicional de la excitación y del tono muscular, la fase 4 es la del sueño más profundo y junto con la etapa 3 se conoce como sueño delta.⁵

El sueño REM se distingue por los movimientos oculares, la pérdida del tono muscular y un patrón de actividad de alta frecuencia y baja amplitud.⁵

Según investigaciones, se ha determinado que en una noche típica de sueño, un adulto joven, primero ingresa al sueño no REM, pasa por las etapas 1 y 2, y transita de 70 a 100 minutos por las etapas 3 y 4. Entonces el sueño se aligera. Y luego sigue un periodo REM. Durante la noche, este ciclo se repite a intervalos de aproximadamente 90 minutos. Los ciclos son similares, aunque hay menos sueño en las etapas 3 y 4, y más sueño REM hacia la mañana, por tanto, ocurren, por la noche, de cuatro a seis periodos REM. El sueño REM ocupa 80% del tiempo total de sueño en los bebés prematuros y 50% en los recién nacidos a término. A partir de entonces, la proporción de sueño REM disminuye de forma rápida y se estabiliza en aproximadamente 25%, hasta que se reduce alrededor de 20% en los ancianos. Los niños tienen más tiempo total de sueño (8–10 h) en comparación con la mayoría de los adultos (aproximadamente 6 h).⁶

3.2.2 Control Circadiano del sueño

El sistema circadiano es un sistema basado en ciclos de 24 horas, y existe en todo el individuo, tanto en los órganos como en las células, se presentan ciclos en sus funciones y estas dependen de acuerdo al día y la noche; por ejemplo, hay órganos que a lo largo del día cambian su estado en momentos de descanso o de actividad, optimizando esfuerzos y energía para dar respuestas adecuadas según la hora del día.

Los ciclos circadianos se sincronizan con los sucesos del medio ambiente. Las variables ambientales que sincronizan el marcapasos circadiano se denominan zeitgebers (sincronizadores). La luz es el principal zeitgebers que ayuda a un organismo a adaptarse al ciclo de luz y oscuridad a medida que varía a lo largo de las estaciones. Otros zeitgebers que sincronizan los relojes circadianos son la temperatura, la disponibilidad de alimento y los factores sociales.⁶

Los ritmos circadianos de los mamíferos que están sincronizados por la luz ambiental están controlados por el núcleo supraquiasmático (NSC) y es el principal marcapasos de los ritmos neuroendocrinos, el ciclo de la temperatura y los periodos de sueño REM. El NSC se localiza en la línea media anterior del hipotálamo, inmediatamente por encima del quiasma óptico. El NSC está compuesto por aproximadamente 20.000 neuronas, cada uno de los cuales se cree que contiene un oscilador circadiano celular autónomo.⁶

3.2.3 Somnolencia diurna

Es posible que algunas personas al tener un trastorno del sueño presenten “somnolencia o cansancio durante el día, dificultades para iniciar o mantener el sueño, o comportamientos inusuales durante el sueño”.¹

Un trastorno del sueño puede ser provocado por desfase de horarios, ciclos alterados del sueño debido a trabajos post turnos, efectos secundarios de medicamentos, factores psicológicos y enfermedad.

La somnolencia ocurre por la necesidad de dormir y puede ser un signo del trastorno del sueño, y se considera que la depresión, la ansiedad, el estrés y el aburrimiento pueden contribuir a la somnolencia, provocando pesadez y torpeza motivadas por el sueño. “En fines clínicos es usado el término "somnolencia" para describir la propensión a quedarse dormido”.⁷

Según algunas estadísticas “hasta 25% de la población adulta tiene somnolencia diurna persistente que afecta su capacidad para tener un desempeño óptimo en la escuela, el trabajo, al conducir y en otras condiciones que requieren el estado de alerta. Los estudiantes somnolientos a menudo tienen dificultades para mantenerse despiertos y atentos. Más de la mitad de los estadounidenses se ha quedado dormido mientras conduce”.¹

Entre los trastornos que pueden causar somnolencia se encuentran los siguientes:¹

Sueño insuficiente:

Este síndrome es quizá la causa más frecuente de somnolencia diurna excesiva. El sueño insuficiente es muy común entre los trabajadores con cambio de turno, aquellos con varios empleos y los de grupos socioeconómicos bajos; el cual puede ser provocado por la exposición lumínica muy tarde en la noche, el uso del televisor, los videojuegos, las redes sociales, el envío de mensajes de texto y el uso de teléfonos inteligentes y por esta razón a menudo se retrasa la hora de acostarse a pesar de la necesidad de despertar temprano a una hora fija para ir al trabajo o a la escuela.

Como es usual con cualquier trastorno que causa somnolencia, “las personas con insuficiencia crónica de sueño pueden estar distraídas, irritables, desmotivadas y deprimidas, además de dificultades en la escuela, trabajo y para conducir”.

Síndromes de apnea durante el sueño:

La disfunción respiratoria durante el sueño es una causa frecuente y grave de somnolencia excesiva durante el día, además de trastornar el sueño nocturno. Al menos 24% de los varones de edad madura y 9% de las mujeres de esa edad en Estados Unidos tienen una reducción o cese de la respiración

docenas de veces o más cada noche mientras duermen; el 9% de los varones y 4% de las mujeres tienen más de 100 episodios por noche; estos pueden ser resultado de oclusión de la vía respiratoria (apnea obstructiva durante el sueño), ausencia de esfuerzo respiratorio (apnea central durante el sueño) o una combinación de ambos factores (apnea mixta durante el sueño).

Narcolepsia:

La narcolepsia se caracteriza por dificultad para mantener el estado de alerta, regulación anormal del sueño REM y sueño nocturno alterado. Todos los pacientes con narcolepsia tienen somnolencia diurna excesiva, que a menudo es intensa, aunque en algunos es leve.

3.3 El Estrés y su Relación con la Somnolencia

Definiciones del estrés:

Según la definición del Diccionario de la Real Academia Española, “el estrés es la tensión provocada por situaciones agobiantes que originan reacciones psicósomáticas o trastornos psicológicos a veces graves”.⁸ Por tanto, las alteraciones en el sueño o la privación del mismo constituyen un origen o causal de estrés.

Según Romero *et al.* El estrés se define como “el mecanismo de enlace entre un agente estresor y su órgano diana, resultando en una respuesta psicofisiológica, caracterizada por liberación de glucocorticoides”.⁹

3.3.1 Respuesta del organismo ante los estímulos del estrés

“En los mamíferos la respuesta al estrés está mediada por dos sistemas distintos, los cuales están interrelacionados, estos son: El sistema simpático adrenomedular (SAM) y el sistema hipotalámico-pituitario-adrenocortical (HPA)”.⁹

Del Río menciona:

Las alteraciones del sueño como consecuencia del estrés se pueden ver desde una perspectiva bidireccional, ya que las alteraciones del sueño producen estrés y, a su vez, el estrés genera cambios en el ciclo sueño-vigilia. La privación de sueño en el ser humano genera estrés, lentitud de pensamiento, dificultad para lograr concentración y percepción precisa, fatiga e irritabilidad, nerviosismo, mal talante.¹⁰

“Entre los marcadores salivales, la alfa-amilasa salival (AAS) se presenta como un indicador confiable de la actividad simpático adrenomedular. Es una de las principales enzimas salivales en los seres humanos, secretada por las glándulas salivales bajo estímulo simpático”.¹¹

Con base en lo anterior se establece la cuantificación de alfa-amilasa salival como potencial biomarcador del estado de somnolencia, esto no implica que se descarten otros factores desencadenantes del estrés en las personas que son nuestro objeto de estudio, los cuales inclusive por el mismo hecho del accidente de tránsito podrían dar una alta concentración de alfa-amilasa salival.

En la investigación científica denominada: Asociación de la alfa-amilasa salival con la ansiedad y el estrés en profesionales de enfermería, concluyen que “la actividad de la AAS se mostró significativamente mayor en los profesionales que presentaron estrés y ansiedad, en algunos horarios de observación y turnos de trabajo”.¹¹No es necesario que la persona se quede dormida para tener un accidente, ya que la falta de atención y las respuestas lentas de los conductores somnolientos son un factor contribuyente sustancial.

3.4 La Saliva

Según algunas definiciones la saliva es: “un fluido biológico segregado por glándulas salivares que se encuentran en la boca. El fluido salival está

constituido mayormente por agua y otras sustancias, entre los que destacan la mucina y la alfa-amilasa".¹²

También otras características de la saliva son que está constituida por las secreciones de las glándulas salivales mayores y menores, secreciones epiteliales y el líquido crevicular (fluido que procede del surco del mismo nombre que rodea a los dientes); es incolora, insípida y filante, con una densidad de 1002 a 1012 mg/L; y se dice que la secreción diaria normal de saliva oscila entre 800 y 1,500 mL, con un promedio de 1,000 mL; el pH de la saliva varía de 6 a 7, límites favorables para la acción digestiva de la alfa-amilasa.¹³

La saliva es un fluido importante por las funciones que desempeña: Sirve para lubricar los alimentos, facilitando su masticación y la formación del bolo alimenticio e inicia la digestión del almidón gracias a su contenido en α -amilasa. Ejerce además un efecto de arrastre y limpieza de los dientes y la mucosa bucal.¹⁴

3.4.1 Cantidad y Composición de la Saliva

Se ha identificado que la cantidad y composición de la saliva secretada va a depender de factores como: velocidad del flujo salival, ritmo circadiano, tipo y tamaño de la glándula salival, duración y tipo de estímulo, dieta, drogas, edad, sexo, estado fisiológico; es decir que, en cada persona la función y concentración de cada componente varía.^{14,15}

Según datos se dice que el 99% de la composición de la saliva es agua, y el resto lo constituyen proteínas y electrólitos. Las proteínas más importantes son α -amilasa o ptialina, mucina, sialoproteínas, lipasa, lisozima, albúmina, lactoferrina, fibronectina y gammaglobulinas. Además, a través de la saliva pueden excretarse moléculas orgánicas como la glucosa, urea, lípidos,

vitaminas (B6, B12), hormonas (estrógenos, cortisol) y factores de crecimiento (factor de crecimiento epidérmico [EGF, epidermalgrowth factor], factor de crecimiento endotelial vascular [VEGF, vascular endothelialgrowth factor]).¹³

3.4.2 Control nervioso de la secreción bucal

Se dice que la secreción bucal se ve afectado por el sistema nervioso, debido a que “Las glándulas salivales se ven afectadas por el sistema nervioso autónomo; en particular, la activación del simpático aumenta la secreción de alfa-amilasa y la del parasimpático incrementa el volumen de saliva secretada”.¹⁴

Se tiene en cuenta que “Las glándulas salivales están controladas sobre todo por señales nerviosas parasimpáticas procedentes de los núcleos salivales superior e inferior del tronco del encéfalo y los nervios simpáticos se originan en los ganglios cervicales superiores, desde donde viajan hasta las glándulas salivales acompañando a los vasos sanguíneos”.³

La estimulación simpática también puede incrementar la salivación en cantidad moderada; aunque su estimulación incrementa la salivación, es mucho menor que la parasimpática y a diferencia de esta, predomina durante el estrés y causa la sequedad bucal.^{14,15}

3.4.3 Alfa-amilasa

La alfa-amilasa es definida según el Diccionario de Términos Médicos de la Real Academia Nacional de Medicina de España (2012)¹⁶ como: Enzima del grupo de las hidrolasas que catalizan la hidrólisis de los enlaces α -glucosídicos (1-4) no terminales presentes en los polisacáridos, lo que produce la formación de maltosa, maltotriosa y dextrinas. Se encuentra mayoritariamente en las glándulas salivales y el páncreas, y en menor medida en el intestino delgado, el riñón, los ovarios, la próstata, los pulmones y las glándulas lagrimales y

sudoríparas. En individuos sanos, la actividad catalítica de la α -amilasa en el plasma corresponde en un 60 % a la isoenzima salival y en un 40 % a la isoenzima pancreática.¹⁴

3.4.4 Factores que afectan el flujo salival

Hay factores que afectan el flujo de saliva por ejemplo se encuentran los siguientes casos:

La hipersalivación se puede deber a diferentes alteraciones como las neurológicas, incluida la enfermedad de Parkinson, patología con reflujo gastro-esofágico, efecto secundario de diversos fármacos, sobre todo los que activan el sistema nervioso parasimpático (pilocarpina), miorelajantes, antiepilépticos, antipsicóticos (litio), hiperhidratación, envenenamiento con metales pesados.¹⁴

La hiposalivación se puede deber a patologías como el síndrome de Sjögren's, fármacos que interfieren con la acción de Acetilcolina como anticolinérgicos, antihistamínicos, quimioterápicos, terapia de irradiación de cabeza y cuello, etc.¹⁴

La alfa-amilasa salival humana como biomarcador se muestra en Tabla N.º 1, en la cual se recopiló información de estudios que han permitido comparar la concentración de la AASH (alfa-amilasa salival humana) por grupos de individuos que presentan una condición específica con respecto a un grupo control".¹⁷

Tabla N.º 2 Estudios que han permitido comparar la concentración de la AASH

CONDICION	EVIDENCIA CIENTIFICA
Sexo (hombre o mujer)	No hay evidencia científica que establezca diferencias en las concentraciones basales de la actividad de la AASH entre hombres y mujeres.
Edad	Las concentraciones basales de AASH son muy bajas hasta indetectables en niños recién nacidos y continuamente se va incrementando hasta que alcanza los valores de un adulto cuando el niño alcanza los tres años de vida.
Fumadores habituales	Los fumadores habituales mostraron más bajas cantidades basales de AASH, ya que el humo del cigarrillo inhibe la actividad de esta proteína. No se tuvo en cuenta la medición del estrés, que puede ser un factor influyente en el cambio de concentración.
Alcohólicos	La información existente no es concluyente, pero algunos estudios han encontrado que la concentración de la AASH es más alta en bebedores crónicos.
Consumidores agudos de cafeína	La información existente no es concluyente, pero algunos estudios han encontrado que el consumo agudo de cafeína estimula la actividad de la AASH.
Adultos con diabetes mellitus	Se ha encontrado que los adultos con diabetes mellitus presentan valores más altos de AASH.
Pacientes con dolor crónico	Se ha encontrado que la AASH aumenta con el aumento del dolor. Se podría establecer una escala de dolor con base en la medición de la AASH.
Adultos con caries	En un estudio se determinó que existen diferencias estadísticamente significativas en la concentración de AASH entre el grupo de caries inactiva y el grupo con actividad de caries de alta a moderada.

Fuente: Elaboración propia con base en la referencia.¹⁷

3.5 Fundamentos químicos referentes a la cuantificación de alfa-amilasa salival.

El almidón es un oligosacárido, que cumple una función muy importante dentro de las plantas como depósito de energía, mientras que en los seres humanos es una fuente de carbohidratos muy importante, por lo cual está presente en la dieta del mismo. El almidón es hidrolizado por el organismo para poder extraer la energía almacenada en forma de D-glucosa, para lo cual se cuenta con la acción de la alfa-amilasa salival y pancreática que realizan actividades en el proceso digestivo.¹⁸

El almidón, al reaccionar con el yodo en su estado natural, forma un complejo coloreado que es característico de la presencia del mismo; sin embargo, al verse este hidrolizado por la acción enzimática de la alfa-amilasa (lo cual tiene utilidad al momento de identificar la presencia del analito en estudio, más no, para su cuantificación), el complejo coloreado se desvanece gradualmente hasta completar la reacción, de la cual se obtiene como subproducto un azúcar reductor, la maltosa (esto servirá para la determinación cualitativa de la presencia de alfa-amilasa salival) entre otros.¹⁸ El mismo derivado es cuantificable a partir de la reacción óxido-reducción con el ácido 3,5 dinitrosalicílico por espectrofotometría a una longitud de onda de 450nm.¹⁹

La espectrofotometría UV visible es una técnica analítica que permite determinar la concentración de un compuesto en solución. Se basa en que las moléculas absorben las radiaciones electromagnéticas y a su vez que la cantidad de luz absorbida depende de forma lineal de la concentración (Ley de Lambert-Beer), esto en el rango de longitudes de onda comprendido entre 190 y 700 nm, es decir, desde el cercano UV (190 a 400 nm) hasta todo el espectro visible (400 a 700 nm) inclusive.^{20,21}

CAPITULO IV
DISEÑO METODOLOGICO

4.0 DISEÑO METODOLOGICO

4.1 Tipo de Estudio

Este proyecto de investigación fue de tipo bibliográfico y documental.

- Bibliográfico: debido a que la investigación se realizó con un enfoque teórico, fundamentándose en la investigación bibliográfica, haciendo uso de fuentes bibliográficas primarias y secundarias.
- Documental: ya que se obtuvieron y analizaron los datos provenientes de los documentos obtenidos de la investigación bibliográfica.

4.2 Investigación bibliográfica:

Esta se llevó a cabo utilizando material bibliográfico obtenido de:

- Biblioteca Central de la Universidad de El Salvador, campus central.
- Biblioteca "Dr. Benjamín Orozco" Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.
- Biblioteca digital de la Universidad de El Salvador y bases de datos pertenecientes al sistema bibliotecario universitario.
- Artículos y revistas científicas.
- Bases de datos encontradas en internet. (EBSCO, Google académico, SCIELO, E-Libro, REDALYC, etc.).

4.3 Procedimiento

La investigación que se desarrolló fue completamente de carácter bibliográfico y documental, esta se ejecutó mediante etapas con la finalidad de seleccionar el material bibliográfico de mayor utilidad para los fines de esta investigación.

Estas etapas fueron divididas de la siguiente manera:

4.3.1 Búsqueda del material bibliográfico para su selección.

Para la selección del material bibliográfico fueron de principal interés aquellos títulos que involucraban: Análisis químico de concentración de alfa-amilasa como prueba presuntiva de somnolencia al volante en accidentes de tránsito; para el caso de los recursos digitales se hizo uso de palabras clave para facilitar la delimitación de información, cabe destacar que las palabras claves fueron escritas en inglés y en español para ampliar la obtención de material.

4.3.2 Análisis y selección del material consultado.

Una vez recopilado todo el material bibliográfico como los libros, artículos, trabajos de grado, revistas científicas y monografías a utilizar, estos fueron agrupados mediante el uso del software gestor de referencias bibliográficas: “Zotero”, cuya función es indexar y administrar las fuentes bibliográficas. Esta herramienta se utilizó únicamente con aquellos recursos que se obtuvieron en formato digital.

En el caso del recurso bibliográfico consultado en físico se empleó una lectura rápida de los documentos, esto con el fin de identificar cuáles recursos podían aportar información relevante para la compilación, así delimitando el material consultado y posteriormente realizar una la lectura y el análisis crítico de la información obtenida.

4.3.3 Diseño de una Práctica de laboratorio

Una vez finalizada la lectura de cada uno de los recursos bibliográficos seleccionados, se recopiló la información más relevante para la fundamentación del tema, para diseñar una práctica de laboratorio que consiste en cuantificar indirectamente la alfa-amilasa salival humana por espectroscopia UV-Visible con base en lineamientos establecidos. (Ver Anexo 2).

CAPITULO V

PRACTICA DE LABORATORIO



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA



“CUANTIFICACIÓN INDIRECTA DE ALFA-AMILASA SALIVAL HUMANA
POR ESPECTROSCOPÍA UV-VISIBLE”.



5.1 Objetivos

- Cuantificar el contenido de alfa-amilasa salival humana, con respecto al estado de desvelo de una persona.
- Elaborar una curva de calibración que permita interpolar la concentración de alfa amilasa salival presente en las muestras.
- Realizar la cuantificación de concentración de alfa-amilasa salival humana por medio de espectroscopia UV-Vis.

5.2 Fundamento teórico

De los fluidos biológicos, la saliva es de los tres que más se encuentran en la escena del supuesto delito, después de la sangre y el semen, la saliva se encuentra en cantidades suficientes para una investigación en el esclarecimiento de índole legal.²²

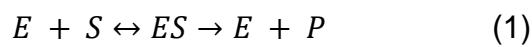
El flujo salival está sujeto a una serie de cambios, como son la ingesta de alimentos, el ritmo circadiano, la edad, el género y las enfermedades bucales.²³ Debido a esto, por medio de la cuantificación de alfa-amilasa salival humana se puede determinar en casos de accidentes de tráfico si un conductor conducía en estado de somnolencia.

Según generalidades encontradas sobre la saliva para uso forense, se encuentra que el rango de referencia de alfa-amilasa encontrado en saliva humana es de 0.2-6.4mg/mL y que el rango promedio de concentración de alfa-amilasa en saliva humana es (0.072-1.300) UI/ μ L o (72.01-1300.01)UI/mL.²²

La alfa-amilasa es una enzima de peso molecular de 45.000 kDa, responsable de catalizar la hidrólisis inicial de polímeros grandes de glucosa, tales como almidón o glucógeno, en fracciones más pequeñas;²⁴ rompiendo sus

enlaces y liberando glucosa y maltosa (disacárido formado por dos moléculas de glucosa).

Se llaman *enzimas* a las sustancias de naturaleza proteica que catalizan reacciones químicas, siempre que sea termodinámicamente posible.²⁵ En estas reacciones, las moléculas sobre las que actúa la enzima en el comienzo del proceso son llamadas sustratos, y estas los convierten en diferentes moléculas, los productos.



Las enzimas sin ser consumidas o transformadas en el proceso que participan, aumentan la velocidad de una reacción al disminuir la barrera de energía de activación de los reactivos y aumentando la velocidad a la cual se alcanza el equilibrio de reacción, pero no afectan la concentración final de los productos.²⁴

La actividad de la enzima puede ser afectada por factores experimentales tales como: la concentración de enzima y de sustrato, el pH de la solución de reacción y la temperatura.²⁴

El término “espectroscopia” proviene de la palabra “espectro” que originalmente se refería a los múltiples colores de luz que aparecían al analizar luz blanca a través de un prisma. Implica, por lo tanto, el uso de múltiples longitudes de onda de luz.²⁶

Los espectrofotómetros tienen la habilidad de medir absorbancia a valores específicos de longitud de onda. Un espectrofotómetro es un instrumento para medir la absorbancia de una solución. La absorbancia es una medida cuantitativa útil y está relacionada con la concentración a través de la ley de Beer-Lambert,²⁶ la cual establece lo siguiente:

$$A = \epsilon cl \quad (2)$$

Donde “A” es la absorbancia de la muestra a una longitud de onda dada, “ ϵ ” es el coeficiente de extinción del compuesto a esa longitud de onda (λ) y sus unidades son $(M \cdot cm)^{-1}$, “c” es la concentración molar de la especie que absorbe, y l es la longitud de paso de la celda que contiene la solución donde se realiza la medición y está dada en cm. Así, si el coeficiente de extinción es conocido, la absorbancia de la solución puede ser usada para calcular la concentración de la especie en solución (asumiendo que la única especie que absorbe es el compuesto de interés).

La concentración de la α -amilasa se puede determinar al comparar la diferencia de absorbancia entre el blanco de reactivos y la del sustrato que ha sido hidrolizado al reaccionar con una muestra que contiene la enzima, en un tiempo determinado y bajo condiciones estándar de reacción. Es por esto que sabiendo que “la unidad de alfa-amilasa libera 1.0 mg de maltosa del almidón en 3 minutos a pH 6.9 a 20°C”²⁷ se puede aplicar el principio para cuantificar azúcares reductoras como la maltosa, y así hacer una cuantificación indirecta de alfa-amilasa salival humana por espectroscopia UV-Visible.

Utilizando el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) para calcular la concentración de azúcares reductores, ya que el DNS puede ser reducido por la maltosa, produciendo un cambio de coloración del amarillo al café. El procedimiento se basa en una reacción redox que ocurre entre el DNS y los azúcares reductores presentes en la muestra.

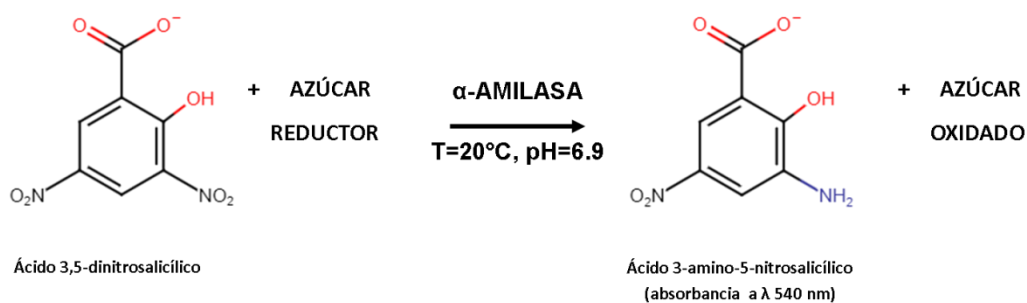


Figura N.º 1 Reacción de oxidación de azúcares reductores, método DNS
Fuente: elaboración propia

Luego se le puede medir la absorbancia con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 540nm y así saber la concentración de maltosa producida y hacer una interpolación de los resultados con base en la curva de calibración con maltosa monohidrato en solución para encontrar indirectamente la concentración de alfa-amilasa.

5.3 Materiales y reactivos

Material de Vidrio y General	Equipo
1 Mechero de Bunsen	Incubadora de agitación de sobremesa
1 Malla de asbesto	Espectrofotómetro UV/VIS ajustado a 450
1 Trípode	nm
2 Termómetros de 120°	Balanza analítica
1 Embudo	Reactivos
1 Agitador de vidrio	Tampón de fosfato de sodio pH 6,9
1 Vidrio de reloj	D-(+)-Maltosa Monohidrato (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ · H ₂ O) (maltosa de papa) 99%
1 Balón volumétrico de 10.0mL	Agua purificada
1 Balón volumétrico de 25.0mL	Cloruro de Sodio (NaCl)
1 Balón volumétrico de 100.0mL	Ácido 3,5-dinitrosalicílico 98.0%
1 Balón volumétrico de 750.0mL	Solución de almidón soluble al 1.0 % p/v
1 Pipeta graduada de 10.0mL	Solución de tartrato de Sodio 5.3M
10 Erlenmeyer 25.0mL	Solución de tartrato de potasio 5.3M
1 Erlenmeyer de 50.0mL	Solución NaOH 1M
1 Beaker de 25.0mL	Solución NaOH 2M
4 Beaker de 50.0mL	Hidróxido de Sodio (NaOH) 6.7 mM
1 Micropipeta	Solución de Cloruro de Sodio (NaCl)
1 Baño María	Solución estándar de Maltosa 0.2% p/v
1 Baño de hielo	Fosfato de sodio de 20 mM
1 Cubeta de espectrofotómetro para muestra	Muestra Saliva Humana (contenido de alfa-amilasa).

5.4 Conocimientos previos

- Método: detección espectrofotométrica.
- Conocimientos de la ley de Lambert Beer.
- Uso del espectrofotómetro UV-Vis.

5.5 Procedimiento experimental

Principio: Almidón + H₂O α-amilasa → Grupos reductores (Maltosa)

- Definición de unidad:

Una unidad de alfa-amilasa libera 1.0 mg de maltosa del almidón en 3 minutos a pH 6.9 a 20°C. ²⁷

- Condiciones:

T = 20°C, pH = 6.9, A 540nm, Paso de luz = 1 cm

5.5.1 Curva estándar para cuantificar la maltosa liberada

1. Pesar 0.0202 g de maltosa en balanza analítica y diluir a 10.0mL en balón volumétrico y mezclar por inversión.
2. Se establece una curva estándar diluyendo la solución de maltosa (0,2 % p/v) como se indica a continuación en agua purificada:

Tabla N.º 3 Dilución de las soluciones para la curva estándar.

DILUCIONES	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	Blanco
Solución de Maltosa 0.2% (mL)	0.05	0.20	0.40	0.60	0.80	1.00	2.00	---
Agua Purificada (mL)	1.95	1.80	1.60	1.40	1.20	1.00	—	2.00
Reactivo de color (mL)	1	1	1	1	1	1	1	1
Concentración de referencia	0.005%	0.020%	0.040%	0.060%	0.080%	0.100%	0.200%	0.000%

Fuente: elaboración propia

Después de la adición de reactivo de color, depositar los erlenmeyer de 25.0mL en el agitador de sobremesa por tres minutos.

Luego llevar los tubos al baño maría durante 15 minutos,

Enfriar en baño de hielo hasta alcanzar la temperatura ambiente y se adicionan 9.0mL de agua purificada.

Mezclar por inversión y pipetear 3.0mL de cada mezcla de disolución en una cubeta de espectrofotómetro y realizar la lectura de absorbancia a 540 nm, apunte el resultado de la medición en el cuadro de respuestas (tabla N° 3):

Tabla N.º 4 Datos de las absorbancias para la curva estándar.

Dilución	D1	D2	D3	D4	D5	D6	Blanco
Absorbancias							

Fuente: elaboración propia

5.5.2 Ensayo

Obtención de la enzima alfa-amilasa.

Para recolectar las muestras de saliva, los participantes deben ser orientados a depositar saliva en un tubo (previamente marcada la línea de aforo con instrumento volumétrico hasta 2.0mL), con la ayuda de un embudo, hasta alcanzar el marcador de 2.0mL.

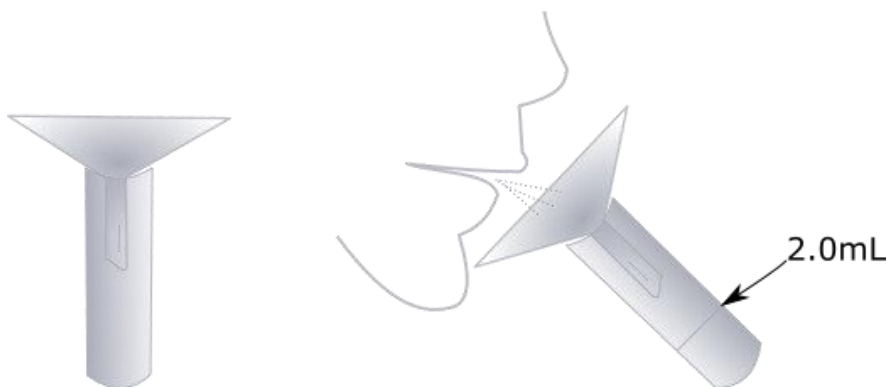


Figura N.º 2 Pasos para recolección de muestra de saliva.
Fuente: elaboración propia con base en la referencia.²⁷

Prepare una solución que contenga aproximadamente 1 unidad/mL de alfa-amilasa en agua purificada, teniendo en cuenta que la concentración de alfa-amilasa en saliva humana es 0.072-1.3UI/ μ L. (Ver Figura N.º 3)

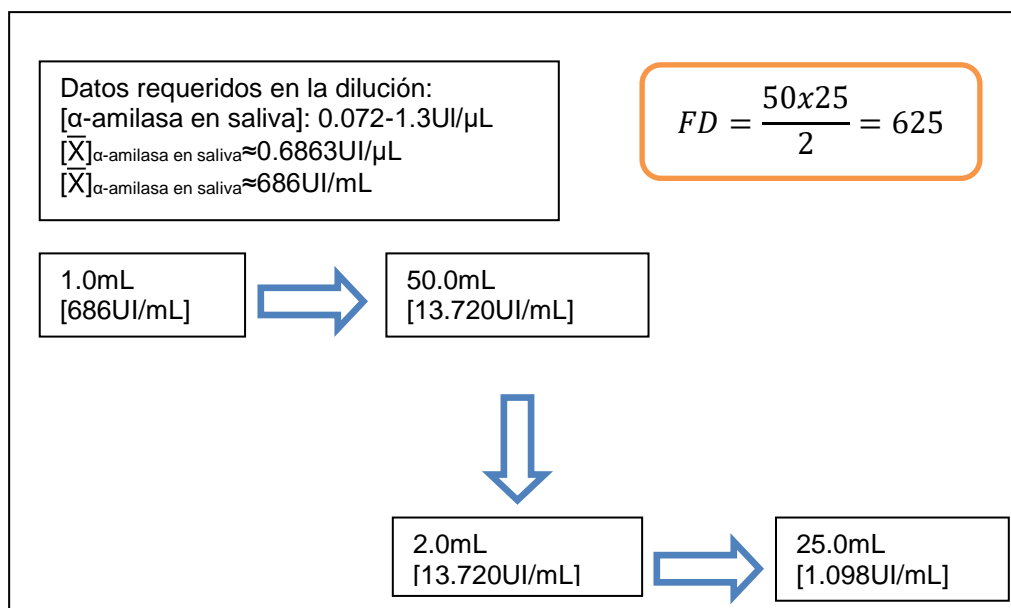


Figura N.º 3 Esquema de dilución de la muestra con base en la referencia.²⁷

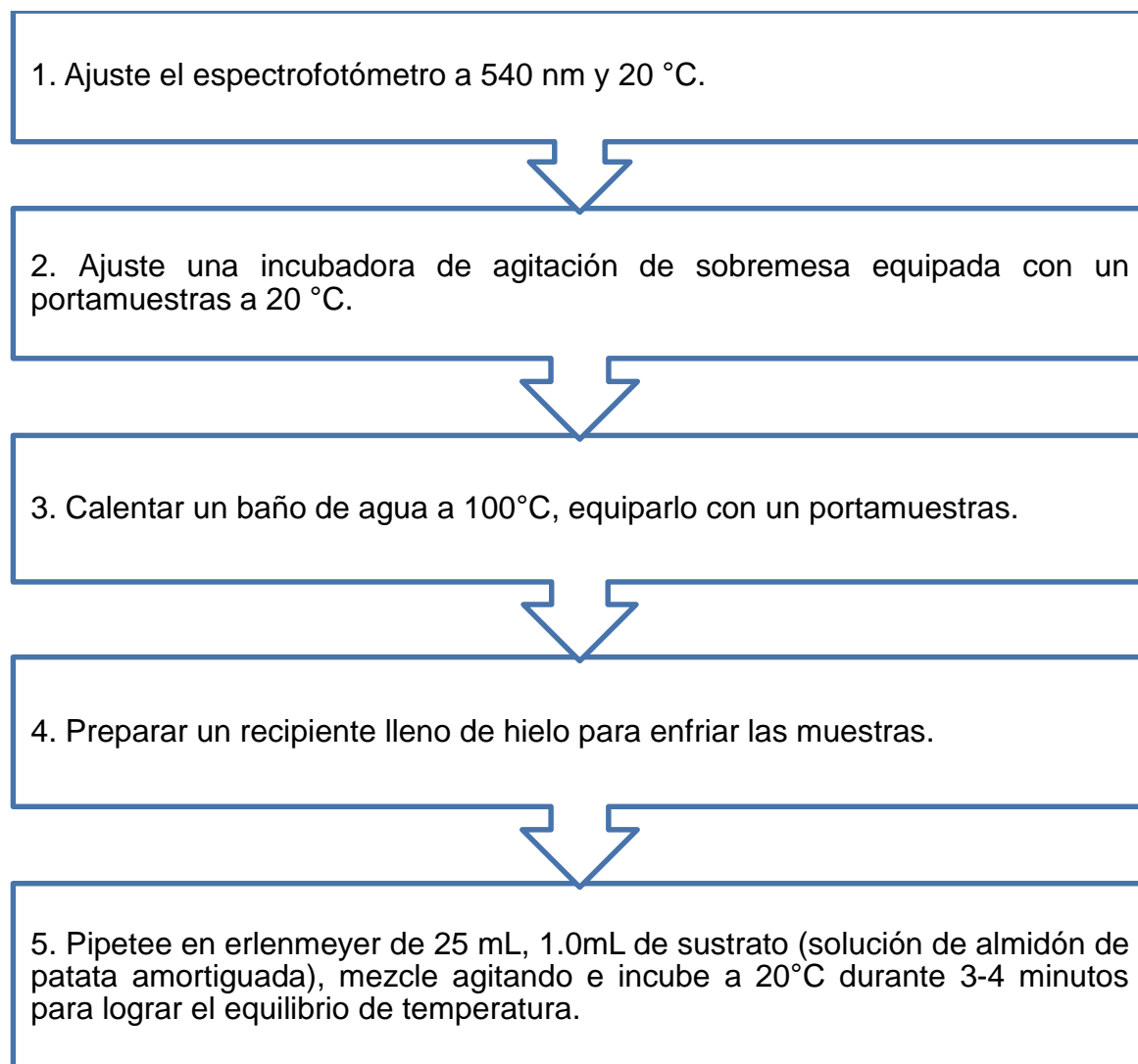
Documentar las horas de sueño de la persona que provee la muestra, en la tabla N.º 4 para obtener información que correlacione la concentración de alfa-amilasa y el sueño.

Tabla N.º 5 Datos de recolección de muestra de alfa-amilasa.

Muestra	Horas de sueño	Concentración UI/mL
1		
2		
3		

Fuente: elaboración propia

Antes de la Prueba:



***Nota:** El paso 5 debe realizarse con cada una de las muestras por triplicado.

Prueba:

1. Agregue 500-1000 μ L de solución enzimática a 1.0mL de almidón (ambos volúmenes medidos con micropipeta), mezcle agitando e incube a 20°C durante exactamente 3 minutos.

2. Después de 3 minutos, agregue 1.0mL de solución de reactivo de color, tape el recipiente, y detenga la reacción colocándolo en el baño de agua hirviendo.

3. Complete a 1.0mL el volumen de enzima agregado (por ejemplo, si se agregaron 700.0 μ L, agregue 300.0 μ L de solución de enzima).

4. Hervir durante exactamente 15 minutos y enfriar en hielo durante unos minutos.

5. Agregar 9.0ml de agua purificada. Mezclar por inversión.

6. Pipetear 3.0mL de la mezcla de reacción en una cubeta de espectrofotómetro y registre la absorbancia a 540 nm, anotar absorbancia en cuadro de respuestas (Tabla N° 4).

Nota: si el resultado fuere indetectable o inferior a la curva de calibración, se procederá con un incremento en la adición de la solución enzimática en el paso 1, si el resultado fuere mayor que el de la curva de calibración estándar se procederá con la disminución de la adición de solución enzimática en el paso 1.

Blanco:

1. Para ensayos en blanco, el protocolo es similar pero no se agrega ninguna enzima antes de la incubación de 3 minutos.
2. Es solo después de la adición del reactivo de color y luego de colocar el recipiente de reacción en el baño de ebullición, se agrega 1.0mL de solución enzimática.
3. Después del procedimiento de blanco, la absorbancia, se registra de manera similar.

NOTA: Para probar 3 muestras de solución enzimática, estas se pueden ejecutar sucesivamente.

Tabla N.º 6 Datos de las absorbancias para las muestras (por triplicado) y el blanco.

Muestra	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3	\bar{X} de Absorbancias
1				
2				
3				
Blanco				

Fuente: elaboración propia

5.6 Cálculos

1. Se debe calcular la linealidad utilizando la ecuación 3.

$$y = mx + b \quad (3)$$

Dónde:

a: pendiente de la regresión lineal establecida para 540nm de los Estándares vs cantidad de Maltosa [mg].

b: intercepto de la regresión lineal establecida para 540nm de los Estándares vs. cantidad de Maltosa [mg].

Y: representa el valor de la absorbancia corregido por el blanco y determinado espectrofotométricamente a la longitud de onda (λ) máxima de 540 nm.

X: Representa el valor de concentración de azúcares reductores expresado en g/100mL.

Calcular la concentración de la muestra de solución enzimática utilizando ecuación 4.

$$X = (Y - b) / m \quad (4)$$

Una unidad de alfa-amilasa (U) libera 1.0 mg de maltosa del almidón en 3 minutos a pH 6.9 a 20°C.

$$U = ((Y - b) / m) \cdot FD \cdot 100 \quad (5)$$

Nota: Reportar los resultados en “informe de Resultados (Ver anexo 8).

CAPITULO VI
CONCLUSIONES

5.0 CONCLUSIONES

1- Utilizando el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) es posible realizar una cuantificación indirecta de la concentración de alfa amilasa salival humana por el método espectroscopía UV Vis.

2- La propuesta de análisis químico para determinar la concentración de alfa-amilasa, como prueba presuntiva de somnolencia al volante en accidentes de tránsito, ofrece una potencial respuesta a la necesidad de nuevas alternativas de análisis químico dentro de las investigaciones forenses, en las cuales se encuentre como indicio a la saliva, tomando como biomarcador a la AAS humana.

3- Entre las ventajas de la técnica propuesta se mencionan que es de baja complejidad, tiene bajo costo de implementación, requiere de equipo poco sofisticado y no requiere de personal altamente especializado, por lo cual, es viable de realizar en el laboratorio de Química Forense y Toxicología de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.

CAPITULO VII
RECOMENDACIONES

6.0 RECOMENDACIONES

1- A las autoridades de la Facultad de Química y Farmacia contribuyan a implementar la “propuesta de análisis químico de concentración de alfa-amilasa, como prueba presuntiva de somnolencia al volante en accidentes de tránsito” en el laboratorio de Química Forense y Toxicología de la Universidad de El Salvador.

2- A la Universidad de El Salvador, investigar nuevas alternativas o métodos de análisis químico cuantitativo, que sean capaces de dar respuesta a la necesidad de demostrar el estado de somnolencia de una persona, que se haya encontrado involucrada en un accidente de tránsito.

3- A las autoridades competentes una actualización al Reglamento General de Tránsito Terrestre de El Salvador que contribuya a la disminución de los accidentes de tránsito, además de incluir la somnolencia al volante, en los registros estadísticos, tomando en cuenta que implica altas probabilidades de acontecimiento de los mismos.

7.0 BIBLIOGRAFIA

1. Scammell TE, Saper CB, Czeisler CA. Trastornos del sueño | Harrison. Principios de Medicina Interna, 20e [Internet]. 20.^a ed. McGraw Hill; 2018 [citado 12 de mayo de 2022]. 5471 p. Disponible en: <https://accessmedicina.mhmedical.com/minerva/remotexs.co/content.aspx?bookid=2461§ionid=199173340>
2. Robledo Acinas M del M, Baselga MJA. Manual de criminalística y ciencias forenses: técnicas forenses aplicadas a la investigación criminal (2a. ed.) [Internet]. Editorial Tébar Flores; 2017 [citado 15/05/22]. Disponible en: <https://elibro.net/minerva/remotexs.co/es/ereader/biblioues/52008?page=428>
3. Guyton A, Hall John E. Estados de actividad cerebral: sueño, ondas cerebrales, epilepsia, psicosis y demencia. En: Guyton y Hall Tratado de fisiología médica. 13.^a ed. España: McGraw Hill; 2016. p. 1870-91.
4. Real Academia Nacional de Medicina: Buscador [Internet]. [citado 16 de mayo de 2022]. Disponible en: <https://dtme.ranm.es/buscador.aspx>
5. Barrett KE, Barman SM, Brooks HL, Yuan JXJ. Actividad eléctrica del cerebro, estados de sueño-vigilia y ritmos circadianos. En: Ganong Fisiología médica, 26a [Internet]. New York, NY: McGraw-Hill Education; 2020 [citado 18 de mayo de 2022]. p. 752. Disponible en: accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?aid=1175060095
6. Nestler EJ, Hyman SE, Holtzman DM, Malenka RC. Sueño y vigilia. En: Neurofarmacología molecular Fundamentos de neurociencia clínica [Internet]. 3.^a ed. New York, NY: McGraw-Hill Education; 2017 [citado 22 de mayo de 2022]. Disponible en:

<https://accessmedicina.mhmedical.com.minerva.remotexs.co/content.aspx?sectionid=165242047&bookid=2187&Resultclick=2>

7. Rosales Mayor E, Rey De Castro Mujica J. Somnolencia: Qué es, qué la causa y cómo se mide. Acta Med Per [Internet]. abril de 2010 [citado 22 de mayo de 2022];27(2):137-43. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1728-59172010000200010&lng=es&nrm=iso&tlng=es
8. Estrés | Definición | Diccionario de la lengua española | RAE - ASALE [Internet]. Diccionario de la Lengua Española. [citado 22 de mayo de 2022]. Disponible en: <https://dle.rae.es/estr%C3%A9s>
9. Romero EE, Young J, Salado-Castillo R. Fisiología del estrés y su integración al sistema nervioso y endocrino. Rev Med Cient [Internet]. 6 de mayo de 2020 [citado 6 de mayo de 2022];32:61-70. Disponible en: <https://www.revistamedicocientifica.org/index.php/rmc/article/view/535>
10. Del Rio Portilla IY. ESTRÉS Y SUEÑO. Rev Mex Neuroci [Internet]. 2006 [citado 19 de mayo de 2022];7(1):15-20. Disponible en: <http://previous.revmexneurociencia.com/articulo/estres-sueno/>
11. Santos SVM dos, Silva LA da, Terra F de S, Souza AV de, Espindola FS, Marziale MHP, et al. Association of salivary alpha-amylase with anxiety and stress in nursing professionals. Rev Latino-Am Enfermagem [Internet]. 2021 [citado 8 de mayo de 2022];29(e3468):1-13. Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-11692021000100368&tlng=en
12. Esteban Santos S, Cornago Ramírez M del P. Química forense [Internet]. Madrid, España: UNED - Universidad Nacional de Educación a Distancia;

2016 [citado 12 de mayo de 2022]. 411 p. Disponible en:
<https://elibro.net.minerva.remotexs.co/es/ereader/biblioues/48853>

13. Fernández I, Hernández T, Fernández FG. Introducción al aparato digestivo: cavidad bucal. En: Fisiología humana. 5.^a ed. McGraw Hill; 2020.
14. Martínez PMS. la saliva como fluido diagnóstico. Ed Cont Lab Clín [Internet]. mayo de 2013 [citado 20 de mayo de 2022];16:93-108. Disponible en:
<https://www.seqc.es/download/tema/7/3324/346271904/840334/cms/tema-8-la-saliva-como-fluido-diagnostico.pdf/#:~:text=En%20el%20diagn%C3%B3stico%20utilizando%20la,potencial%20para%20revolucionar%20el%20futuro.>
15. Vidal RAT, Quispe LFM, Aduviri DMT, Cutipa LXH, Palacios PPB, Alanoca EER, et al. Saliva: control nervioso, composición y función. Rev méd basadrina [Internet]. 4 de marzo de 2021 [citado 21 de mayo de 2022];15(1):67-74. Disponible en:
<https://revistas.unjbg.edu.pe/index.php/rmb/article/view/1035>
16. Real Academia Nacional de Medicina: Buscador [Internet]. [citado 12 de mayo de 2022]. Disponible en:
https://dtme.ranm.es/buscador.aspx?NIVEL_BUS=3&LEMA_BUS=amilasa
17. Tovar CPL, González OLG, Gómez LMJ. La α -amilasa salival: relación con la caries dental y la salud en general. Univ Odontol [Internet]. 29 de octubre de 2013 [citado 21 de mayo de 2022];32(69):93-101. Disponible en:
<https://revistas.javeriana.edu.co/index.php/revUnivOdontologica/article/view/SICI%3A%202027-3444%28201307%2932%3A69%3C93%3AASCD%3E2.0.CO%3B2-X>



18. McKee T, mckee J. Capítulo 7: Carbohidratos. En: Bioquímica Las bases moleculares de la vida [Internet]. 7a ed. Ciudad de México: McGraw Hill; 2020 [citado 18 de mayo de 2022]. p. 952. Disponible en: <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=2971§ionid=250335489#251482770>
19. Maqueira YD, Bocourt EC, Gil DB. Determinación de azúcares reductores totales en jugos mezclados de caña de azúcar utilizando el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico. ICIDCA [Internet]. 2006 [citado 21 de mayo de 2022];40(2):45-50. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223120664006>
20. Bustamante Oyague B. Estudio comparativo de dos métodos físicos para evaluar la actividad enzimática de la Alfa Amilasa en la harina de trigo. Universidad Nacional del Callao [Internet]. 2013 [citado 21 de mayo de 2022]; Disponible en: <http://repositorio.unac.edu.pe/handle/20.500.12952/1813>
21. Camelino SO, Minchiotti M, Bariles R, Padilla RL, Colazo J. Optimización de un procedimiento para la determinación de oro mediante espectrofotometría UV/Vis. Matéria (Rio J) [Internet]. 19 de julio de 2018 [citado 20 de mayo de 2022];23. Disponible en: <http://www.scielo.br/j/rmat/a/tqtxfjrCfBWV4VwtMgPLHpr/?lang=es>
22. Mejía Jabier C. Pruebas Químicas de Saliva en la Detección de Amilasa Salival en la Investigación de un Delito [Internet] [Tesina]. [MEXICO,D.F.]: Universidad Autónoma de México; 2014 [citado 1 de agosto de 2022]. Disponible en: <http://132.248.9.195/ptd2014/febrero/0708829/0708829.pdf>
23. Daza ANZ, Huerta ERL, Martínez FF. Determinación de pH y proteínas totales en saliva en pacientes con y sin aparatología ortodóncica fija (estudio

- piloto). Revista Odontológica Mexicana [Internet]. 3 de septiembre de 2004 [citado 1 de agosto de 2022];8(3):6. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/odon/uo-2004/uo043b.pdf>
24. PROGRAMA DENUTRICIÓN Y DIETÉTICA GUIA PRÁCTICA N 27 [Internet]. DOCPLAYER. 2016 [citado 1 de agosto de 2022]. Disponible en: <https://docplayer.es/43203986-Sistema-integrado-de-gestion-enzimas-amilasa-salival-programa-denu-tricion-y-dietetica-guia-practica-n-27.html>
25. Enzima [Internet]. [citado 3 de agosto de 2022]. Disponible en: <https://www.quimica.es/enciclopedia/Enzima.html>
26. Chila Ordoñez LR, Flores Chaunay DM, Palacios Ayo JJ. Agua y soluciones [Internet]. 2022 [citado 5 de agosto de 2022]. Disponible en: <https://www.studocu.com/ec/document/universidad-de-guayaquil/bioquimica-i/informe-2-grupo-10/29694484>
27. The Royal Society of Chemistry. Electronic Supplementary Material (ESI) for Food & Function [Internet]. 2014 [citado 2 de mayo de 2022]. Disponible en: <https://www.rsc.org/suppdata/fo/c3/c3fo60702j/c3fo60702j1.pdf>
28. Castellanos Cuéllar IC. aplicaciones y generalidades de un espectrofotómetro uv vis uv 1800 [Internet]. EAN; [citado 6 de julio de 2022]. Disponible en: <https://editorial.universidadean.edu.co/media/acceso-abierto/aplicaciones-y-generalidades-de-un-espectrofotometro-uv-vis-uv-1800-ean.pdf>
29. Tecnal. incubadora con agitación orbital te-4200 [Internet]. 2022 [citado 6 de julio de 2022]. Disponible en: https://tecnal.com.br/es/produtos/detalhes/8068_incubadora_con_agitacion_orbital

8.0 ANEXOS

ANEXO N.º 1

DATOS ESTADISTICOS DE ACCIDENTES DE VEHICULO DE MOTOR O SIN MOTOR, TIPO DE VEHICULO NO ESPECIFICADO

 DIGESTYC Dirección General de Estadística y Censos						 GOBIERNO DE EL SALVADOR		MINISTERIO DE ECONOMÍA	
Departamento de Población y Estadísticas Vitales						SEXO			
PERIODO	CLASIFICACION INTERNACIONAL CIE-10	DESCRIPCION DE LA CAUSA	TOTAL	HOMBRES	MUJERES				
			2019	V89	Accidente de vehículo de motor o sin motor, tipo de vehículo no especificado.	1,043	833	210	
2018			819	661	158				
2017			829	684	145				
2016			832	683	149				
2015			926	741	185				
2014			1,016	808	208				
2013			951	771	180				
2012			913	732	181				
2011			1,067	839	228				
2010			1,106	863	243				

Fuente: Cuadros Estadísticos
Fecha:5/5/2022

ANEXO N.º 2

LINEAMIENTOS DE LA PRACTICA DE LABORATORIO

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA

CURSO DE ESPECIALIZACIÓN

“ANÁLISIS QUÍMICO APLICADO A LA INVESTIGACIÓN CRIMINAL”

ESTRUCTURA DE LA PRÁCTICA DE LABORATORIO

El presente documento establece el contenido a ser considerado para la estructuración de la propuesta de práctica de laboratorio, que presentarán los egresados al concluir el Curso de Especialización y contendrá los siguientes apartados:

Portada:

Nombre de la Facultad (Centrado)

Nombre de la Práctica (Centrado)

Imagen alusiva a la temática (Centrado)

Objetivos:

Establecer un mínimo de tres Objetivos, no es necesario diferenciar entre objetivo general y específicos.

Fundamento Teórico:

Deberá incluirse el fundamento químico, puede incluirse reacciones químicas que ayuden a la comprensión del tema.

Equipo, Materiales y Reactivos:

Debe desglosarse cada uno de estos requerimientos para el desarrollo de la práctica.

En cuanto del equipo deben ser incluidas las especificaciones.

Los materiales deben ser detallados, de igual manera se deberán incluir las especificaciones.

Los reactivos, deben detallarse los que se utilizarán en estado puro y los preparados, incluyendo información como concentraciones, en caso de ser necesario.

Conocimientos Previos:

Plasmar cualquier conocimiento previo que sea necesario para que el estudiante comprenda de manera íntegra la práctica que va a desarrollar y que no se contempla en el fundamento teórico.

Procedimiento:

Deberá ser presentado paso a paso de manera secuencial, podrá incluir un esquema que permita visualizar mejor el proceso.

Referencias Bibliográficas:

De acuerdo a Normas VANCOUVER

Anexos:

Principalmente los que complementen al apartado de Equipo, Materiales y Reactivos; para este último se deberá incluir la forma de preparación de aquellos que no se utilicen en forma pura.

La práctica diseñada, constituirá un capítulo del informe final, como producto de haber concluido el Curso de Especialización, como modalidad de trabajo de grado.

ANEXO N. °3

ESPECIFICACIONES DEL ESPECTROFOTOMETRO SHIMADZU UV-1800

Tabla 1. Especificaciones generales del instrumento.

Dimensiones	450 (ancho) x 490 (profundidad) x 270 (altura) mm
Peso	15 kg
Fuente de luz	Lámpara de tungsteno y lámpara de deuterio. Vida útil: 2000 horas
Intervalo espectral	190,0 - 1100,0 nm
Temperatura de operación	15°C - 35°C
Ancho de banda espectral	1nm (190 to 1100nm)
Indicación de la longitud de onda	En incrementos de 0.1-nm
Fijación de la longitud de onda	En incrementos de 0.1-nm (incrementos de 1-nm al establecer un intervalo de barrido)
Exactitud espectral (para validación del equipo, en correcto funcionamiento del sistema óptico)	$\pm 0.1\text{nm}$ @ 656.1nm D2 $\pm 0.3\text{nm}$ (190 to 1100nm)
Repetitividad espectral	$\pm 0.1\text{nm}$
La luz espuria o errática: es toda luz que llega al detector sin haber atravesado la muestra cuya absorbancia queremos medir.	Menos de 0.02 % usando NaI a 220nm, NaNO ₂ a 340nm menos de 1.0 % usando KCl a 198nm
Sistema fotométrico	Doble haz
Intervalo fotométrico de medida	Absorbancia: -4 a 4 Abs. Transmitancia: 0 % a 400 %
Exactitud fotométrica	± 0.002 Abs (0.5Abs) ± 0.004 Abs (1.0Abs) ± 0.006 Abs (2.0Abs)
Repetitividad fotométrica	Menos de ± 0.001 Abs (0.5 Abs), menos de ± 0.001 Abs (1 Abs), menos de ± 0.003 , Abs (2.0 Abs)
Estabilidad de la línea de base	Menos de 0.0003 Abs/hora a 700nm (después de una hora de encendida la fuente de luz)
Nivel de ruido	0.05 valor RMS a 700nm
Software	UV-PROBE

Fuente. Shimadzu, 2014.

Figura N.° 4 Especificaciones del espectrofotómetro Shimadzu UV-1800
Fuente: Internet.²⁸

ANEXO N. °4

ESPECIFICACIONES DE LA INCUBADORA CON AGITACION ORBITALTE-4200



Características Técnicas

Temperatura:	De ambiente +7°C a 55°C (temperaturas más altas: consultar)
Controlador:	Digital microprocesado via teclado de membrana para rotación, tiempo y calentamiento
Sensor:	PT-100
Precisión de control:	±0,3°C
Uniformidad:	±1,5°C
Agitación:	Orbital de 30 a 250 RPM
Motor:	Inducción 1/6 HP con inversor de frecuencia
Temporizador:	Programable hasta 99:59 horas. Apagado automático al término del tiempo programado
Circulación:	Con o sin renovación
Tapa:	En acrílico transparente
Gabinete:	En Vacuum Forming y base en acero carbono con tratamiento anticorrosivo y pintura electrostática
Dimensiones:	Ancho=530 x Profundidad=645 x Alto=540 mm
Peso:	37,5 KG
Potencia:	750 Watts
Voltaje:	220 V
Acompaña:	02 Fusibles extra
Plataforma (a elegir):	20 garras para Erlenmeyer de 125 ml; o 20 garras para Erlenmeyer de 250 ml; o 05 garras para Erlenmeyer de 500 ml; o 01 garras para Erlenmeyer de 1000 ml
Precisión de control:	+/-2 RPM
Modelo opcional:	TE-4200-127V para 127 Volts

Figura N.° 5 Especificaciones de la incubadora con agitación orbital
Fuente: Internet.²⁹

ANEXO N. °5

PREPARACION DE REACTIVOS

1 Tampón fosfato

Preparar 100 ml de un tampón de fosfato de sodio de 20 mM que contenga NaCl de 6.7 mM. Ajustese a pH 6.9 a 20°C con NaOH 1 M.

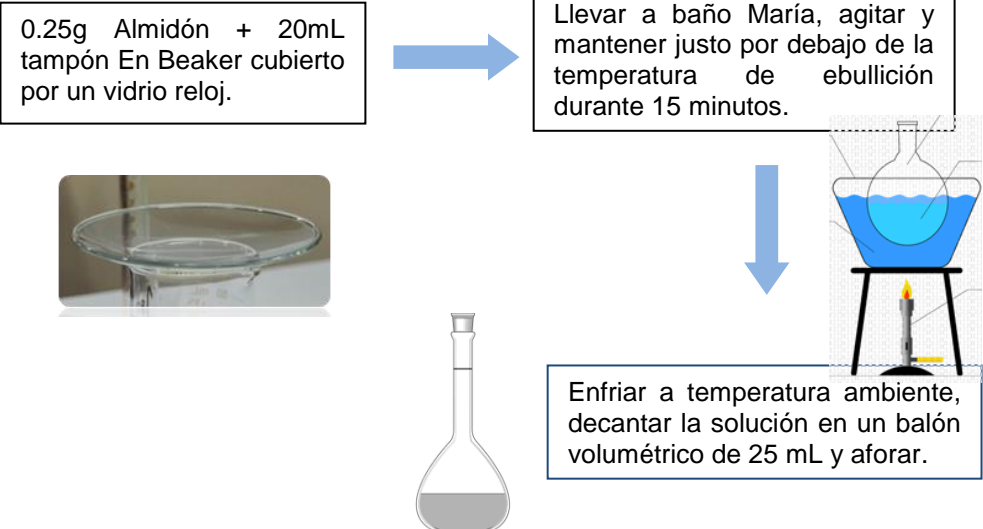
Para ello se pesará en balanza analítica 0.800g de Na_2HPO_4 , 1.9019g de NaH_2PO_4 y 0.0392g de NaCl, posteriormente depositar en balón volumétrico de 100 mL y aforar hasta la marca.

2 Sustrato: almidón de patata soluble al 1.0%

0.25g Almidón + 20mL tampón En Beaker cubierto por un vidrio reloj.

Llevar a baño María, agitar y mantener justo por debajo de la temperatura de ebullición durante 15 minutos.

Enfriar a temperatura ambiente, decantar la solución en un balón volumétrico de 25 mL y aforar.



The diagram illustrates the preparation of a 1.0% soluble potato starch substrate. It shows a beaker with a watch glass containing 0.25g of starch and 20mL of buffer. An arrow points to a flask being heated in a water bath. A second arrow points to a flask being cooled and decanted into a 25 mL volumetric flask.

Figura N.° 6 Preparación de reactivos.

Fuente: Elaboración propia con base en la referencia.²⁷

PREPARACION DE LA SOLUCION DE REACTIVO DE COLOR

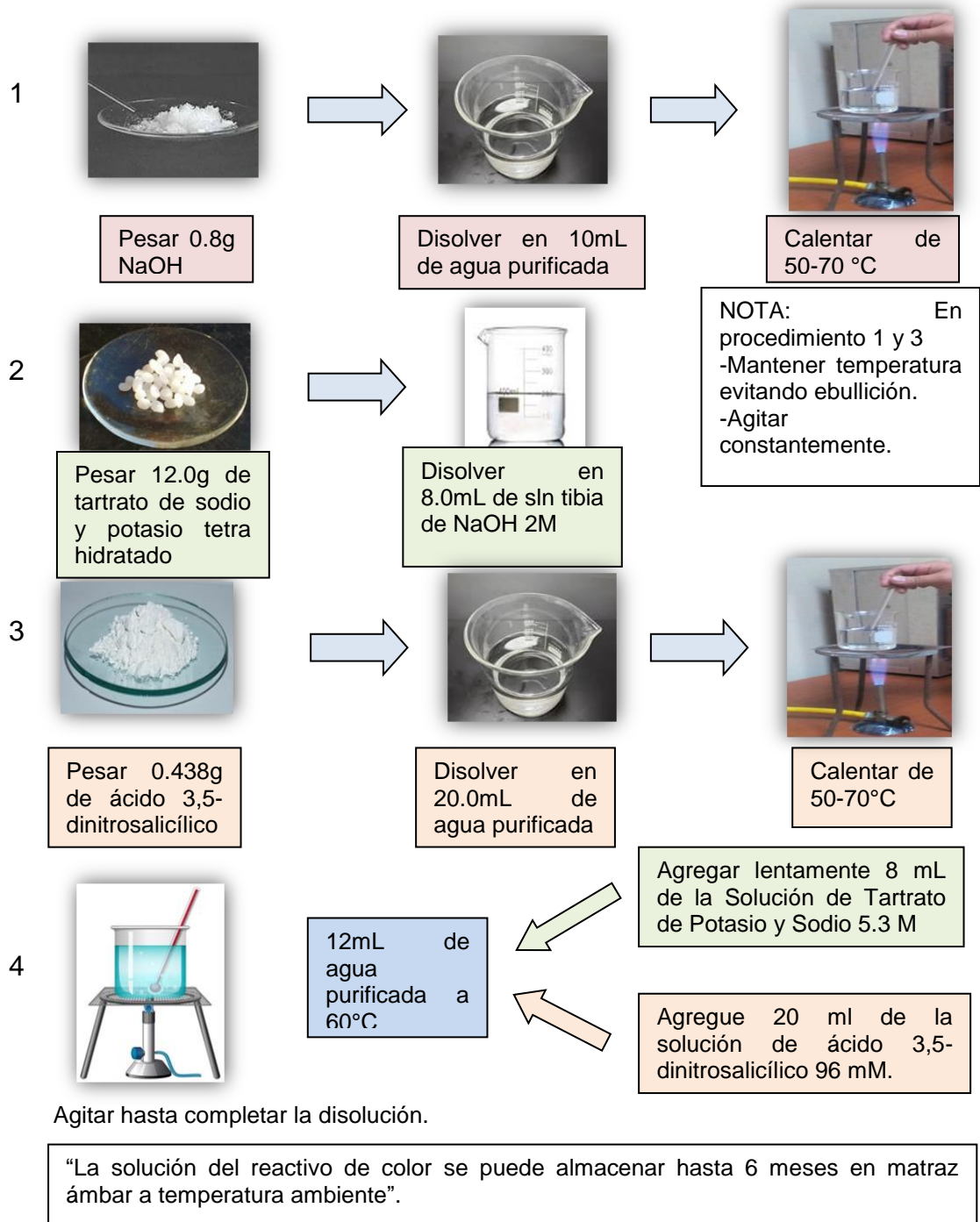


Figura N.º 7 Elaboración del reactivo de color.

Fuente: Elaboración propia con base en la referencia.²⁷

PREPARACION DE ESTANDAR DE MALTOSA AL 0.2 % P/V (GRADO REACTIVO)

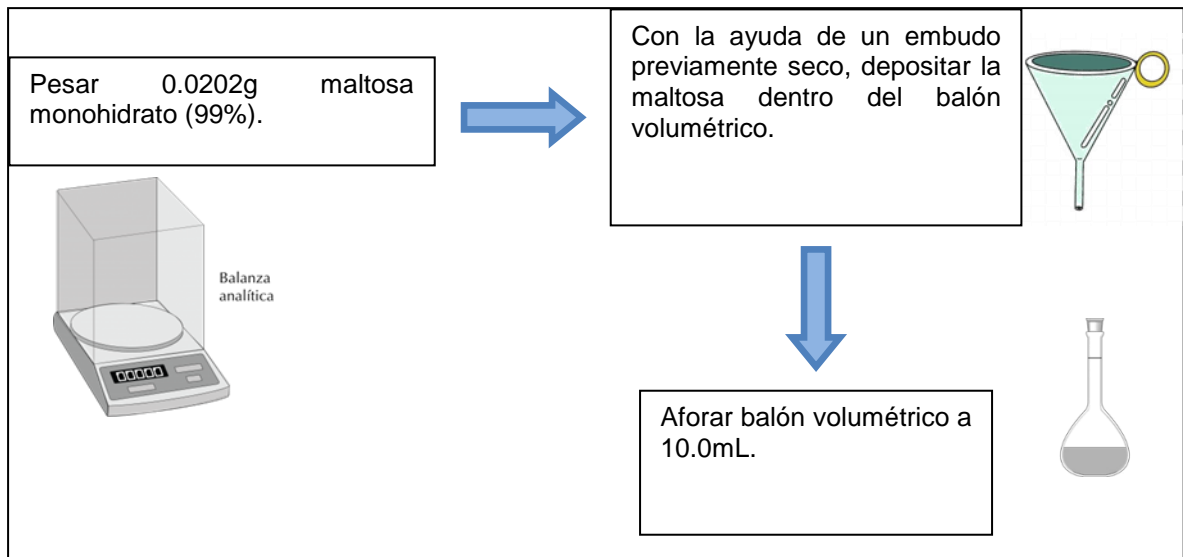


Figura N.º 8 Elaboración del Estándar de maltosa 0.2% p/v.
Fuente: Elaboración propia con base en la referencia.²⁷

ANEXO N. °6

INFORME DE RESULTADOS

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA

INFORME DE RESULTADOS DE LA PRÁCTICA



Analistas:	N° de grupo:
Docente responsable:	
Nombre de la practica:	Fecha de realización:
Resultados obtenidos:	
Cálculos:	
Observaciones:	
Conclusiones:	