



Olimpiada de Biologia
de Catalunya

XIII Olimpiada de Biologia de Catalunya

Proves pràctiques

8 de febrer de 2023

NOM I COGNOMS: _____

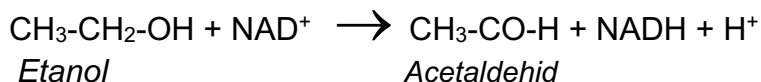
DNI: _____

PROVA PRÀCTICA 2: DETERMINACIÓ DEL GRAU D'ETANOL EN UNA BEGUDA

Introducció. L'etanol és el segon component principal de totes les begudes alcohòliques. És una substància fàcil d'obtenir a partir de nombroses fonts i és capaç de modificar el nostre estat d'ànim i de comportament.

L'absorció d'etanol en el cos comença immediatament després de la ingesta i es realitza principalment a l'intestí prim. Un cop absorbit, travessa el fetge i passa a la circulació perifèrica. L'etanol és eliminat principalment al fetge (75%), tot i que també es dona una eliminació extrahepàtica. L'eliminació és principalment per oxidació, essent l'enzim alcohol deshidrogenasa (ADH) la responsable de fer-ho. L'alcohol deshidrogenasa catalitza la interconversió de l'etanol i d'altres alcohols als corresponents aldehids. A continuació l'acetaldehid és eliminat per l'acció de l'enzim aldehid deshidrogenasa.

ADH



L'activitat de l'alcohol deshidrogenasa (ADH) ha estat detectada en tots els organismes en els què s'ha investigat, havent-se aïllat aquest enzim en éssers vius de diferent nivell de complexitat: bacteris, fongs, llevats, plantes i animals.

Objectiu. Determinar la concentració d'etanol d'una beguda mitjançant un mètode espectrofotomètric basat en determinar la concentració de la substància que sembli més apropiada de les quatre que intervenen en la reacció.

A partir de les següents gràfiques de absorbàncies, contesteu en el Full de respostes les preguntes 1 i 2.

Reactius i aparells

- Enzim alcohol deshidrogenasa (ADH) de llevat: 1.800 UI/mL (UI = unitats internacionals).
- Dissolució del coenzim NAD^+ 30 mM.
- Tampó glicina 0,1 M amb albúmina de sèrum boví (BSA) al 0,1%; pH 10.
- Mostra problema: beguda comercial alcohòlica diluïda 1/5000.
- Espectrofotòmetre.
- Bany d'aigua Maria a 37°C.

Protocol a seguir:

Incubar la mostra problema en presència d'excés de NAD^+ i de l'enzim ADH fins que s'arribi a l'estabilitat, aproximadament uns 10 minuts. Per tal de provocar la reacció cal seguir els següents passos:

1. Marcar dos tubs Eppendorf: "M" de mostra i "C" de control i afegir dos barreges de reacció amb la següent composició:

- 2 mM de coenzim NAD^+
- 50 UI/mL d'ADH de llevat
- Afegint tampó glicina fins a arribar a un volum final de 0,9 mL

NOTA: sempre afegir els components de major a menor volum perquè es barregin bé.

2. Afegir 100 μL de la beguda problema, un Vodka (diluïda 1/5000) a tub "M", i 100 μL de tampó glicina al tub "C". El tub "C" és el blanc sense alcohol. En el full de respostes contesteu a la pregunta 3 sobre les quantitats necessàries a utilitzar per fer aquests dos tubs Eppendorf.

3. Incubar el dos tubs en el bany Maria a 37°C durant 10 minuts.

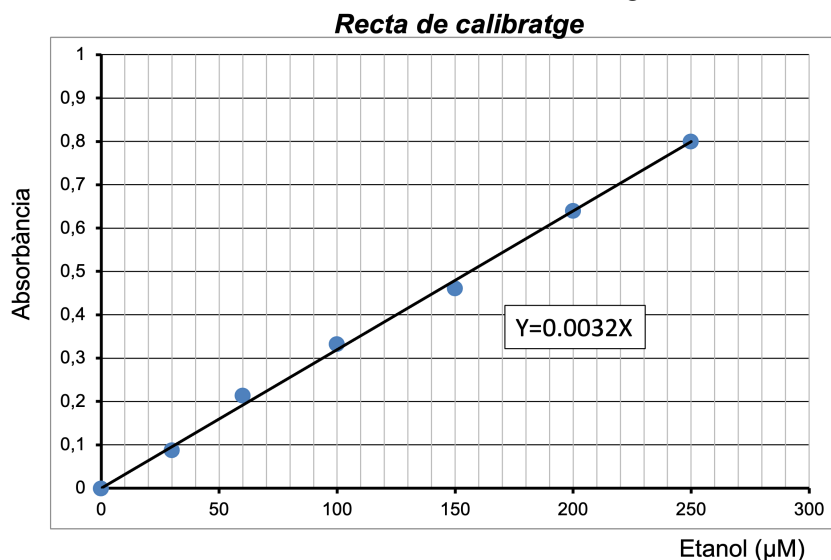
4. Obrir l'espectrofotòmetre i marcar la longitud d'ona escollida a la pregunta 2.

5. Treure les mostres del bany i transferiu el seu contingut a cubetes d'espectrofotòmetre. Cal recordar que s'han d'agafar per les seves dues cares translúcides, mentre que les dues cares transparents són les que han de ser travessades per la llum de l'espectrofotòmetre.

6. Amb la cubeta que conté el blanc, ajusteu l'espectrofotòmetre al valor zero. Si en qualsevol moment s'entelen per fora les cubetes s'han d'assecar amb paper. En el full de respostes contesteu la pregunta 4. A continuació repetir el procediment amb el tub "M".

7. Llegir i anotar l'absorbància del tub "M". Així es mesura l'absorbància del producte adequat (determinació colorimètrica).

8. Segon la llei de Lambert-Beer, l'absorbància d'un compost és proporcional a la seva concentració, per valors d'absorbància iguals o inferiors a 1. D'aquesta manera l'absorbància del producte adequat obtingut ens indica la seva concentració. En la següent recta de calibratge en lloc de posar la concentració d'aquest producte ja apareix directament la concentració de l'etanol que ho ha produït. En el full de respostes contesteu les preguntes 5, 6 i 7 sobre la concentració d'etanol en la beguda analitzada.





Olimpiada de Biologia
de Catalunya

XIII Olimpiada de Biologia de Catalunya

Proves pràctiques

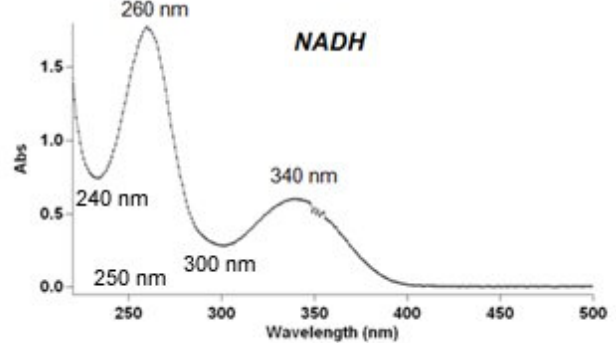
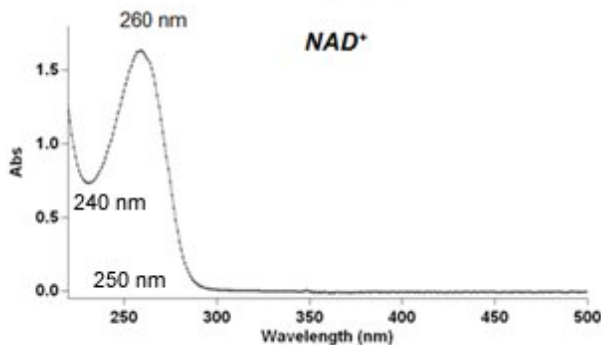
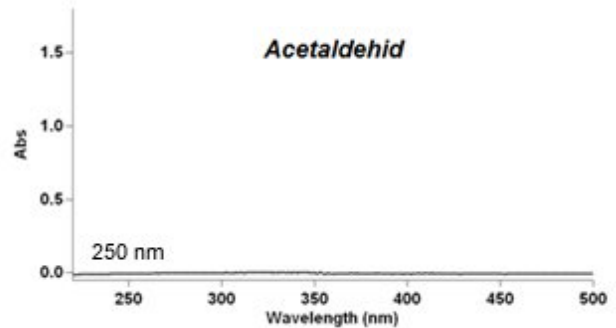
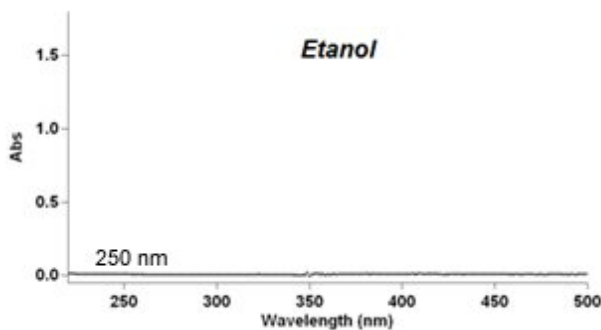
8 de febrer de 2023

NOM I COGNOMS: _____

DNI: _____

FULL DE RESPOSTES

Pregunta 1. Veient els següents espectres d'absorció dels quatre components de la reacció, indiqueu quina és la substància més adequada per a mirar la seva absorbància i esbrinar la concentració d'etanol.



- a) Etanol
- b) NAD^+
- c) Acetaldehid
- d) **NADH**

Pregunta 2. Veient els següents espectres d'absorció dels quatre components de la reacció, indiqueu quina és la longitud més adequada en la que cal mirar pel espectrofotòmetre.

- a) 250 nm
- b) 260 nm
- c) 300 nm
- d) **340 nm**

Raonament

La longitud d'ona adequada per fer aquesta determinació és 340 nm. Etanol i acetaldehid no absorbeixen llum en aquest rang de l'espectre i no es poden determinar directament per la seva absorbància. NAD^+ i NADH ho fan totes dues a 260 nm per la qual cosa no podem fer el seguiment de la reacció en aquesta longitud d'ona, ja que mesuraríem simultàniament la disminució d'absorbància deguda al consum de NAD^+ i el seu increment degut a la conversió a NADH. A 340 nm només absorbeix llum el NADH, per lo que podem quantificar la quantitat de NADH produïda (que serà proporcional a la d'etanol inicial) sense interferència d'altres components de la reacció

Pregunta 3. Indiqueu en la següent taula quin volum dels següents components heu utilitzat en el tub de reacció:

	Coenzim NAD^+	ADH de llevat	Tampó glicina (pH 10)
Volum (μL)	60	25	815

Raonament

$$V \times M = V' \times M'$$

$$X \mu\text{L} \times 30\text{mM} = 900 \mu\text{L} \times 2\text{mM} \dots X = 60 \mu\text{L}$$

$$X \mu\text{L} \times 1800 \text{ unitats} = 900 \mu\text{L} \times 50 \text{ unitats} \dots X = 25 \mu\text{L}$$

$$900 \mu\text{L} - 60 \mu\text{L} - 25 \mu\text{L} = 815 \mu\text{L de tampó glicerina}$$

Pregunta 4. Per què és important la barreja que anomenem blanc sense alcohol?

- a) Per restar l'absorbància de tots els altres components de la reacció, com el tampó o l'enzim i inclús els deguts a la pròpia cubeta.
- b) Per restar l'absorbància deguda al NAD^+ .
- c) Per restar l'absorbància deguda a l'etanol.
- d) Per restar l'absorbància deguda al tampó.

Raonament

Es fa per poder restar l'absorbància, a la longitud d'ona seleccionada, que correspon a altres components de la reacció, com el tampó o l'enzim (e inclús deguda a la pròpia cubeta), i que no correspon al NADH que es produirà durant la reacció.

Pregunta 5. Quin valor d'absorbància del tub "M", s'assembla més al teu resultat? I quina seria la concentració (μM) d'etanol resultant? Utilitza la recta patró proporcionada.

- a) Una absorbància de aproximadament 0,20 a la que correspon una concentració d'etanol de aproximadament 60 μM .
- b) Una absorbància de aproximadament 0,42 a la que correspon una concentració d'etanol de aproximadament 130 μM .
- c) Una absorbància de aproximadament 0,65 a la que correspon una concentració d'etanol de aproximadament 200 μM .

- d) Una absorbància de aproximadament 0,80 a la que correspon una concentració d'etanol de aproximadament 250 μM .

Raonament

Absorbància obtinguda: 0.42 (o aproximadament)

Concentració d'etanol a la barreja de reacció: 131.25 μM (o aproximadament)

Pregunta 6. A partir de la concentració anterior calcula quina serà la concentració original de l'ampolla de Vodka.

- a) 0,65 M.
- b) 0,80 M.
- c) 4,5 M.
- d) 6,5 M.

Raonament

$131.25 \mu\text{M} \times 10 \times 5000 = 6.56 \text{ M}$ (o aproximadament)

Pregunta 7. Tenint en compte que l'etanol absolut té una densitat de 0,790 g/cm³ i un pes molecular de 46,07 g/mol, calculeu quin és el grau alcohòlic en % (v/v) del Vodka a l'ampolla original.

- a) 29,9% o sigui 29,9°
- b) 38% o sigui 38°
- c) 46,07% o sigui 46,07°
- d) 79,0% o sigui 79°

Raonament. $6,5 \text{ moles/l} \times 46,07 \text{ g/mol} \times 1\text{litro} / 790 \text{ g} = 0,38 \text{ litres de alcohol en 1 litre de Vodka}$, es a dir un 38% o sigui 38°