

ENZIMOLOGÍA FORENSE: El uso de la amilasa

10 grupos de estudiantes
Ref.BIO4

1. OBJETIVO DEL EXPERIMENTO

El objetivo de este experimento es estudiar la capacidad de la enzima amilasa, que se encuentra en la saliva humana, para hidrolizar las moléculas de almidón. Los estudiantes realizarán dos pruebas simples, la prueba de yodo para el almidón y la prueba de ácido 3,5-Dinitrosalicílico para la detección de maltosa producida a partir del almidón por la amilasa.

Los estudiantes determinarán el nivel de amilasa salival para dos conductores implicados en un accidente de tráfico para descubrir quién fue el responsable del accidente.

2. COMPONENTES para 10 grupos de estudiantes

COMPONENTES	CONSERVACIÓN
Control Negativo Saliva A	+4°C
Control Positivo Saliva B	+4°C
Saliva Conductor 1 C	+4°C
Saliva Conductor 2 D	+4°C
Solución Almidón E	+4°C
Solución de Yodo F	+4°C
Reactivo Color Ácido G	+4°C
Reactivo Color Ácido H	+4°C
Microtubos con tapones	
Pipetas de transferencia	
Placas Microtiter	

2.1 Material requerido y no suministrado

- Agua destilada.
- Vasos.
- Marcadores permanentes de laboratorio.
- Tubos (12 x 75 mm) y racks.
- Guantes.
- Gafas de seguridad.
- Micropipetas 10-100 ul; 100-1000 ul y sus correspondientes puntas .

Este experimento no contiene componentes que hayan sido preparados a partir de fuentes humanas.

3. INTRODUCCIÓN

FUNDAMENTOS FORENSES

Los científicos forenses recolectan y analizan evidencias de la escena del crimen para identificar la naturaleza de la evidencia y su fuente. Mientras se lleva a cabo este proceso de recolección, el científico no puede hacer ninguna declaración definitiva sobre la naturaleza de la evidencia. Antes de llegar a ninguna conclusión, él o ella debe esperar hasta que pruebas exhaustivas hayan revelado la naturaleza de la evidencia, así como la información que se puede extraer de ella. No se puede suponer que una mancha roja en el piso o una mancha encontrada por otro método de detección sea en realidad sangre. Solo cuando haya determinado la naturaleza exacta de la evidencia, se pueden realizar pruebas adicionales para producir información adicional. La determinación de la naturaleza de la evidencia es un proceso complejo de varios pasos. Los científicos forenses usan varios ensayos para determinar de forma rápida y precisa la identidad de una sustancia que también debe cumplir los siguientes criterios: la prueba debe ser rápida, económica y, lo que es más importante, debe afectar mínimamente a la evidencia. Es importante que la prueba inicial se realice de forma rápida y económica para determinar la dirección de la investigación. Una prueba larga y costosa desperdiciará tiempo y dinero si la muestra que se prueba resulta ser algo diferente de lo que se cree. Por ejemplo, intentar generar un perfil de ADN a partir de una posible mancha de sangre le dará resultados concluyentes en cuanto a la naturaleza de la mancha pero habrá gastado varias horas y cientos de dólares haciéndolo.

Además de recolectar y examinar la evidencia, el Científico Forense es también una de las muchas personas responsables de mantener la integridad de la evidencia en sí misma. Se deben tomar medidas para garantizar que no se haga nada con respecto a la evidencia que pueda minimizar o disminuir su valor, por lo que es menos útil en una situación importante, como en un entorno de tribunal / juicio.

Cuando se recoge la evidencia, se coloca en una bolsa de recolección que luego se sella y se cierra con cinta adhesiva, con las iniciales del colector y la fecha de recolección escrita en la cinta. Esta es la primera línea de defensa contra cualquier alteración potencial de evidencia. La evidencia luego se lleva a una sala de pruebas segura donde se documentan los registros firmados de su llegada. El acceso a la sala está restringido solo a unas pocas personas que realizan un seguimiento de todos los elementos. Cualquier científico que desee realizar una prueba sobre la evidencia debe firmar, anotando también la fecha y la hora. Eventualmente, estos registros proporcionan una imagen detallada de cuándo se recopilaban las pruebas y cada vez que se movió o se accedió para realizar las pruebas.

Los científicos deben tener sumo cuidado para garantizar que la evidencia nunca se vea comprometida hasta el punto en que pueda ocurrir una contaminación. La contaminación es la transferencia de pequeñas cantidades de material de una pieza de evidencia a otra que puede alterar drásticamente el valor de la evidencia. Una vez completada la prueba, el científico los vuelve a registrar en la sala de pruebas. Este procedimiento se usa para documentar a todos aquellos que tuvieron acceso a la evidencia.

PRINCIPIOS DE CATÁLISIS DE ENZIMAS

Enzimas como catalizadores biológicos

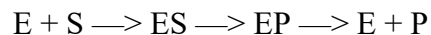
Se usa un catalizador biológico en pequeñas cantidades para acelerar la velocidad de una reacción bioquímica sin consumirse o transformarse durante la reacción. Las constantes de equilibrio de las reacciones no son alteradas por los catalizadores. Solo cambia la tasa de aproximación al equilibrio.

Las reacciones en las células son catalizadas por **catalizadores biológicos conocidos como enzimas** que pueden acelerar las reacciones entre 10^{14} y 10^{20} veces. Las enzimas funcionan mejor bajo condiciones fisiológicas a pH neutro y temperaturas de 37°C . Las enzimas son generalmente muy específicas para las reacciones que catalizan. Ciertas enzimas están reguladas por concentraciones intracelulares de metabolitos clave que no están directamente relacionados con la reacción que catalizan. Esta regulación (aumento o disminución de una actividad enzimática) a menudo está regulada por los requisitos fisiológicos de una célula en un momento dado. Las enzimas que se regulan de esta manera se denominan alostéricas.

Medición de la actividad enzimática

La molécula reactiva en una reacción catalizada por un enzima se llama sustrato. El sustrato (S) se transforma en producto (P). Antes de que la enzima pueda transformar el sustrato, primero debe unirse a él. Solo una porción relativamente pequeña de la molécula de la enzima está involucrada con la unión del sustrato y la catálisis. Esta región se llama el sitio activo. El sitio activo contiene los residuos de aminoácidos críticos y, si corresponde, los grupos prostéticos necesarios para la actividad.

La unión inicial no es covalente y puede llegar al equilibrio rápidamente. Después de lograda la unión productiva, el complejo enzima-sustrato comienza a generar el producto (P) que posteriormente se libera. La enzima libre (E) puede reaccionar con sustrato adicional (S) y esta reacción se repite de forma rápida y efectiva.



En este experimento, la amilasa es una enzima que cataliza la hidrólisis del polisacárido almidón en el disacárido maltosa. La amilasa salival es producida por las glándulas salivales. Si se añade amilasa a una solución de almidón, el almidón se digiere para formar maltosa.

La velocidad de la reacción aumenta si la mezcla de enzima y sustrato se lleva a la temperatura corporal (37°C) en comparación con la temperatura ambiente.

La aparición del producto (P) o la desaparición del sustrato (S) se puede medir como una función del tiempo durante una reacción. Se puede medir la cantidad de producto formado o la disminución del sustrato a intervalos regulares. Esta cantidad se puede representar como un gráfico.

EXPOSICIÓN DE LOS HECHOS

Se produce una colisión frontal entre 2 coches, cada uno de los conductores afirmó que el otro se había quedado dormido al volante en el accidente que sucedió por la mañana. Los dos pasajeros (uno en cada auto) resultaron gravemente heridos, pero los conductores sufrieron daños leves. Cuando el oficial de policía llegó al lugar del accidente, registró la información requerida y dispuso que todos fueran llevados en ambulancia al hospital local. El médico de la sala de emergencias (ER) hizo un examen exhaustivo de los dos conductores, tomó muestras de sangre y orina para analizarlas, también tomó su temperatura con un depresor de lengua de plástico desechable para examinar daños en la boca y los dientes. Colocó el primer depresor de lengua usado en el embalaje de plástico original y lo descartó en el contenedor de residuos. Hizo lo mismo con el segundo depresor de lengua (usado en el segundo conductor) pero olvidó descartarlo y lo dejó en la mesa de exploración. Cuatro horas después de llegar al hospital, los dos pasajeros gravemente heridos en la unidad de cuidados intensivos (UCI) del hospital fueron declarados muertos lo que hizo que el caso fuera un posible homicidio.

El médico que atendía la sala de emergencias recordó sus días de facultad de medicina que el nivel de saliva amilasa aumenta debido a la falta de sueño. Luego recuperó los dos depresores de lengua, los etiquetó con los nombres de los conductores, John Smith y Sam White, se puso en contacto con las autoridades y proporcionó al laboratorio forense los depresores de lengua para evaluar los niveles de amilasa en la saliva de ambos conductores.

Los humanos producen de 1 a 1.5 litros de saliva por día. La saliva tiene un pH ligeramente alcalino y está compuesta de agua, moco, proteínas, sales y enzimas. La saliva se usa para lubricar alimentos, para ayudar a tragar e iniciar la digestión de alimentos a través de la enzima amilasa, que inicia la digestión del almidón. Las amilasas son ubicuas y se encuentran tanto en plantas como en animales. La enzima es abundante en la saliva humana en cantidades fácilmente detectables. Las amilasas se subdividen en 2 subtipos: alfa y beta. El subtipo alfa se encuentra en los animales y el subtipo beta en las plantas. **La función catalítica de la alfa amilasa presente en la saliva humana es la digestión del almidón que se obtiene de una variedad de alimentos.**

La amilasa actúa dentro de las cadenas de almidón para producir pequeños disacáridos conocidos como maltosa. Este disacárido se compone de dos unidades de glucosa que pueden hidrolizarse aún más para producir glucosa que puede servir como fuente de energía. La alfa-amilasa está presente en muchos tejidos y secreciones humanas y puede ser una herramienta útil para la medicina forense. Se estima que está presente en la saliva en concentraciones que son 50 veces más altas que otras secreciones humanas. En los humanos hay dos genes que codifican la amilasa. AMY1 y AMY2 que se encuentran en el cromosoma 1. El AMY 1 para la amilasa presente en la saliva, la leche materna y sudor, y el AMY 2 para la amilasa que se encuentra en el páncreas y otras secreciones humanas.

En este experimento de simulación, los estudiantes determinarán el nivel de amilasa salival para los dos conductores que se recuperaron de los depresores para determinar quién fue el responsable del accidente debido a quedarse dormido al volante. La reacción se puede visualizar probando (1) la desaparición del sustrato (almidón) o (2) aparición del producto (maltosa). La prueba del yodo se utilizará para el almidón y la prueba de ácido dinitrosalicílico para la maltosa.

En la primera parte de este experimento, cuando se agrega una gota de yodo a una solución de almidón, dará un color marrón oscuro o azul característico, dependiendo de la concentración de almidón. Si la amilasa está presente, entonces digiere el almidón, se destruye la estructura compleja del almidón y la intensidad del color marrón oscuro (o azul) se desvanece. Al reducir los tonos del color azul, la prueba del yodo para el almidón puede correlacionarse con la cantidad de amilasa que está presente en la muestra de saliva. Para este experimento se usará un sustituto seguro (providina-yodo) para proporcionar el color azul para la prueba de almidón. **La hidrólisis completa del almidón está indicada por un color amarillento cuando se combina con yodo.**

En la segunda parte de este experimento, se usa ácido 3,5-dinitrosalicílico (color amarillo) que es una molécula que reacciona con el almidón. En este módulo, la presencia de maltosa, un azúcar reductor, se detecta al realizar una reacción de oxidación - reducción. Debido a la presencia de un grupo carbonilo ($C = O$), la maltosa participa en una oxidación - reducción con ácido dinitrosalicílico. **Esta reacción causa un cambio en el color de amarillo a naranja o rojo, dependiendo de la concentración de maltosa producida.**

4. DESCRIPCIÓN DEL EXPERIMENTO

El objetivo de este experimento es estudiar la capacidad de la enzima amilasa, que se encuentra en la saliva humana, para hidrolizar las moléculas de almidón. Los estudiantes realizarán dos pruebas simples, la prueba de yodo para el almidón y la prueba de ácido 3,5-Dinitrosalicílico para la detección de maltosa producida a partir del almidón por la amilasa.

Los estudiantes determinarán el nivel de amilasa salival para dos conductores implicados en un accidente de tráfico para descubrir quién fue el responsable del accidente.

4.1 Precauciones

1. Llevar gafas y guantes de laboratorio mientras se trabaja.
2. **NO PIPETEAR CON LA BOCA**, utilizar los dispositivos adecuados.
3. Extremar las precauciones cuando se trabajan con equipos que utilizan conjuntamente calor y mezcla de reactivos.
4. Lavarse las manos con jabón y agua después de haber trabajado en el laboratorio o utilizado reactivos o materiales biológicos.



No se usan materiales humanos en este experimento

4.2 Preparaciones Previas

Las preparaciones previas puede realizarlas el profesor o los estudiantes. Se recomienda el uso de micropipetas , sino se disponen 160 μl vienen a ser más o menos 10 gotas con la pipeta de transferencia suministrada y 50 μl aprox.4 gotas

1. Marcar o etiquetar 10 microtubos "A".
2. Marcar o etiquetar 10 microtubos "B".
3. Marcar o etiquetar 10 microtubos "C".
4. Marcar o etiquetar 10 microtubos "D".
5. Marcar o etiquetar 10 microtubos "E".
6. Marcar o etiquetar 10 microtubos "F".
7. Marcar o etiquetar 10 microtubos "Ácido".
8. Alicuotar **160 μl Control negativo saliva (A)** en cada microtubo A.
9. Alicuotar **160 μl Control positivo saliva (B)** en cada microtubo B.
10. Alicuotar **160 μl Control saliva conductor 1 (C)** en cada microtubo C.
11. Alicuotar **160 μl Control saliva conductor 2 (D)** en cada microtubo D.
12. Alicuotar **700 μl Solución de almidón (E)** en cada microtubo E.
13. Alicuotar **50 μl Solución de Yodo (F)** en cada microtubo F.
- 14. El componente G puede formar un precipitado cuanso se almacena a +4°C. Colocar el bote en un baño de agua con calor durante algunos minutos hasta que desaparezca el precipitado.**
15. Añadir todo el Reactivo Color Ácido G al tubo que contiene el Reactivo Color Ácido H. Mezclar bien. Marcar o etiquetar la solución como "Ácido". Alicuotar **850 μl** de esta solución en cada microtubo "Ácido"
16. Cada grupo necesitará el siguiente material:
 - a) Un microtubo de cada , A,B, C, D, E, F y "Ácido".
 - b) Una placa con 4 pocillos.
 - ⌘ 10 microtest tubes "D".
 - ⌘ 10 microtest tubes "E".
 - c) 4 tubos de vidrio
 - d) 8 pipetas de plástico.

5. PRÁCTICA

Marcar 4 pipetas de transferencia de la siguiente forma:

(-) Negativo

(+) Positivo

D1 Saliva Conductor 1

D2 Saliva Conductor 2

Nota: Todas las reacciones deben realizarse a temperatura ambiente. Los componentes almacenados en la nevera deberían ser atemperados a temperatura ambiente antes de realizar el experimento.

5.1 Módulo 1: Estudio de la desaparición del sustrato (almidón).

1. Colocar una pieza de la placa suministrada como se indica a continuación. Marcar los 4 pocillos como se muestra en la figura y con el nombre o número del grupo de trabajo.

(-) Negativo

(+) Positivo

D1 Saliva Conductor 1

D2 Saliva Conductor 2

The objective of this experiment is to study the ability of human saliva, to hydrolyze starch molecules. Students will use the Iodine test for the absence of starch and the 3,5-Dinitrobenzidine test for the presence of maltose produced from starch by amylase.

LABORATORY SAFETY

Evitar las contaminaciones cruzadas utilizando una punta nueva si se usa una micropipeta automática para cada muestra de saliva.

2. Usando una pipeta desechable diferente o una punta de pipeta para cada muestra, **agregue 4 gotas o 50 µl de cada muestra de saliva** en el pocillo debidamente etiquetado. Por ejemplo, la muestra Saliva Control negativo en el pocillo marcado como (-).

Repetir el mismo proceso para el Saliva Control positivo (+), Saliva Conductor 1 (D1) y Saliva Conductor 2 (D2).

3. Use una nueva pipeta para agregar **4 gotas o 50 µl de Solución de Almidón** (Componente E) en cada uno de los pocillos.

4. Use una nueva pipeta para agregar **1 gota o 10 µl de Solución de Yodo** (Componente F) en cada uno de los pocillos.

5. Registrar los cambios que se producen en cada pocillo.

5.2 Módulo 2: Estudio de la aparición del producto (maltosa).

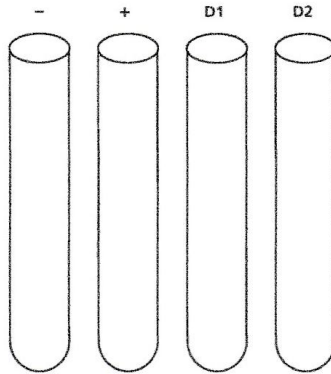
1. Marcar 4 tubos test vacíos como sigue:

(-) Negativo

(+) Positivo

D1 Saliva Conductor 1

D2 Saliva Conductor 2



Evitar las contaminaciones cruzadas utilizando una punta nueva si se usa una micropipeta automática para cada muestra de saliva.

2. Usando una pipeta de transferencia diferente o una punta de pipeta para cada muestra, **agregue 6 gotas o 100 µl de cada muestra de saliva** en el pocillo apropiadamente etiquetado. Por ejemplo, la muestra de Saliva Control negativo en el pocillo marcado como (-).

Repetir el mismo proceso para el Saliva Control positivo (+), Saliva Conductor 1 (D1) y Saliva Conductor 2 (D2).

3. Use una nueva pipeta de transferencia o punta de pipeta para agregar **6 gotas o 100 µl de Solución de Almidón** a cada uno de los tubos de prueba. Mezclar bien el tubo o pipeteando arriba y abajo (Si se dispone de vortex utilizarlo para agitar) .Incubar los tubos a temperatura ambiente durante 5 minutos.

4. Añadir **200 µl Reactivo Color Ácido G** a cada tubo. Mezclar bien el tubo o pipeteando arriba y abajo. Incubar los tubos en agua hirviendo en un baño o vaso durante 1 minuto. **TENER PRECAUCIÓN.**

5. Sacar los tubos del baño de agua y permitir que se enfríen a temperatura ambiente.

6. Añadir **2 ml de agua destilada** a cada tubo. Mezclar bien el tubo o pipeteando arriba y abajo.

7. Registrar los cambios que se producen en cada pocillo.

6. RESULTADOS

REGISTRE SUS RESULTADOS EN DIAGRAMAS COMO LOS QUE SE PRESENTAN ABAJO.

ent

Experimental Results

LABORATORY NOTEBOOK RECORDINGS:

Record the following in your laboratory notebook.

Before starting the experiment:

- Write a hypothesis that reflects the experiment
- Predict experimental outcomes

During the Experiment:

- Record (draw) your observations, or photograph the results.

Módulo 1: Estudio de las desaparición del sustrato (almidón)

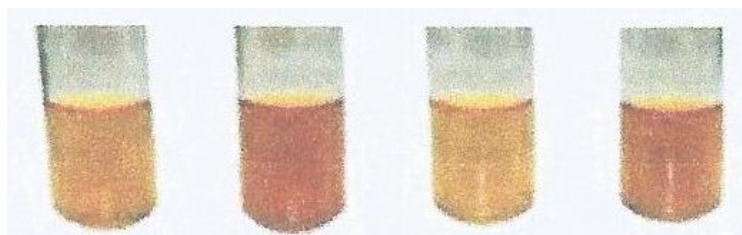
Según su observación, ¿qué color muestra cada pozo? ¿Y cuál de los dos conductores concluirías que se habría quedado dormido? Explique.



El nivel de amilasa salival aumenta en humanos debido a la falta de sueño. Normalmente, una solución de almidón adquiere un color marrón oscuro (o azul) cuando se agrega yodo. Un color marrón oscuro indica la presencia de almidón al final de la reacción (Caso del conductor 1). Por otro lado, si la amilasa actúa sobre el almidón, la estructura compleja del almidón se destruye y la intensidad del marrón oscuro (o azul) se desvanece. La hidrólisis completa del almidón está indicada por un color amarillento cuando se combina con yodo (Caso del conductor 2).

Módulo 2: Estudio de la aparición del producto (maltosa)

Según su observación, ¿qué color muestra cada pozo? ¿Y cuál de los dos conductores concluirías que se habría quedado dormido? Explique.



En este módulo, se usa ácido 3,5-dinitrosalicílico (color amarillo) como reactivo de color en las reacciones de la amilasa, que es una enzima que puede descomponer el almidón. La presencia de maltosa, un azúcar reductor, se detecta al realizar una reacción de oxidación. Esta reacción causa un cambio en el color de amarillo a naranja o rojo, dependiendo de la concentración de maltosa producida.

Los resultados de laboratorio mostraron que la muestra de saliva del Conductor 2 produce más Maltosa que el Conductor 1, lo que indica que hay más amilasa en la saliva del Conductor 2 que en la muestra del Conductor 1. Esto nuevamente sugiere que el Conductor 2 está privado de sueño, y por lo tanto, puede ser responsable del accidente.

Study Questions

Answer the following study questions in your laboratory notebook or on a separate worksheet.

1. What is maltose and how is it obtained from starch?^[1]_[SEP]2. Why did the doctor send the tongue depressor to the forensics laboratory? 3. What are the functions of saliva in human digestion?^[1]_[SEP]4. How is glucose obtained from starch as a source of energy?