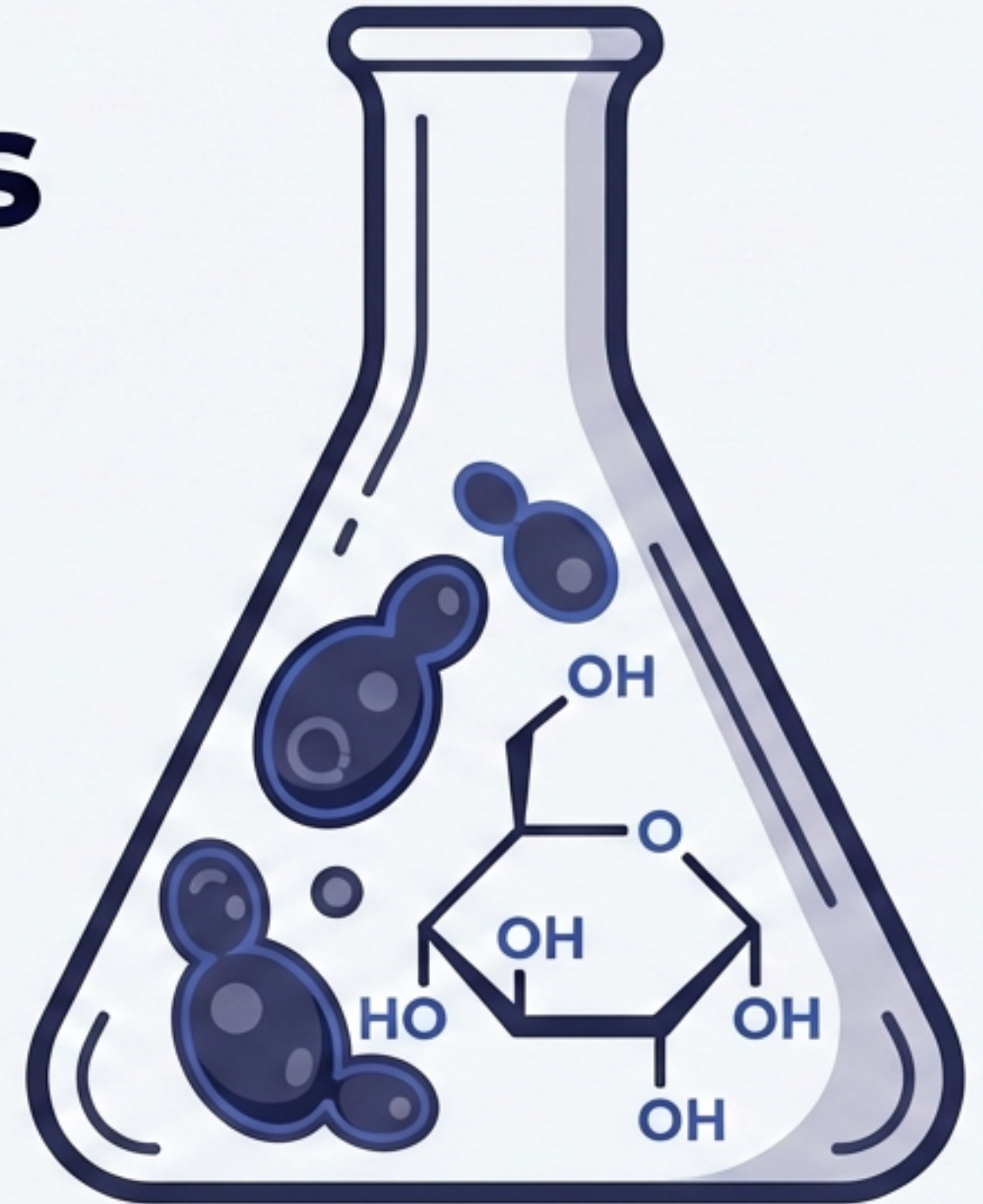


# Práctica 8: Glucólisis y Fermentación Alcohólica

Guía visual optimizada y estructurada para laboratorio (Versión Experta)

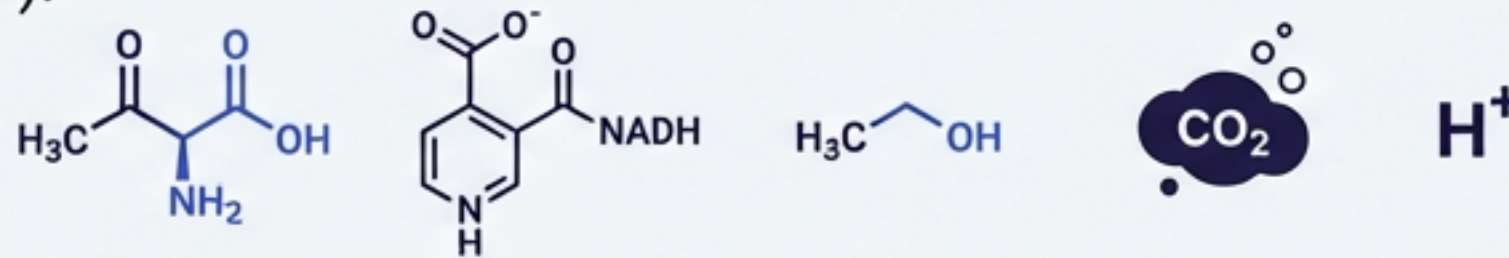


Bioquímica Metabólica | Análisis del rastro bioquímico celular  
MC Carlos Montejo Dávila

# Objetivos Experimentales



**Demostrar el flujo metabólico:** Rastrear la actividad de la vía Embden-Meyerhof-Parnas mediante la detección química específica de sus intermediarios (piruvato, NADH, etanol,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}^+$ ).



**Comparar eficiencia catalítica:** Evaluar la tasa de utilización de tres sustratos de carbono distintos por *Saccharomyces cerevisiae*.

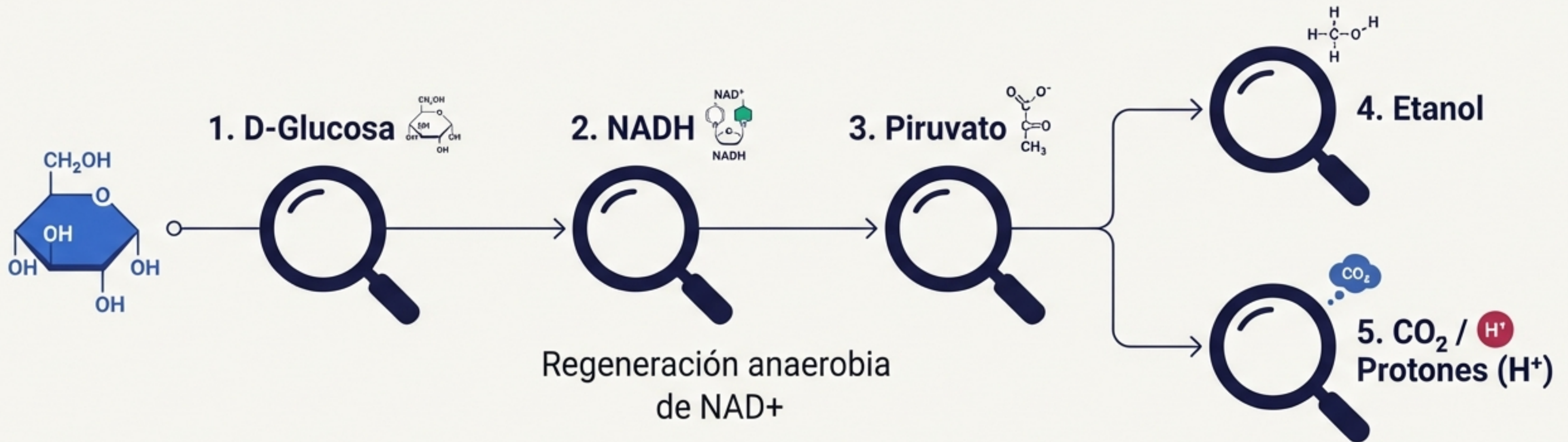


**Identificar controles biológicos:** Comprender la especificidad enzimática celular al contrastar un monosacárido, un disacárido hidrolizable y un disacárido no hidrolizable.



# El Mapa Metabólico: Siguiendo el rastro del sustrato

La glucólisis transforma la **D-Glucosa** (no L-Glucosa) en Piruvato. En anaerobiosis, la levadura recurre a la fermentación, regenerando el **NAD<sup>+</sup>** libre y produciendo **Etanol** y **CO<sub>2</sub>**. Cada prueba de esta práctica es una trampa química diseñada para capturar una de estas "huellas" metabólicas.



# Protocolo Estricto de Seguridad (Risk Management)

## Peligros Químicos Identificados:



### Reactivo de Brady (2,4-DNFH):

Contiene  $H_2SO_4$  altamente concentrado y corrosivo. Evitar contacto con piel y ojos; puede causar quemaduras graves.



### Dicromato de Potasio ( $K_2Cr_2O_7$ ):

Altamente oxidante, tóxico ambiental y cancerígeno (Cr VI). Manejar bajo campana de extracción y evitar inhalación.

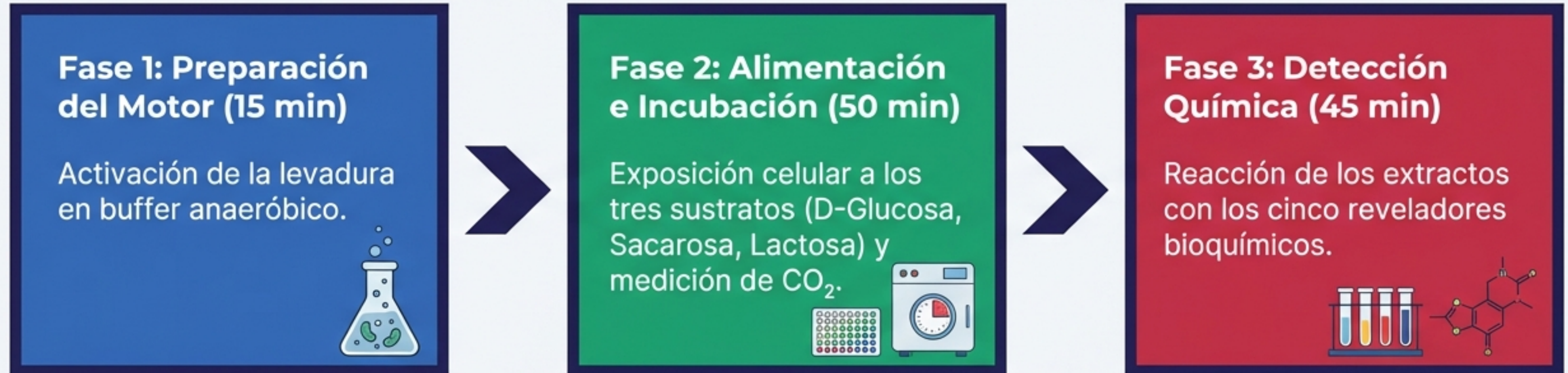
## Reglas Inquebrantables:

1. Uso **OBLIGATORIO** de **gafas de seguridad** y **guantes de nitrilo** en todo momento. No hay excepciones.
2. **Prohibido pipetear con la boca** (uso exclusivo de propipetas/micropipetas).
3. **NADA va a la tarja**. Uso estricto de contenedores de residuos etiquetados para metales pesados y ácidos.



**Prohibido arrojar a la tarja**

# Flujo de Trabajo Experimental



# Fase 1: Preparación del Sistema Biológico



Paso 1: Hervir 100 mL de agua desgasificada y agregar 0.5 g de fosfato de potasio dibásico (pH final 7-8).



Paso 2: Pesar 10 g de levadura seca (*Saccharomyces cerevisiae*).



Paso 3: Mezclar y atemperar a 30 °C.

## Insight Experto:

¿Por qué desgasificar el agua hirviéndola? La eliminación del oxígeno disuelto induce un estado de anaerobiosis forzada, apagando el ciclo de Krebs y forzando a la levadura a realizar fermentación alcohólica observable.

# La Matriz Maestra de Incubación

Organiza tus 15 tubos exactamente como en esta matriz. Etiqueta cada tubo claramente con su número correspondiente. Añade la levadura y el sustrato indicado en cada fila. **Nota:** La lactosa actuará como nuestro control biológico negativo.

	Prueba A (Piruvato)	Prueba B (Oxidación)	Prueba C (NADH)	Prueba D (Alcohol)	Prueba E (pH)
D-Glucosa	1	2	3	4	5
Sacarosa	6	7	8	9	10
Lactosa	11	12	13	14	15

# Fase 2: Incubación y Medición de CO<sub>2</sub> (Prueba 0)

## Procedimiento:

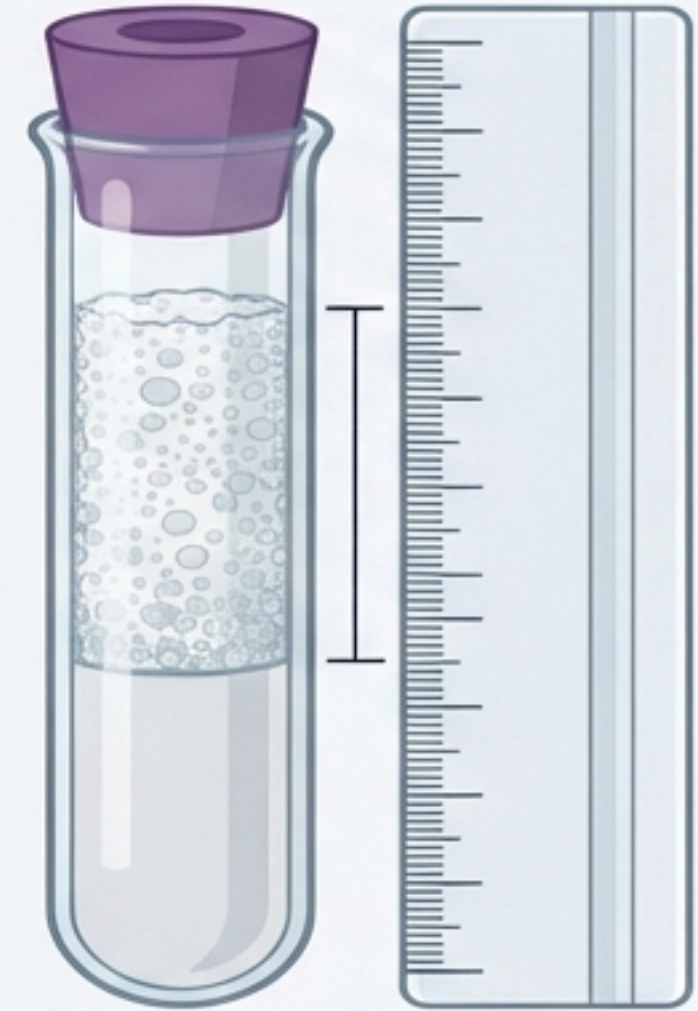
Incubar todos los tubos a temperatura ambiente durante 50 minutos.

## Recolección de datos:

Con una regla, medir la altura exacta (en cm) de la capa de espuma formada sobre el líquido.

## Interpretación Experta:

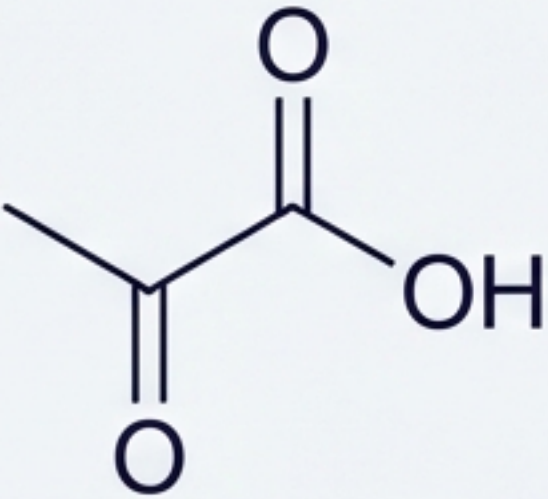



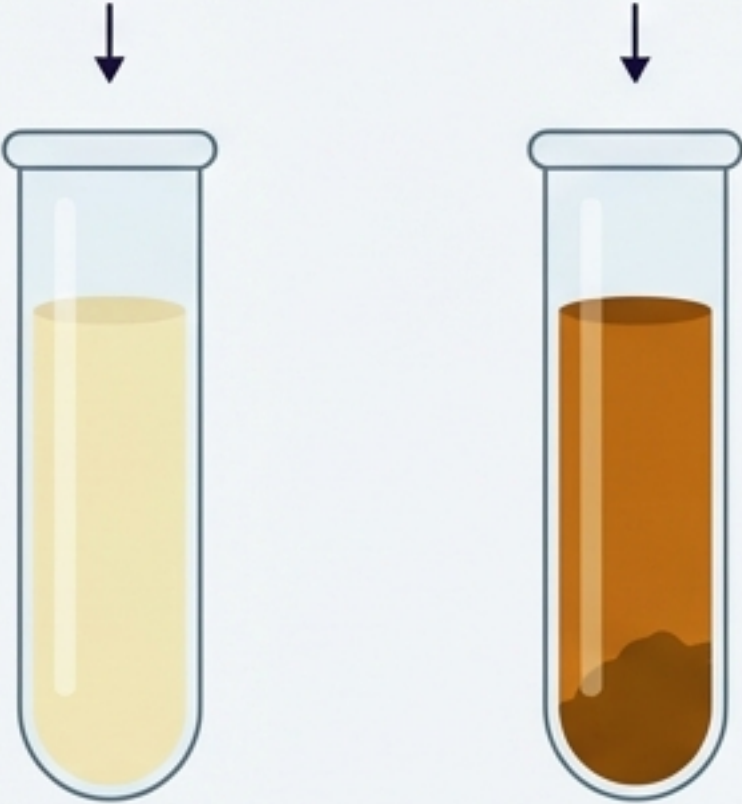
La espuma es CO<sub>2</sub> atrapado, producto de la descarboxilación del piruvato por la enzima piruvato descarboxilasa. A mayor altura, mayor flujo a través de la vía glucolítica. Tabula estos datos.




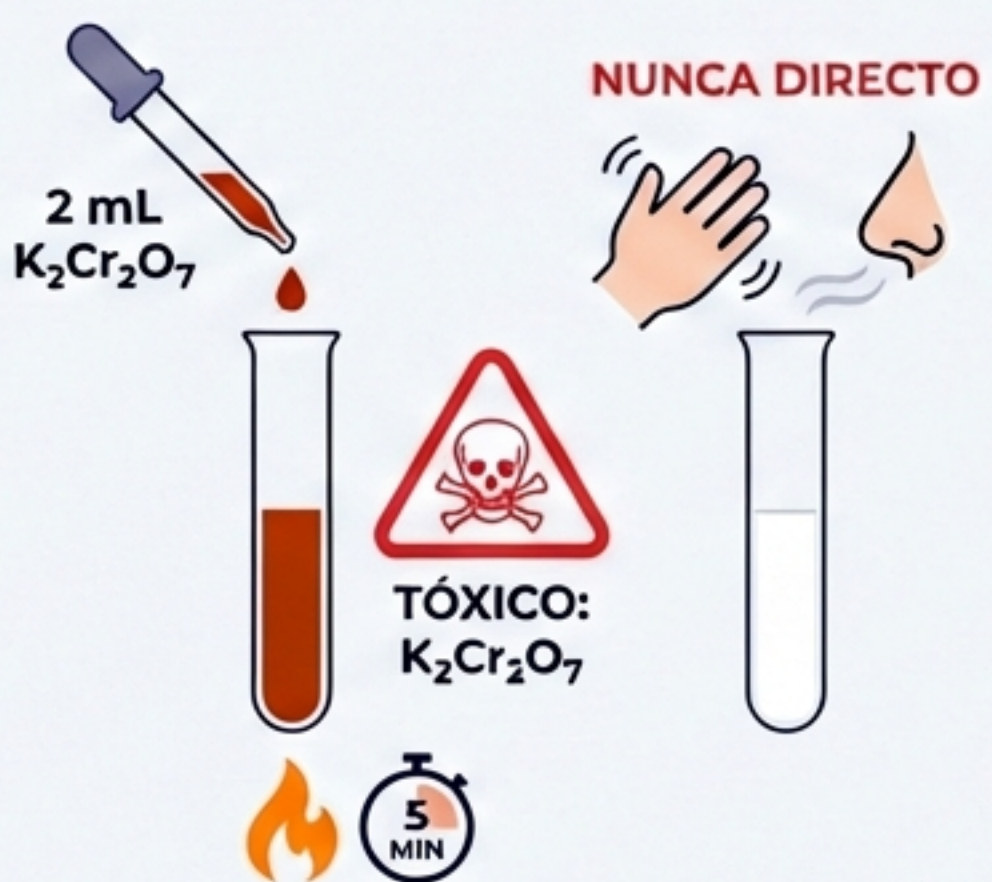
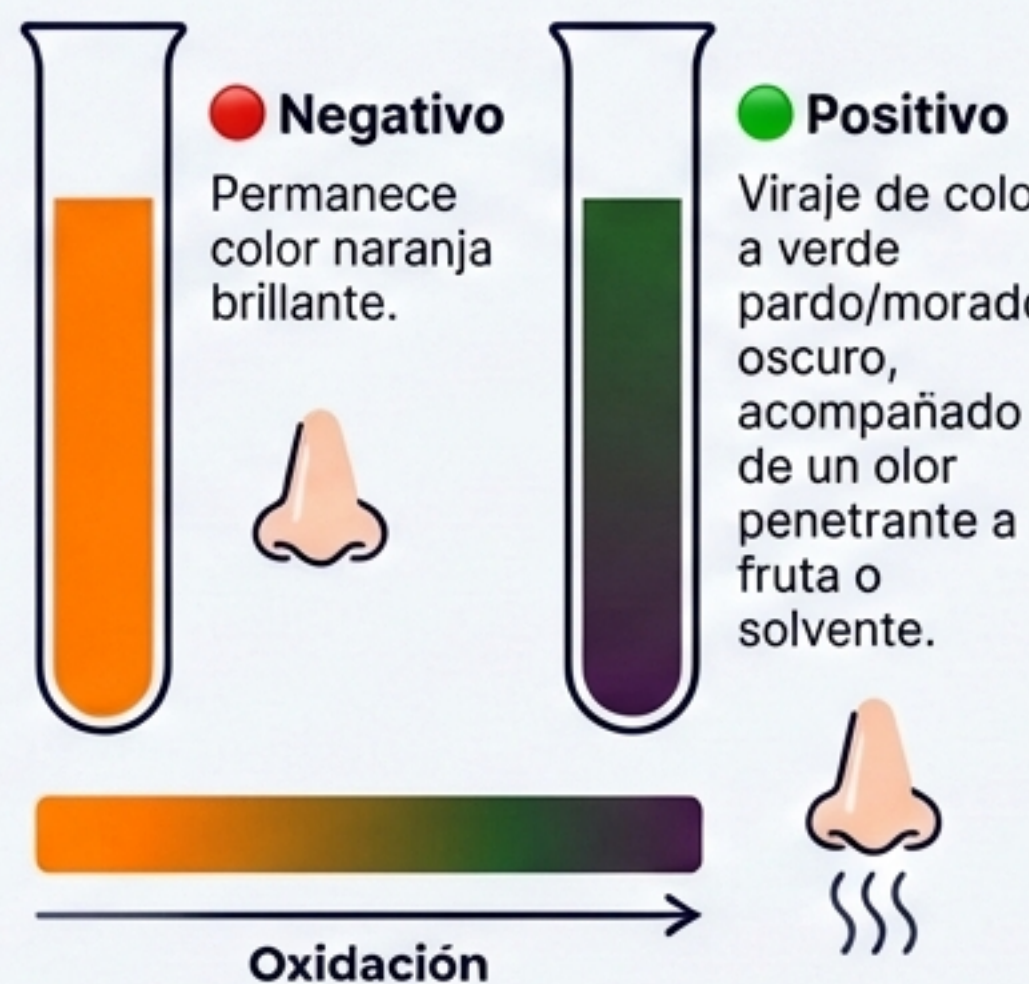
### **Punto de Corte (Fin de Sesión 1)**

1. Sellar herméticamente los 15 tubos.
2. Etiquetar la gradilla por equipo.
3. Almacenar a 4 °C para frenar el metabolismo celular y preservar el rastro bioquímico exacto para la Sesión 2.

# Prueba A: Captura de Piruvato (Tubos 1, 6, 11)

Fundamento (Qué detecta):	Acción (Qué hacer):	Semáforo de Resultados:
<p>El reactivo de Brady (2,4-DNFH) reacciona específicamente con los grupos carbonilo de los cetoácidos como el piruvato.</p>  <chem>CC(=O)C(=O)O</chem>	<p>Añadir 3 mL de Reactivo de Brady a cada tubo. Dejar reposar 5 minutos. (¡Usa equipo de protección!)</p>  <chem>H2SO4</chem>	<p> Negativo       Positivo</p> 

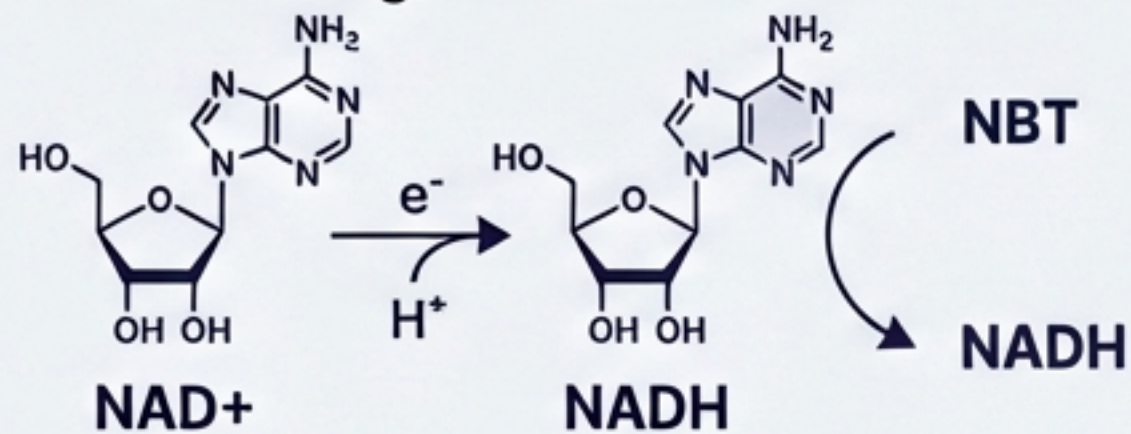
# Prueba B: Oxidación de Intermediarios (Tubos 2, 7, 12)

Fundamento (Qué detecta):	Acción (Qué hacer):	Semáforo de Resultados:
<p>Detecta la presencia de alcoholes primarios y aldehídos, evidenciando el final de la ruta fermentativa (Etanol).</p> 	<p>Añadir 2 mL de <math>K_2Cr_2O_7</math> saturado. Hervir 5 minutos. Olfatear el vapor con técnica de arrastre de mano (NUNCA directamente).</p> 	<p><b>● Negativo</b> Permanece color naranja brillante.</p> <p><b>● Positivo</b> Viraje de color a verde pardo/morado oscuro, acompañado de un olor penetrante a fruta o solvente.</p> 

# Prueba C: Detección de Poder Reductor (Tubos 3, 8, 13)

## Fundamento (Qué detecta):

Reacción mediada por la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). El NADH generado cede electrones al reactivo Nitroblue-tetrazolium (NBT), reduciéndolo a un precipitado insoluble de color negro o azul intenso.

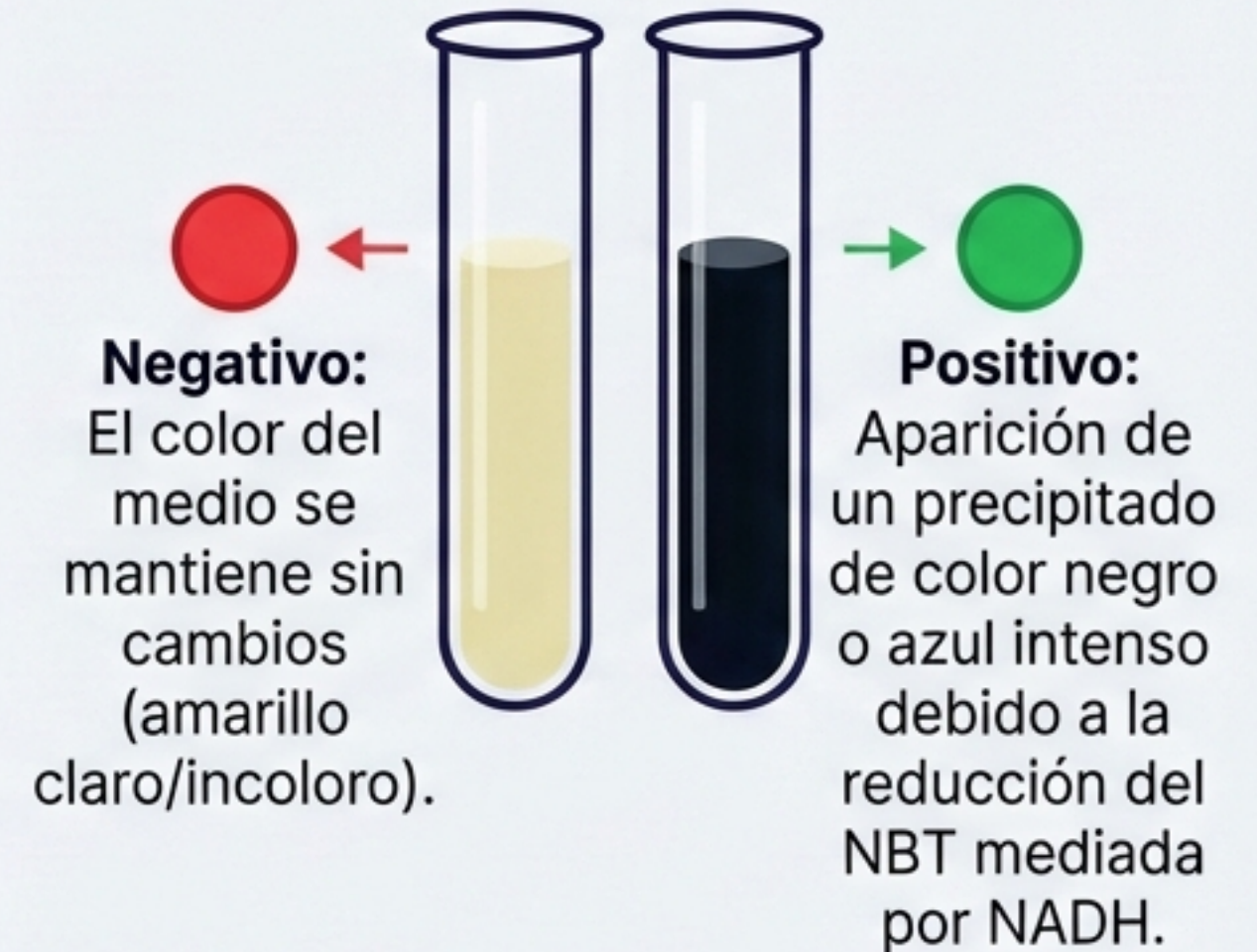


## Acción (Qué hacer):

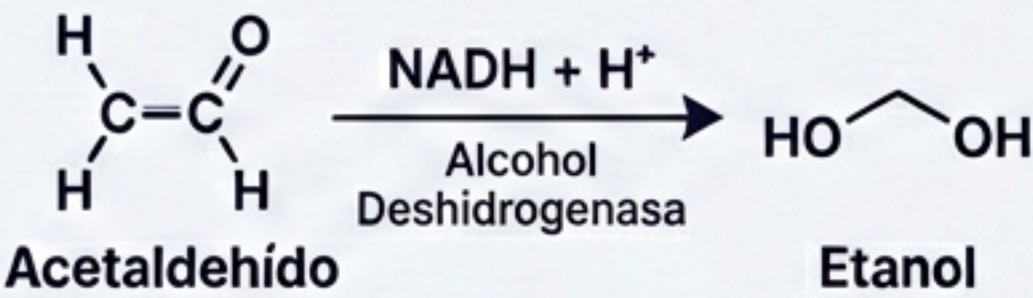

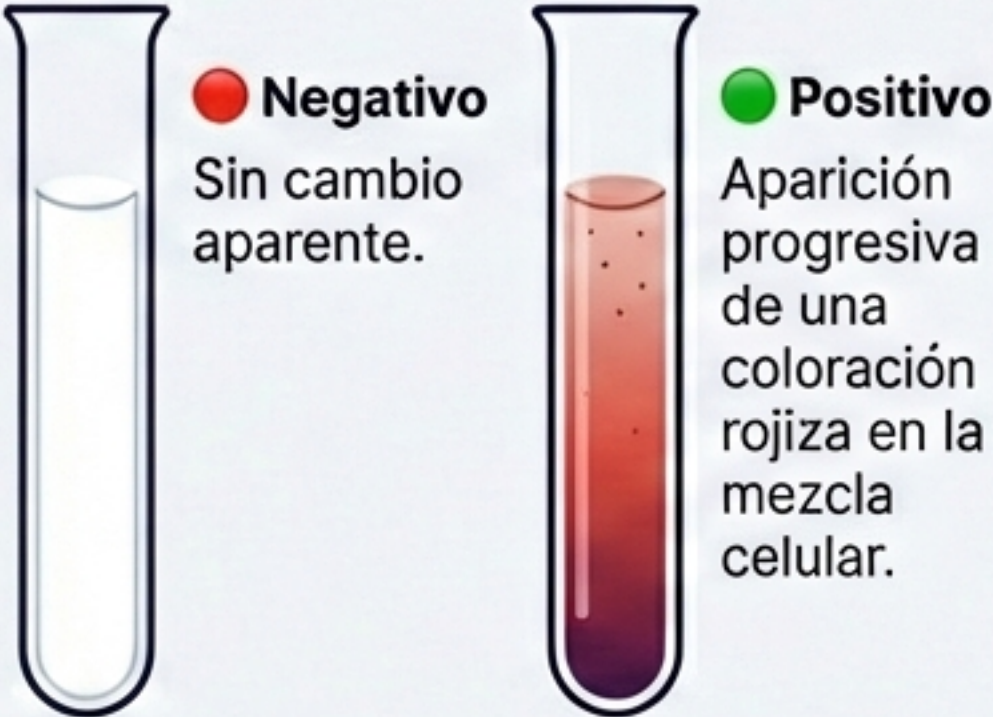
Añadir 10 gotas de reactivo Nitroblue-tetrazolium (NBT). Sellar tubo.



## Semáforo de Resultados:



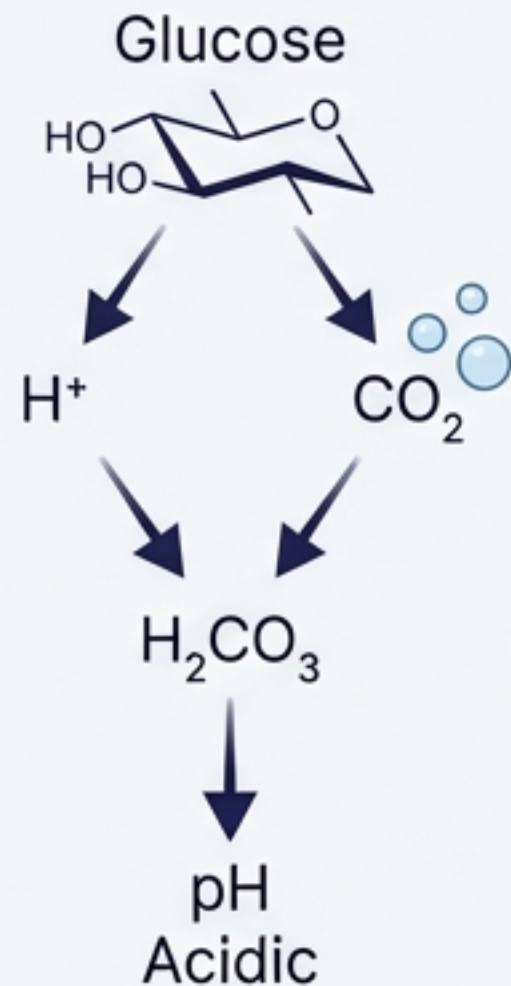
# Prueba D: Acumulación de Alcohol (Tubos 4, 9, 14)

Fundamento (Qué detecta):	Acción (Qué hacer):	Semáforo de Resultados:
<p>Confirmación secundaria de la reducción de acetaldehído a etanol por la alcohol deshidrogenasa al final de la vía.</p> <div data-bbox="179 1088 1116 1360"><p><chem>CC=O</chem> <math>\xrightarrow[\text{Alcohol Deshidrogenasa}]{\text{NADH} + \text{H}^+}</math> <chem>CCO</chem></p><p>Acetaldehído Etanol</p></div>	<p>Añadir 10 gotas de solución de nitrato cérico amoniacal a cada tubo antes de calentar a ebullición. Calentar los tubos a ebullición en baño maría durante 5 minutos de forma sostenida. Observar cambios físicos.</p> <div data-bbox="1359 1046 1969 1684"></div>	<div data-bbox="2215 709 3115 1365"><p><b>● Negativo</b> Sin cambio aparente.</p><p><b>● Positivo</b> Aparición progresiva de una coloración rojiza en la mezcla celular.</p></div>

# Prueba E: Acidificación del Medio (Tubos 5, 10, 15)

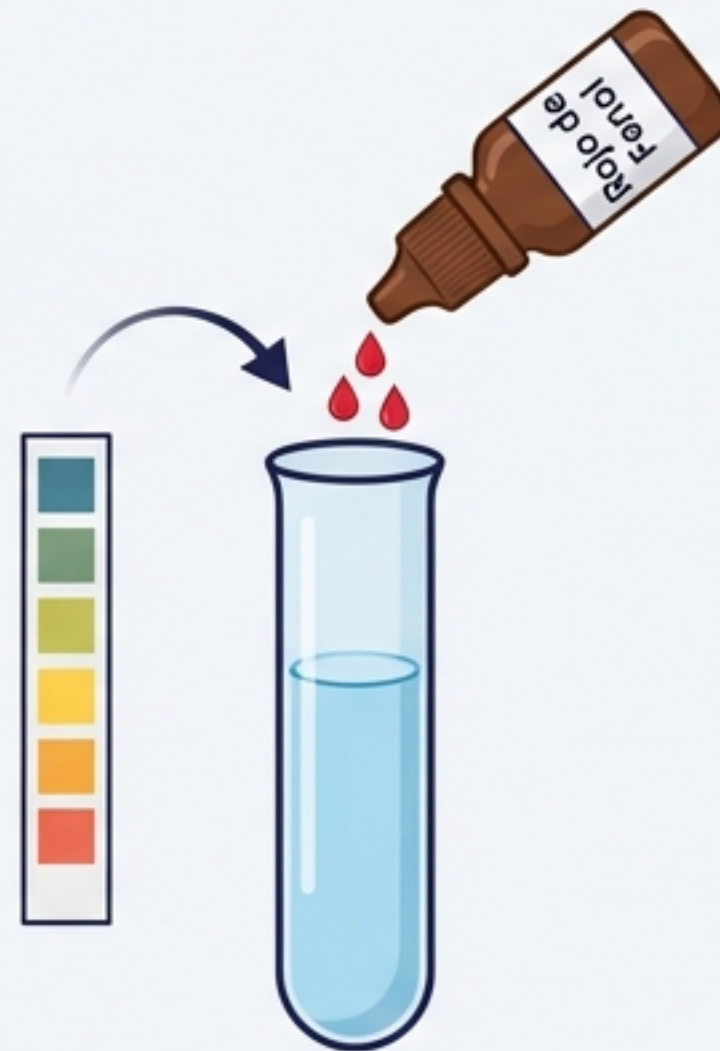
## Fundamento (Qué detecta):

Durante la glucólisis se liberan protones ( $H^+$ ). Además, el  $CO_2$  disuelto forma ácido carbónico, desplomando el pH extracelular.



## Acción (Qué hacer):

Medir el pH inicial con tira reactiva. Añadir 3 gotas de Rojo de Fenol. Comparar color.



## Semáforo de Resultados:

**● Negativo:**  
Color rojo/fucsia (pH base/neutro).

**● Positivo:**  
Viraje drástico a amarillo brillante/naranja intenso (pH altamente ácido).

# Tratamiento de Datos: Del Tubo a la Gráfica

## Consolidación:

Reúne las mediciones de altura de burbujas (Prueba 0) de todos los equipos del laboratorio.

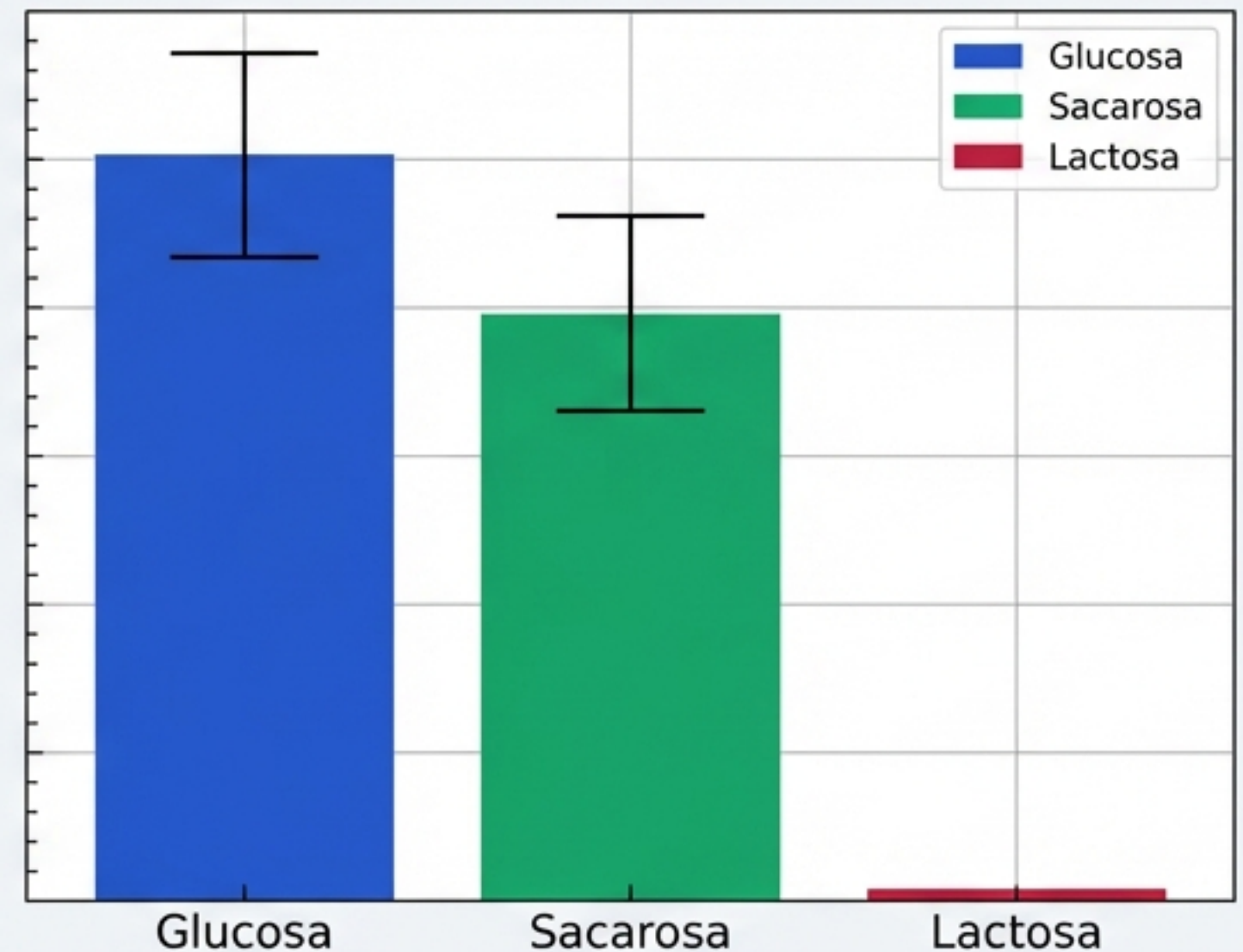
## Análisis Descriptivo:

Calcula el promedio aritmético y la desviación estándar para cada tipo de carbohidrato.

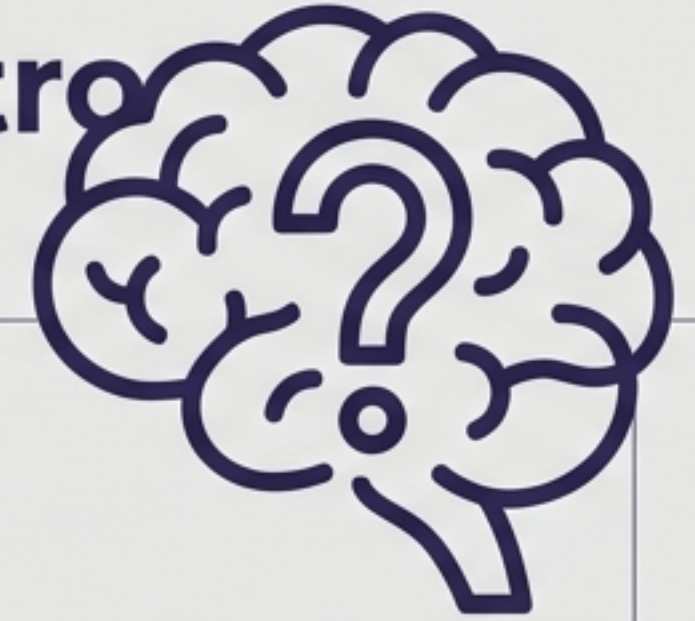
## Visualización Científica:

Construye un gráfico de barras. Usa las barras de error (desviación estándar) para validar visualmente si la diferencia metabólica entre D-Glucosa y Sacarosa es estadísticamente significativa o producto del azar.

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n} \quad \sigma$$



# Discusión Guiada: Interpretando el Rastro



Para tu reporte, responde basándote en la evidencia física de tu matriz experimental:

**1. Entrada Directa:** ¿Por qué la D-Glucosa muestra el metabolismo más violento y rápido de las tres muestras?

**2. El Paso Extra:** La sacarosa también produce etanol y  $\text{CO}_2$ . ¿Qué enzima externa a la glucólisis debe utilizar la levadura para procesarla primero?

**3. El Control Biológico:** ¿Por qué la lactosa falló en activar el semáforo en todas las pruebas? Analiza la carencia de  $\beta$ -galactosidasa en *S. cerevisiae* y cómo esto define un control biológico negativo perfecto.