

ANTIMICROBIANS DE QUILÒMETRE ZERO

LES PROPIETATS ANTIBACTERIANES I
ANTIFÚNGIQUES DELS OLIS ESSENCIALS DE
TIMÓ I ORENGA

Timol

Curs 2022-2023

RESUM

Després de la descoberta de la penicil·lina l'any 1928, els antimicrobians han esdevingut uns dels fàrmacs indispensables al món sanitari gràcies a l'àmplia efectivitat que tenen per a combatre patologies infeccioses provinents de microorganismes com són els bacteris i fongs.

De fet, gràcies a la descoberta d'aquests medicaments, malalties infeccioses que antigament causaven estralls en la humanitat, com per exemple la tuberculosi, avui dia poden tractar-se o prevenir-se adequadament.

Tot i que la gran majoria d'aquests fàrmacs provenen dels mateixos microorganismes o són sintetitzats químicament, varis estudis han demostrat l'activitat antimicrobiana en un extens nombre de productes vegetals que podria afegir-los al grup dels antibiòtics.

És per això que moltes vegades hem sentit a parlar de l'efectivitat d'algunes plantes remeieres per curar infeccions del coll i de la pell, entre moltes altres.

ABSTRACT

After the penicillin discovery in 1928, antimicrobials have become one of the most essential medicines in the sanitary world, thanks to the wide efficacy they have to treat infectious diseases caused by microorganisms like bacteria and fungus.

In fact, thanks to the discovery of these medicines, illnesses that formerly caused ravages on the humanity, as tuberculosis, nowadays can be treated or prevented properly.

Although, most of these medicines come from the same microorganisms or are synthesized chemically, several studies have proved antimicrobial activity in a wide range of vegetal products so that they could be added to the antibiotics' group.

For this reason, we have heard many times about the efficiency of some medical plants to treat diseases like sore throat, skin infections, among others.

ÍNDEX

INTRODUCCIÓ	4
MARC TEÒRIC	6
1. LA MICROBIOLOGIA.....	6
2. ELS BACTERIS	7
2.1. Estructura.....	7
2.2. Morfologia	9
2.3. Fisiologia.....	10
3. ELS LLEVATS.....	12
3.1. Estructura.....	12
3.2. Morfologia	13
3.3. Fisiologia.....	13
4. ELS ANTIMICROBIANS	14
4.1. Els antibiòtics	14
4.2. Els antifúngics	15
5. PROVES MICROBIOLÒGIQUES	17
5.1. L'antibiograma.....	17
5.2. L'espectrofotòmetre	17
6. ANTIMICROBIANS VEGETALS	19
6.1. El timó.....	19
6.2. L'orenga	20
6.3. Els olis essencials	20
6.4. Cromatografia en capa fina.....	21
PART PRÀCTICA	22
7. MATERIALS I MÈTODES	22
7.1. Destil·lació dels olis essencials.....	22
7.2. Proves microbiològiques	25
7.3. Cromatografia en capa fina.....	33
8. RESULTATS I ANÀLISI.....	36
CONCLUSIONS	49
BIBLIOGRAFIA I WEBGRAFIA	51
ANNEX 1	
ANNEX 2	

INTRODUCCIÓ

Moltes vegades hem sentit a parlar de l'eficàcia d'algunes plantes per tractar alguna patologia o infecció. El timó i l'orenga són dos plantes aromàtiques presents al territori català que es caracteritzen, en gran part, per presentar propietats antibacterianes i antifúngiques. Aquest treball estudia les propietats antibacterianes i antifúngiques que presenten diferents olis essencials de timó i orenga i ho compara amb l'efecte d'altres productes d'ús quotidià com són els antimicrobians.

L'interès per l'àmbit científic i l'accessibilitat als recursos necessaris m'ha portat a escollir aquest tema que engloba, majoritàriament, aspectes de microbiologia i biologia i, que m'ha permès donar al lector una possible explicació del motiu de l'efectivitat d'alguns remeis casolans.

A banda d'aspectes relacionats amb la microbiologia i la biologia, al llarg del treball és poden observar relacions amb l'àrea de matemàtiques, de tecnologia i de llengua.

La metodologia que he cregut més convenient per a desenvolupar el treball ha estat la creació d'un treball de laboratori mitjançant el qual he realitzat diversos experiments que m'han proporcionat dades de primera mà que he pogut analitzar. A partir d'aquests, he pogut obtenir part dels productes utilitzats partint de matèria primera ecològica i de la zona, he pogut comparar l'efectivitat entre diferents olis essencials i productes quotidians en medicina i he pogut determinar a què es deuen les propietats atorgades a cada oli essencial.

Amb l'objectiu principal de poder demostrar els comportaments antibacterians i antifúngics dels olis essencial de timó i orenga, el treball també persegueix altres objectius com són els següents:

- Crear els olis essencials a partir del timó i l'orenga recollits prèviament.
- Comprovar les propietats antibacterianes i antifúngiques dels olis essencials esmentats.
- Determinar la composició química dels olis emprats i diferenciar-ne els principis actius.
- Poder realitzar una aproximació a la recerca.

La hipòtesi en torn a la que gira la recerca és la següent: els olis essencials de timó i orenga tenen propietats antibacterianes i antifúngiques.

El treball s'estructura en dues parts principals. La primera, fa una visió general de tot el marc teòric necessari per entendre la part experimental i el que s'estudia al llarg del treball, d'aquesta manera s'aconsegueix que es pugui fer un seguiment més clar de tota la recerca . La segona part, consta d'un projecte de laboratori estructurat en diversos apartats que busquen demostrar l'efectivitat dels diferents olis essencials analitzats contra quatre microorganismes diferents; dos bacteris i dos llevats.

MARC TEÒRIC

1. LA MICROBIOLOGIA

Segons l'enciclopèdia catalana, la microbiologia és la part de la biologia que s'encarrega de la descripció dels nombrosos tipus de microorganismes entre els quals s'inclouen bacteris, fongs, protozous, algues, virus, etc.; de l'estudi de les seves condicions i medis de vida, de les seves relacions amb la natura i de tots aquells casos en què aquests microorganismes esdevenen patògens per a l'home. L'extensa focalització de la microbiologia en microorganismes patògens per als humans ha relacionat la microbiologia amb categories de la medicina com la patologia, la immunologia i l'epidemiologia.

L'objectiu de la microbiologia és la comprensió de les activitats perjudicials i beneficioses dels microorganismes i a partir d'aquesta, poder desenvolupar una manera d'augmentar els beneficis i reduir o eliminar els danys.

2. ELS BACTERIS

Els bacteris constitueixen un extens grup de microorganismes unicel·lulars que pertanyen al regne procariota¹. La cèl·lula procariota, comuna a totes les espècies de bacteris, es caracteritza per la seva simplicitat, per l'absència del nucli i per la presència d'una paret cel·lular rígida, que protegeix al microorganisme de les condicions del medi extern. Generalment, presenten una forma esfèrica, cilíndrica o espiraliforme i les seves dimensions oscil·len entre 1 i 3 µm.

Constitueixen el tipus de microorganismes més nombrosos i són presents en pràcticament tots els medis. Habiten al sòl, a l'aigua o als organismes de plantes i animals, incloent els humans.

2.1. ESTRUCTURA

Tots els bacteris tenen una sèrie d'elements vitals entre els quals s'inclouen els següents:

- **L'ADN bacterià:** A diferència de les cèl·lules eucariotes, l'ADN dels bacteris es troba lliure al citoplasma en una zona anomenada nucleoide. Està format per un filament de dues cadenes de polinucleòtids enrotllades de forma helicoidal associades a proteïnes. Dins l'ADN s'emmagatzema tota la informació genètica del bacteri que s'encarrega de controlar el metabolisme cel·lular i el mecanisme de reproducció.
- **El citoplasma:** El citoplasma bacterià és una substància gelatinosa, formada en un 85% per aigua juntament amb altres substàncies en dissolució (citosol) i els orgànuls cel·lulars, que inclouen, majoritàriament, ribosomes 70s.
- **La membrana citoplasmàtica:** La membrana citoplasmàtica bacteriana exerceix la funció de barrera que aïlla i protegeix les estructures citoplasmàtiques i la zona del nucleoide. A més, també actua com a barrera osmòtica² i barrera activa permetent el pas d'aquells elements que el bacteri ha d'incorporar o eliminar segons el seu metabolisme.
- **La paret cel·lular:** La paret cel·lular és un recobriment rígid que envolta i separa la membrana citoplasmàtica del medi extern i actua com a esquelet del

¹ **Regne procariota:** Conegut també com a regne monera i compost majoritàriament per bacteris i arquees.

² **Osmosi:** Procés pel qual es busca la igualació de concentracions de dos medis amb diferents concentracions de partícules, mitjançant el pas d'aigua a través d'una membrana semipermeable. Les cèl·lules estan sotmeses a elevades pressions osmòtiques perquè el seu medi intern és hipertònic.

bacteri. Fonamentalment, està composta per un element anomenat peptidoglicà³, juntament amb algunes proteïnes, lípids i hidrats de carboni. Depenent de la composició i de la disposició del peptidoglicà a la paret cel·lular, podem diferenciar dos tipus de bacteris: els grampositius i els gramnegatius.

Bacteris grampositius: Es poden tenyir mitjançant la Tinció de Gram⁴ i adopten un color blau fosc o lilós. La seva paret està composta per una gran capa de peptidoglicà o mureïna sobre la membrana cel·lular.

Bacteris gramnegatius: No poden tenyir-se mitjançant la Tinció de Gram, sinó que han de fer-ho mitjançant altres tècniques i adopten un color violeta o rosat. A diferència dels grampositius, la paret cel·lular d'aquests bacteris està formada per una fina capa de peptidoglicà sobre la membrana cel·lular i una membrana externa situada sobre aquesta capa.

A banda d'aquests elements obligats, alguns bacteris poden presentar altres estructures no vitals. Algunes d'aquestes són:

- **La càpsula**: És un recobriment rígid i prim que recobreix la paret cel·lular d'algunes espècies de bacteris. La seva funció principal és protegir al bacteri de la sequedat ambiental, de la infecció per virus i altres bacteris que el parasiten i de la fagocitosi.
- **Els plasmidis**: Els plasmidis són molècules d'ADN que es troben disperses en el citoplasma fora la zona del nucleòide. Contenen un petit nombre de gens que s'associen a la creació de toxines per a l'organisme on s'instal·len i a la resistència per a certs antibiòtics, d'aquesta manera contribueixen en la supervivència i adaptació al nou medi on s'han instal·lat.
- **Els flagels**: Els flagels són uns filaments prim i flexibles que s'estenen de la membrana citoplasmàtica que presenten alguns bacteris i s'utilitzen per al moviment cel·lular.
- **Els pilus o pèls sexuals**: Són uns filaments allargats que permeten la transferència de plasmidis d'un bacteri a un altre. Generalment, els presenten els bacteris que contenen plasmidis i amb poca quantitat.

³ **Peptidoglicà**: Macromolècula formada per cadenes de glúcids i oligopèptids exclusiva dels bacteris que es troba formant part de la paret cel·lular.

⁴ **Tinció de Gram**: Tinció emprada en microbiologia que permet visualitzar i distingir entre bacteris grampositius i gramnegatius.

- **Les fimbries o pèls d'unió:** No s'han de confondre amb els pèls sexuals, ja que són filaments molt més curts que apareixen en quantitats més elevades i que serveixen als bacteris per unir-se entre ells i formar diplococs, estreptobacils, etc.

2.2. MORFOLOGIA

Una altra característica que diferencia els bacteris els uns dels altres és la forma física en que es troben a la natura. Depenent de la forma que presenten, podem diferenciar quatre tipus de bacteris diferents:

- **Cocs (Fig.1):** Són bacteris de forma esfèrica. Poden trobar-se sols o en agrupacions. Depenent de les agrupacions que formen es pot diferenciar entre diplococs⁵, estreptococs⁶ o estafilococs⁷.
- **Bacils (Fig. 2):** Són bacteris que tenen forma de bastó o cilíndrica; allargada i prima o més curta i grossa. Igual que en els cocs, poden trobar-se formant agrupacions en forma de diplobacils⁸ i estreptobacils⁹.
- **Espirils (Fig.3):** Són bacteris la forma dels quals presenta una o més curvatures o forma helicoidal. Aquesta espècie no forma agrupacions.
- **Vibrions (Fig. 4):** Son bacteris gramnegatius que presenten forma de coma o de bastonet corbat.

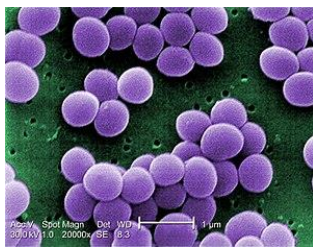


Fig.1: Estafilococs

Font:

<https://upload.wikimedia.org/>

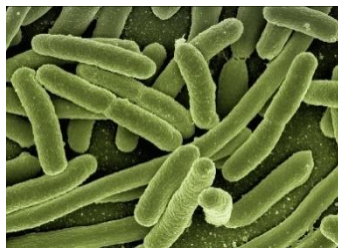


Fig.2: Bacils i diplobacils

Font:

<https://www.encyclopedia.cat/>

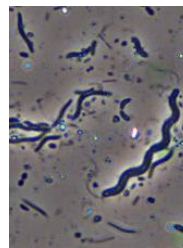


Fig.3: Espiril

Font:

<https://upload/>



Fig.4: Vibrió

Font:

<https://upload.wiki/>

⁵ **Diplococ:** Agrupació de dos cocs.

⁶ **Estreptococ:** Agrupació d'un nombre variable de cocs en forma lineal.

⁷ **Estreptococ:** Agrupació d'un nombre variable de cocs en forma de raïm.

⁸ **Diplobacil:** Agrupació de dos bacils.

⁹ **Estreptobacil:** Agrupació d'un nombre variable de bacils en forma lineal.

2.3. FISIOLOGIA

La fisiologia és la branca de la biologia que estudia les funcions dels éssers vius i els mecanismes que les regulen i regeixen. En aquest apartat veurem la forma com els bacteris desenvolupen les tres funcions vitals: la nutrició, relació i reproducció.

- **Nutrició:** Per a sobreviure, els bacteris necessiten absorbir una sèrie d'elements que els proporcionin energia, és a dir, que entrin en combustió una vegada ingerits; o bé, que es converteixin en part de la seva estructura. Segons el tipus d'element que els cal incorporar de l'exterior diferenciem dos tipus de bacteris:

Bacteris autòtrofs: Només els cal incorporar elements inorgànics, ja que disposen de mecanismes al seu interior que els permeten obtenir l'energia i la matèria orgànica necessàries. Acostumen a fer-ho mitjançant la fotosíntesi.

Bacteris heteròtrofs: A diferència dels anteriors, aquests bacteris han d'incorporar tant els elements inorgànics com orgànics, ja que no tenen la capacitat de transformar la matèria inorgànica (aigua, minerals, etc.) en orgànica (proteïnes, hidrats de carboni, lípids, etc.).

A més a més, en funció de les necessitats d'oxigen que presenten els bacteris podem classificar-los com a bacteris aerobis estrictes, només poden viure amb presència d'oxigen; anaerobis estrictes, només es desenvolupen en medis sense presència d'O₂ i anaerobis facultatius, que tant es poden desenvolupar en medis amb presència d'oxigen com sense.

- **Relació:** Com la majoria d'éssers vius els bacteris es relacionen entre ells. Acostumen a fer-ho formant colònies, en les quals cada bacteri manté la seva individualitat. A més, posseeixen mobilitat que els permet desplaçar-se pel medi segons els interessa.

Els bacteris també es relacionen amb els humans i poden fer-ho de tres maneres diferents; actuant com a comensals¹⁰, com a simbiotes¹¹ i com a paràsits¹².

¹⁰ **Comensalisme:** Relació entre dues espècies en la qual una de les dos surt beneficiada sense causar cap destorb a l'altra.

¹¹ **Simbiosi:** Relació entre dues espècies en la qual les dos surten beneficiades i una no pot viure sense l'altra.

¹² **Parasitisme:** Relació entre dues espècies en la qual una d'elles surt beneficiada a costa de l'altra que surt perjudicada.

- **Reproducció:** Els bacteris es reproduïxen mitjançant un procés asexual, que es duu a terme sense fecundació, anomenat bipartició. Durant aquest procés, la molècula d'ADN d'un bacteri es duplica i la cèl·lula creix. Les dues còpies del material genètic es separen i la cèl·lula es divideix donant com a resultat dos cèl·lules filles idèntiques a la cèl·lula progenitora. Aquest procés els permet reproduir-se a gran velocitat i formar grans colònies amb milers de bacteris clònics amb poques hores.

Tot i així, aquesta forma de reproducció limita la variació d'espècies. És per això que aquests microorganismes han desenvolupat uns mecanismes de parasexualitat que els solucionen el problema. D'aquests mecanismes en distingim tres: la conjugació, la transformació i la transducció.

3. ELS LLEVATS

Els llevats són microorganismes unicel·lulars eucariotes que constitueixen aproximadament l'1% del regne dels fongs i es caracteritzen per la seva capacitat d'originar importants canvis bioquímics en productes orgànics naturals. Aquests canvis són el que anomenem fermentació. Generalment presenten una forma esfèrica i la seva mida oscil·la entre els 2 i 4µm de diàmetre, tot i que hi ha espècies que poden arribar a presentar un diàmetre de 40µm.

Hi ha nombroses espècies de llevats que són objecte continuat d'estudi en biologia com ara l'espècie *Saccharomyces cerevisiae*.

3.1. ESTRUCTURA

A diferència dels bacteris, organismes unicel·lulars amb estructura procariota; els llevats presenten l'estructura de les cèl·lules eucariotes tot i que amb algunes diferències.

- **Nucli:** El nucli de les cèl·lules fúngiques conté l'ADN en forma de cromosomes i és la zona on es troba tota la informació genètica del microorganisme. A més, també conté ARN i altres proteïnes.
- **Membrana nuclear:** És una estructura proteica que protegeix i delimita el nucli impedit que diversos elements presents al citoplasma hi penetrin.
- **Membrana citoplasmàtica:** La membrana citoplasmàtica dels fongs és similar a la dels bacteris, ja que presenta sensibilitat a alguns antibiòtics degut a la presència d'un lípid que la constitueix. Principalment, s'encarrega de separar el medi extern de l'intern i de regular l'entrada i la sortida de substàncies.
- **Paret cel·lular:** És una estructura compacta formada generalment per compostos de sucres i quitina¹³ la qual, juntament amb la maca de cel·lulosa, la diferencia de la paret vegetal de les cèl·lules eucariotes vegetals.
- **Citoplasma:** El citoplasma de les cèl·lules fúngiques està compost per una substància aquosa (citosol) i, a diferència dels bacteris, per un gran nombre d'òrgànuls d'entre els quals podem diferenciar: vacúols, ribosomes 80s, mitocondries, reticles endoplasmàtics i l'aparell de Golgi. Els fongs no contenen cloroplasts.

¹³ **Quitina:** Principal constituent de la paret cel·lular d'alguns fongs, algues i líquens, i de l'exoesquelet dels insectes i crustacis.

3.2. MORFOLOGIA

Al regne dels fongs podem diferenciar entre llevats (microorganismes emprats al llarg de la recerca) i floridures. Els primers tenen una forma esfèrica o oval i un diàmetre que majoritàriament va dels 2 als 4µm. Les segones, d'altra banda, estan formades per unes subunitats anomenades hifes (estructures tubulars formades per un nombre variable de cèl·lules que s'alineen entre elles).

3.3. FISIOLOGIA

- **Nutrició:** Els llevats són microorganismes heteròtrofs, és a dir, han d'ingerir tant matèria inorgànica com orgànica ja que, a diferència d'altres, no tenen la capacitat de transformar la primera en la segona.
Acostumen a alimentar-se realitzant la fermentació d'hidrats de carboni (sucres, majoritàriament) que, com a conseqüència, produeix l'alliberació d'altres substàncies com ara alcohol i diòxid de carboni.
- **Reproducció:** El mecanisme de reproducció més habitual per als llevats s'anomena gemmació i consisteix en la formació d'un rovell o botó en un punt determinat de la cèl·lula mare, a partir de la qual es forma la cèl·lula filla. Durant aquest procés, es dupliquen el material genètic i diversos orgànuls presents a l'estructura de la cèl·lula mare que, tot seguit, s'envolten amb la seva pròpia membrana citoplasmàtica i paret i es desprenen de la cèl·lula inicial originant-ne una d'idèntica, tot i que de menor mesura.

4. ELS ANTIMICROBIANS

El terme antimicrobià fa referència a aquella substància capaç de matar o inhibir el creixement de microorganismes com són els bacteris i fongs. Són medicaments essencials per a la salut humana i animal i s'utilitzen tant en medicina humana com veterinària per al tractament d'una gran varietat de malalties infeccioses provinents de diferents microorganismes.

La importància d'aquests tractaments es deu a que actuen explotant les diferències que existeixen entre les cèl·lules d'aquests microorganismes i les de l'organisme afectat. D'aquesta manera asseguren l'eliminació de la infecció de forma segura, ja que només actuen contra parts característiques i úniques de les cèl·lules patògenes sense afectar a la resta.

Existeixen diferents tipus d'antimicrobians com els antibacterians o antibiòtics, els antifúngics, els antiprotozoaris i els antiparasitaris. En aquest treball només es farà referència als dos primers.

4.1. ELS ANTIBIÒTICS

Els antibiòtics són substàncies químiques elaborades per alguns éssers vius, com per exemple els fongs, o desenvolupades de forma artificial mitjançant tècniques de laboratori que posseeixen la capacitat d'inhibir el creixement i reproducció dels bacteris (antibiòtics bacteriostàtics) o que, directament, maten el bacteri (antibiòtics bactericides). D'aquesta manera aconseguen que el sistema immunitari de l'organisme sigui capaç de vèncer els bacteris restants i posi fi a la infecció.

TIPUS D'ANTIBIÒTICS:

Els antibiòtics poden classificar-se tenint en compte diverses característiques:

- **Segons el mecanisme d'acció**

- Inhibició de la síntesi de la paret cel·lular

- Aquests fàrmacs interfereixen en algun dels passos de la construcció de la paret del bacteri, generalment bloquejant la síntesi de peptidoglicà. Això impedeix el creixement i la formació de noves cèl·lules i produeix la mort del bacteri o, en alguns casos, la formació de noves cèl·lules sense paret que queden desprotegides i acaben produint la lisi¹⁴.

¹⁴ **Lisi:** Destrucció total o parcial del contorn d'una cèl·lula i dispersió del citoplasma.

Alteració de la membrana citoplasmàtica

Els antibiòtics que actuen sobre la membrana plasmàtica, modifiquen la permeabilitat d'aquesta i permeten la sortida d'ions i macromolècules essencials per a la vida del bacteri o l'entrada d'altres elements que n'alteren el seu metabolisme. D'aquesta manera provoquen la mort del bacteri.

Inhibició de la síntesi proteica

Gràcies a les diferències estructurals entre els ribosomes bacterians i eucariotes, la síntesi proteica és un dels processos més afectats per l'acció dels antibiòtics. Alguns antibiòtics interfereixen algun pas de la síntesi de proteïnes fixant-se als ribosomes i impedit completament el procés de traducció. D'aquesta manera el bacteri no pot sintetitzar elements imprescindibles per al seu metabolisme i acaba morint.

Alteració del metabolisme o l'estructura dels àcids nucleics

Hi ha antibiòtics que actuen sobre els enzims encarregats dels processos de replicació i transcripció de l'ADN aconseguint bloquejar-los i evitant, per tant, la reproducció del bacteri. Altres fàrmacs actuen directament sobre la molècula d'ADN danyant-la i acaben matant al bacteri.

Bloqueig de la síntesi de factors metabòlics

Alguns antibiòtics actuen contra estructures que són essencials per a la formació d'alguns elements imprescindibles (aminoàcids, bases púriques i pirimidíniques...) per als bacteris. Això fa que el bacteri no pugui dur a terme diversos factors metabòlics i acabi morint.

- **Segons l'efecte directe que tenen sobre el bacteri**

Antibiòtics bactericides: Són antibiòtics que produeixen la mort directa del bacteri.

Antibiòtics bacteriostàtics: Són antibiòtics que inhibeixen el creixement o bloquegen la reproducció del bacteri.

4.2. ELS ANTIFÚNGICS

Quan es parla d'antifúngics o antimicòtics es fa referència a aquells fàrmacs que s'utilitzen per al tractament de patologies causades per fongs. Actuen de manera similar als antibiòtics, ja que afecten únicament a estructures característiques de la composició dels fongs i poden matar-los, o bé, frenar-ne el creixement i impedir-ne la reproducció.

TIPUS D'ANTIFÚNGICS:

De la mateixa manera que els antibiòtics, els antifúngics es poden classificar tenint en compte varies característiques:

- **Segons el mecanisme d'acció:**

- Antimicòtics poliènics

- Els antifúngics poliènics¹⁵ actuen sobre la paret cel·lular dels fong combinant-se amb un component anomenat ergosterol i provocant un canvi a la temperatura de transició de la membrana cel·lular. Com a conseqüència el contingut de la cèl·lula vessa i aquesta acaba morint.

- Inhibició d'enzims

- D'entre aquests podem diferenciar diversos tipus: Els derivats de l'imidazole i triazole, que actuen inhibint un dels enzims necessaris per a la síntesi de la paret cel·lular; les al·lilamines, que inhibeixen un enzim fonamental per a la síntesi d'ergosterol i les equinocandines, que són antifúngics que bloquegen la síntesi de glucà, component fonamental de la paret cel·lular.

- **Segons l'efecte directe que tenen sobre el fong:**

- Segons l'efecte directe que tenen els antifúngics sobre els fongs, podem diferenciar entre els antifúngics que maten directament al microorganisme i aquells que només bloquegen el seu creixement o procés de reproducció.

A més, també es pot classificar als antibiòtics i als antifúngics depenent del seu espectre d'acció, sent d'espectre ampli aquells que són efectius contra un extens nombre de microorganismes i d'espectre reduït, aquells que només es mostren efectius contra uns microorganismes concrets.

¹⁵ **Poliè:** Molècula orgànica que té una regió hidròfila i una regió hidròfoba.

5. PROVES MICROBIOLÒGIQUES

5.1. L'ANTIBIOGRAMA

Després de realitzar un cultiu bacterià i confirmar l'agent causant d'una infecció s'ha de determinar quin és l'antimicrobià més adequat per combatre-la. Per a seleccionar l'antibiòtic, en primer lloc, s'ha de considerar quins són els antibiòtics l'espectre d'acció dels quals inclou al microorganisme infeccios. En segon lloc, s'escullen, d'entre aquests, els productes de primera línia o d'ús preferent i es reserven els de segona i tercera línia que són aquells que, en algun cas, generen efectes adversos indesitjables.

Amb els antibiòtics escollits es realitza un antibiograma, una prova microbiològica que permet observar la sensibilitat dels fàrmacs contra un germen. La tècnica consisteix en aïllar el bacteri en un medi de cultiu adequat on es col·loquen unes pastilles impregnades amb els antibiòtics que es volen estudiar. Al cap d'unes 24 o 48 hores, per avaluar l'eficàcia dels fàrmacs, s'observa l'halo d'inhibició del creixement dels bacteris que s'ha format al voltant de cada pastilla. El que té l'halo amb el diàmetre més gran correspon a l'antibiòtic més efectiu (Fig. 5).

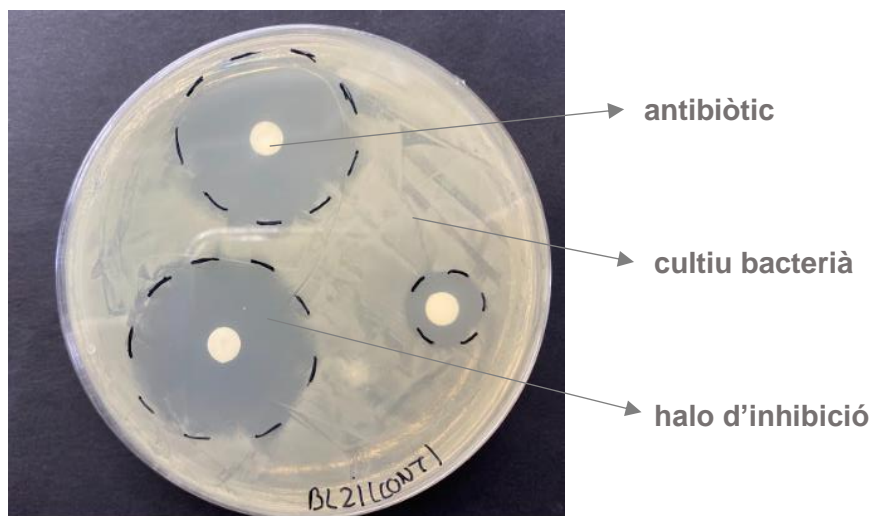


Fig. 5: Antibiograma

5.2. L'ESPECTROFOTÒMETRE

Un espectrofotòmetre és un aparell de mesura usat en física òptica que serveix per mesurar, en funció de la longitud d'ona, l'espectre d'absorció d'una mostra de matèria.

En laboratoris de química i bioquímica, l'espectrofotòmetre s'utilitza per a la quantificació de substàncies i microorganismes, ja que té la capacitat de projectar un feix de llum monocromàtica a través d'una mostra i mesurar la quantitat de llum que es absorbeix per aquesta (Fig. 6).

En el meu cas, l'espectrofotòmetre es va utilitzar per mesurar la variació de la quantitat de dos microorganismes (bacteris i llevats) durant un període de temps determinat i sota unes condicions concretes. D'aquesta manera es va poder determinar el creixement de cada un dels microorganismes sota les condicions establertes.

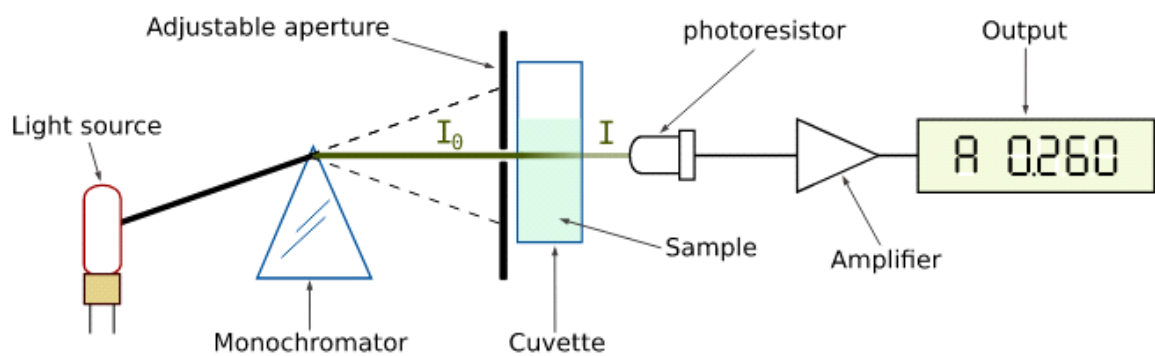


Fig 6: Funcionament de l'espectrofotòmetre

Font: <https://upload.wikimedia.org/>

6. ANTIMICROBIANS VEGETALS

Des de l'antiguitat, moltes plantes han estat utilitzades com a remei per a diverses patologies. Estudis sobre l'activitat antimicrobiana d'extractes i olis essencials de diversos vegetals demostren l'efectivitat d'aquests envers alguns bacteris i fongs. Aquest ús amb finalitat terapèutica de les plantes, s'anomena fitoteràpia i es pot considerar una de les formes de medicina més antiga.

6.1. EL TIMÓ

El timó o farigola és una planta semiarbust i molt aromàtica de lligues llenyoses a la base i tiges verdes superiors, l'alçària de la qual pot variar entre els 15 i 30 centímetres.

Pertany a la família de les Labiades i n'existeixen varies espècies. En aquest cas em centro, únicament, amb l'anomenat *Thymus vulgaris*.

La composició química del seu oli essencial, extret per destil·lació amb vapor d'aigua, està formada, principalment, per: cimè, dipentè, borneol, linalol, acetat de bornil i fenols, aquests en un 25%. D'entre els fenols cal destacar el timol¹⁶ (Fig. 7) i el carvacrol¹⁷(Fig. 8), ja que a part de ser els més abundants, són els que atorguen propietats antibacterianes i antifúngiques a aquesta essència.

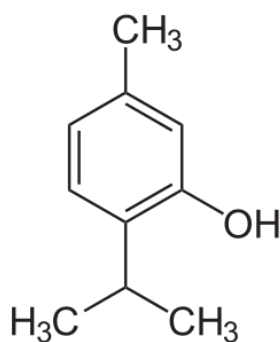


Fig.7: Timol

Font: <https://static.cymitquimica.com/>

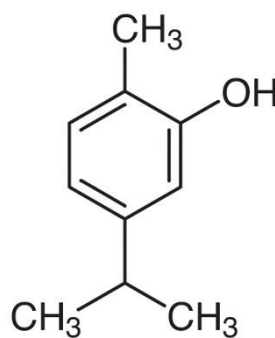


Fig.8: Carvacrol

Font: <https://institutbroggi.org/>

¹⁶ **Timol:** Compost fenòlic present als olis de farigola i alguns altres olis essencials.

¹⁷ **Carvacrol:** Compost fenòlic derivat del cimè present en olis essencials com els d'orenga i farigola i que presenta una gran efectivitat antifúngica i antibacteriana.

6.2. L'ORENGA

L'orenga és una planta herbàcia, de fulla perenne i aspecte llenyós, les fulles de la qual creixen al voltant d'una tija que pot arribar als 80 centímetres d'alçada.

Igual que el timó, pertany a la família de les Labiades i forma part del gènere *Origanum*, que compren unes set espècies. En el meu cas em centro amb l'espècie *Origanum vulgare*.

La composició química del seu oli essencial inclou, en major proporció, els fenols carvacrol i timol a més d'alfa-pinè, cimè i alguns terpens.

6.3. ELS OLIS ESSENCIALS

Segons l'IEC, un oli essencial o essència és una substància volàtil olorosa extreta d'una planta. Generalment, els olis essencials es troben en les fulles, les flors, les llavors i els fruits de les plantes. Es caracteritzen per la complexitat en la seva composició química, encarregada d'atorgar les propietats a una essència, i pel seu caràcter fortament aromàtic.

Els olis essencials s'extreuen de les plantes a través de diversos mètodes d'obtenció com per exemple poden ser la destil·lació per arrossegament amb vapor d'aigua, l'extracció a base de solvents orgànics volàtils, entre altres formes.

- **Destil·lació per arrossegament amb vapor**

La destil·lació per arrossegament amb vapor d'aigua és un tipus de destil·lació que permet la separació de substàncies insolubles en aigua i lleugerament volàtils a partir d'altres productes no volàtils. Està especialment indicada per a la separació de molècules orgàniques sensibles a la temperatura d'un component no volàtil, ja que el procés es du a terme a una temperatura relativament baixa.



→ zona de condensació

→ zona de recollida

Fig.9: Aparell de destil·lació

Per a poder realitzar aquesta separació, es fa passar una corrent de vapor (normalment d'aigua) per la substància inicial que arrastra els compostos en qüestió. La barreja de vapor amb els compostos viatja fins a un condensador que disminueix la seva temperatura i aconsegueix que condensi fins a un estat líquid. D'aquesta manera, l'essència que formen els compostos queda separada de l'aigua degut a les seves propietats hidròfobes i pot ser recollida (Fig. 9).

6.4. CROMATOFRAFIA EN CAPA FINA

La cromatografia en capa fina és una tècnica cromatogràfica que utilitza una placa (fase estacionària) immersa en un eluent¹⁸ (fase mòbil) i serveix per a la detecció dels diferents components d'una mostra. Depenent de l'eluent que s'empri al llarg de la prova es podran detectar uns components o uns altres.

En el meu cas m'interessa detectar els compostos fenòlics timol i carvacrol entre altres compostos terpenoides¹⁹ dels olis essencials extrets, per això l'eluent adequat és el toluè. Per a poder realitzar aquesta detecció es dilueixen els olis a analitzar en un dissolvent orgànic i es distribueixen, ordenadament, a la placa que tot seguit s'introdueix en una cubeta on hi ha la fase mòbil. Aquesta ascendeix per capil·laritat per la placa i arrastra els compostos al llarg de la placa. Quan s'arriba al final es retira la placa de la cubeta i el dissolvent present en ella s'evapora (fase mòbil), de manera que només queda a la placa la mostra a analitzar.

L'anàlisi es fa en base a un patró establert que permet identificar l'equivalent a cada compost (veure annex 1).

Els compostos terpenoides són les substàncies químiques que donen, als olis essencials, les característiques pròpies que determinen la seva activitat.

¹⁸ **Eluent:** Dissolvent emprat en una elució, procés que consisteix en la separació, per rentatges progressius, de les substàncies adsorbides.

¹⁹ **Terpenoides:** Denominació genèrica que inclou als terpens i als seus derivats

PART PRÀCTICA

7. MATERIALS I MÈTODES

7.1. DESTIL·LACIÓ DELS OLIS ESSENCIALS

En primer lloc, com ja he mencionat anteriorment, realitzaré una destil·lació per arrossegament amb vapor d'aigua per poder obtenir, de forma casolana, dos dels olis essencials (d'orenga i timó) que utilitzaré al llarg del treball.

L'objectiu principal d'aquest primer experiment és poder obtenir i crear els olis essencials per poder conèixer com es realitza la seva producció i poder comparar el seu efecte amb altres olis comercials, teòricament, iguals.

APARELLS I PRODUCTES

- Aparell de destil·lació
- Matràs de fons rodó de 500 mL
- Porcellana porosa
- Proveta de 250 mL
- Picadora elèctrica
- Balança
- Flascons comptagotes (5 mL)
- 215 g de timó sec (*Thymus vulgaris*)
- 143 g d'orenga sec (*Origanum vulgare*)
- Aigua destil·lada (2L aprox.)

		D1	D2	D3	D4
TIMÓ	PLANTA	55 g	60 g	50 g	50 g
	AIGUA	220 mL	230 mL	250 mL	250 mL
ORENGA	PLANTA	36 g	36 g	40 g	31 g
	AIGUA	250 mL	250 mL	250 mL	250 mL

Taula 1: Quantitats de productes utilitzades en cada destil·lació (Degut a la falta d'una guia que establís les quantitats necessàries de productes a l'hora de destil·lar, vaig utilitzar diferents quantitats en cada destil·lació per poder trobar aquella que s'ajustés millor; D=destil·lació).

PROCEDIMENT

Seguiré el mateix procés per a l'extracció dels dos olis essencials. En el cas de totes dues espècies s'utilitza només les flors i fulles assecades, eliminant les tiges i la resta de parts.

- Per a iniciar l'experiment comprovarem que l'aparell a utilitzar estigui net i en bones condicions i el muntarem de la següent manera (Fig. 10 i 11) :

Sostindrem l'aparell de vidre en un suport vertical utilitzant una pinça de tal manera que puguem adaptar el matràs a l'entrada A i l'aparell quedi completament vertical. És important que l'aparell es trobi prop d'una font d'aigua.

Mitjançant un tub de goma de làtex, connectarem l'aparell a una sortida d'aigua a temperatura ambient per l'obertura C i n'afegirem un altre a l'obertura D que ens en permetrà la sortida d'aquesta.

La clau de tres vies, situada a la zona E, mantindrà connectades les zones F i G, però bloquejarà la sortida dels líquids per la zona H.

Introduïrem aigua destil·lada pel tub d'emplenament B fins que rebossi a la zona I.

A l'iniciar el procediment, obrirem la font d'aigua que permetrà la circulació d'aquesta pel llarg de l'aparell. La mantindrem oberta durant tot el procediment.



Fig.10: Aparell de destil·lació

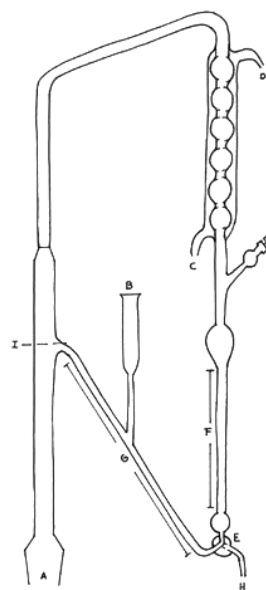


Fig.11: Esquema d'un aparell de destil·lació

- En segon lloc, en un matràs de fons rodó d'una capacitat de 500mL, afegirem una quantitat determinada d'una de les plantes (veure taula 1), prèviament picada en una picadora elèctrica. En aquest, també afegirem porcions de porcellana porosa²⁰ i aigua destil·lada amb l'ajuda d'una proveta (Fig. 12).
- Seguidament, adaptarem l'aparell de destil·lació al matràs per la zona A i el situarem dins l'aparell de calefacció que l'encendrem al màxim i, en el moment que bulli el contingut, el baixarem al mínim per tal de mantenir la temperatura constant durant tot el procés.
- Deixarem passar mitja hora per poder destil·lar tot l'oli essencial que es troba a la planta que hem introduït inicialment i, passat aquest temps, canviarem el contingut del matràs i repetirem el mateix procés quatre vegades per planta²¹.
- Una vegada finalitzades les quatre destil·lacions, observarem que l'oli que se'ns ha format es troba a la zona F immiscible amb l'aigua (Fig. 13 i 14). Per obtenir-lo, obrirem la clau de tres vies de manera que permeti la sortida del contingut de l'aparell per la zona S. Primer deixarem sortir l'aigua acumulada i, una vegada haguem arribat a l'oli, l'acumularem en un flascó comptagotes que situarem sota la sortida S que, més endavant, etiquetarem amb la informació pertinent.



Fig.12: Picada del timó



Fig.13: Oli essencial d'orenga



Fig.14: Oli essencial de timó

²⁰ La porcellana porosa evita que les bombolles que sorgeixen de l'ebullició del contingut del matràs pugin fins a l'aparell.

²¹ Les destil·lacions es realitzen per separat, important no mesclar les plantes dins l'aparell.

7.2. PROVES MICROBIOLÒGIQUES

Continuaré la investigació amb la preparació de dues proves microbiològiques que tenen com a objectiu comprovar la sensibilitat de diversos microorganismes (dos bacteris i dos fongs) a diferents olis essencials. D'aquesta manera podré obtenir una sèrie de dades que em permetran confirmar o refutar la hipòtesi.

Aquestes proves, a més, permetran comparar l'efecte dels dos olis essencials produïts en l'apartat anterior amb l'efecte de dos olis comercials de les mateixes espècies de plantes.

APARELLS I PRODUCTES

- 26 plaques de Petri
- 2 plaques d'espectrofotòmetre de 96 pouets
- pipetes mecàniques (1000-100µL / 200-20µL / 100-2µL)
- puntes per a pipetes
- tubs d'assaig amb rosca i gradetes
- bec de bunsen
- espàtula de drigalsky per a cultiu
- 80 paperets (0,5mm)
- tubs d'Eppendorf (1mL)
- espectrofotòmetre
- cubetes d'espectrofotòmetre
- ampil·lina 1000x
- geneticina 400x
- cloramfenicol 1000x
- oli microscopi
- oli essencial d'orenga comercial
- oli essencial d'orenga casolà (apartat 1.1.)
- oli essencial de timó comercial
- oli essencial de timó casolà (apartat 1.1.)
- 16 g de medi sòlid LB
- 40 g de medi sòlid YPD
- 32 g d'agar-agar
- 1,6 mL de NaOH
- aigua destil·lada (1,6L aprox.)
- cultiu d'E. Coli DH5α
- cultiu d'E. Coli BL21
- cultiu de S. Cerevisiae (BY4741)
- cultiu de S. Cerevisiae (YJM789)
- medi líquid esterilitzat LB
- medi líquid esterilitzat YPD
- etanol

PROVA 1: ANTIBIOGRAMES

PROCEDIMENT

Per a les següents proves microbiològiques treballarem sempre en un entorn esterilitzat, ja sigui dins una campana extractora o a la vora d'un bec de bunsen i establirem uns controls positius i negatius que serviran com a punt de comparació a l'hora d'analitzar els resultats.

PREPARACIÓ DE LES PLAQUES DE CULTIU

Prepararem 12 plaques amb medi YPD (llevats) i 12 plaques amb medi LB (bacteris).

- Per a les plaques YPD dissoldrem, en un matràs erlenmeyer de 2L, 40g de medi YPD sòlid juntament amb 16g d'agar en 800mL d'aigua i, seguidament, neutralitzarem la dissolució amb 800 μ L de NaOH²².
- Per a les plaques LB dissoldrem, en un altre matràs de 2L, 16g de medi LB sòlid juntament amb 16g d'agar en 800mL d'aigua i neutralitzarem la dissolució amb 800 μ L de NaOH.
- Tot seguit, taparem els matrassos respectius amb paper d'alumini i els portarem a l'autoclau durant mitja hora per tal d'esterilitzar el contingut de l'interior.
- Passada la mitja hora, retirarem els matrassos i passarem a plaquejar les plaques de petri. Plaquejarem 12 plaques amb medi YPD i 12 més amb medi LB. Aquest procés el durem a terme dins una campana extractora per evitar la contaminació de les plaques i els medis, ja que podria resultar perjudicial a l'hora d'analitzar els resultats.
- Una vegada plaquejades totes les plaques, deixarem passar una nit per tal de deixar solidificar el medi i poder treballar correctament el dia següent.



Fig.15: Abocament del medi LB a una placa

²² NaOH: Hidròxid de sodi

PREPARACIÓ DELS ANTIBIOGRAMES

- En primer lloc, medirem la concentració inicial dels cultius en medi líquid dels quals partim mitjançant un espectrofotòmetre que ens permetrà calcular el valor d'absorbància inicial (mesurat en OD, densitat òptica) de cada cultiu. Per aquesta mesura prepararem:
 - Dues cubetes d'espectrofotòmetre d'1mL plenes dels medis líquids amb els quals treballarem (LB per als bacteris i YPD per als llevats).
 - Dues cubetes per als bacteris que contindran 0,9mL de medi LB líquid i 0,1mL del cultiu inicial (cultiu d'E.Coli DH5 α en una i d'E.Coli BL21 en l'altra).
 - Dues cubetes per als llevats que contindran 0,9mL de medi YPD líquid i 0,1mL del cultiu inicial (cultiu de llevats BY en una i de llevats YJM en l'altra).

Per a la mesura de les concentracions introduïrem les cubetes dins la màquina de forma ordenada (medi LB, LB + DH5 α , LB + BL21, medi YPD, YPD + BY, YPD + YJM).

La OD obtinguda per als medis de cultiu que es troben sense microorganismes serà el que s'estableix com a 0, ja que no són completament transparents (veure taula 2).

CULTIU (medi + microorganisme)	VALOR D'ABSORBÀNCIA INICIAL [OD]
DH5 α	0,119
BL21	0,154
BY	0,033
YJM	0,158

Taula 2: OD (densitat òptica, "optical density") dels cultius inicials

- Seguidament diluïrem els cultius inicials fins a una OD de 0,1 per a obtenir la mateixa concentració a totes les dilucions amb les que treballarem.

La determinació del volum necessari dels cultius inicials la farem mitjançant la fórmula següent: $C_0 \cdot V_0 = C_f \cdot V_f$; sent C_0 , la concentració de la dissolució inicial; V_0 , el volum necessari de dissolució inicial (incògnita, marcada en gris a la taula 3); C_f , la concentració final que volem obtenir (0,1 OD) i V_f , el volum de dilució que volem preparar (5mL, en el nostre cas).

Els volums de dissolució inicial necessaris seran els següents: TAULA 3

CULTIU	C ₀ (OD)	V ₀ (μL)	C _f (OD)	V _f (μL)
DH5α	0,119	4202	0,1	5000
BL21	0,154	3247	0,1	5000
*BY	0,033	17500	0,1	5775
YJM	0,158	1835	0,1	5000

Taula 3: Volums necessaris dels cultius inicials i concentració a obtenir

**Observem que en el cas del cultiu de BY la concentració inicial és inferior a 0'1, per tant, s'haurà de concentrar la dissolució inicial, obtenint més volum final (explicació del procés que hem realitzat en l'apartat 2.3.).*

- Una vegada hem determinat el volum necessari de cultiu inicial (veure taula 3), passarem a preparar els 5mL de dilució de concentració 0,1 (exceptuant el cultiu de BY). En tubs d'assaig prèviament marcats amb el nom del cultiu que contenen, afegirem, amb l'ajuda d'una pipeta, els volums necessaris de les dissolucions inicials. Tot seguit, omplirem fins a 5mL amb el medi de cultiu líquid corresponent per a cada microorganisme.

En el cas del cultiu de BY, com que la OD inicial no supera el 0'1, haurem de concentrar la dissolució. Per a realitzar aquest procés haurem d'extreure medi però evitant l'extracció de cèl·lules. Per fer-ho possible, centrifugarem la dissolució a 300rpm de manera que totes les cèl·lules es concentraran a la part inferior del tub d'assaig i, podrem prosseguir a l'extracció de medi. Amb l'ajuda d'una pipeta mecànica, aspirarem de la part superior de la dissolució la diferència entre el volum inicial i el final (que com podem comprovar a la taula 3 no en donarà exactament 5mL de dilució). Una vegada extreta aquesta quantitat haurem obtingut la dilució 0,1.

- Preparades les dilucions necessàries passarem a cultivar les plaques de petri preparades en l'apartat 1. Plaquejarem 6 plaques amb cada dilució tenint en compte que les plaques que contenen medi LB estaran cultivades pels dos bacteris i les plaques que contenen medi YPD, pels dos llevats. Ho farem de la següent manera:
 - Abans de començar a afegir els microorganismes anomenarem, amb un retolador, l'espècie que contindrà cada placa (Fig. 17).

- A cada placa pipetejarem 200µL del cultiu diluït del microorganisme que li correspon i l'estendrem damunt del medi gelificat amb l'ajuda d'una espàtula de vidre esterilitzada en alcohol (Fig. 16).



Fig.16: Plaqueig d'una placa amb un dels cultius d'E.Coli



Fig. 17: Esquema de les plaques

- El següent pas serà afegir els antibiòtics i els olis essencials a les plaques per a crear els antibiogrames. Per fer-ho, distribuïrem sobre plaques de vidre, paperets estèrils de 0,5cm de diàmetre on hi pipetejarem 10µL d'antimicrobià o oli. Seguidament anomenarem i distribuïrem els paperets per les plaques (veure taula 4) que tindran una rèplica per tal de poder descartar resultats il·lògics si n'és el cas.

ESPÈCIES	AB. CONTROL	AB. TIMÓ	AB. ORENGA	
DH5α I BL21				A: ampicil·lina G: geneticina C: cloramfenicol O.E. T1: timó comercial O.E. T2: timó casolà O.E. O1: orenga comercial O.E. O2: orenga casolà O: oli de microscopi
BY I YJM				

Taula 4: Distribució dels antibiòtics i olis essencials als antibiogrames

- Una vegada distribuïts els antibiòtics i olis a estudiar, deixarem passar 15h fins a la recollida de dades. D'aquesta manera, els microorganismes creixeran i es podran apreciar els halos d'inhibició si l'antibiòtic o oli és efectiu. El repòs es farà en unes estufes que mantindran els cultius a unes temperatures determinades que seran 30° per als llevats i 37° per als bacteris.

PROVA 2: ESPECTROFOTÒMETRE

PROCEDIMENT

En aquesta part, haurem de preparar dos plaques d'espectrofotòmetre formades per 96 pous de 200µL cada una. Per a comprovar l'efectivitat, a cada pou afegirem 100µL d'una dilució de cultiu inicial rebaixat a una OD de 0,05 i 100µL d'una dissolució d'antibiòtic o oli essencial i medi en dos concentracions diferents. D'aquesta manera podrem comparar l'efectivitat dels antibiòtics i els olis en diferents concentracions.

- Com que vam realitzar les dues proves en temps diferents i era possible que la concentració dels cultius inicials hagués variat significativament, el primer pas, va ser mesurar de nou la OD dels cultius (veure taula 5) mitjançant el mateix procediment que en el pas 2.1. de la prova 1.

CULTIU (medi + microorganisme)	VALOR D'ABSORBÀNCIA INICIAL [OD]
DH5α	0,111
BL21	0,104
BY	0,187
YJM	0,251

Taula 5: OD dels cultius inicials

- Seguidament, passarem a la preparació de les dilucions de diferents concentracions de la mateixa manera que hem preparat les de l'apartat anterior. En aquest cas, només prepararem 1mL de cada una i les posarem dins de tubs Eppendorf prèviament anomenats. Les quantitats necessàries de dissolució inicial i antibiòtic per a cada dilució seran les següents (taula 6):

DILUCIONS		C ₀ [OD]	C _i [OD]	V ₀ [µL]	V _i [µL]
medi + microorganisme (fer per les dos espècies)	DH5	0,111	0,05	450	1000
	BL21	0,104	0,05	481	1000
	BY	0,187	0,05	267	1000

	YJM	0,251	0,05	200	1000
medi LB + ampicil·lina		1000x	1x (100µg/mL)	2	1000
		1000x	0,5x (50µg/mL)	1	1000
medi YPD + geneticina		400x	1x (250µg/mL)	5	1000
		400x	0,5x (125µg/mL)	2,5	1000
medi + O.E. timó comercial	considerem que la concentració de principis actius en els olis essencials és la màxima, ja que no coneixem la real		1x	10	1000
			0,5x	5	1000
medi + O.E. timó casolà			1x	10	1000
			0,5x	5	1000
medi + O.E. orenga comercial			1x	10	1000
			0,5x	5	1000
medi + O.E. orenga casolà			1x	10	1000
			0,5x	5	1000

Taula 6: Concentracions i volums necessaris per a la preparació dels espectrofotòmetres

NOTA: Prepararem dos dilucions amb cada oli essencial, una amb medi LB i l'altra amb medi YPD.

- Seguidament, omplirem els pous de les plaques amb 100µL de dilució de medi i cultiu inicial de concentració 0,05 i 100µL de dilució de medi i antibiòtic o oli essencial a dos concentracions diferents (1 i ½). Ho farem seguint la plantilla següent (Fig. 18), on:
 - + : control positiu (ampicil·lina per als bacteris i geneticina per als llevats)
 - : control negatiu (només medi amb cultiu inicial reduït a OD 0,05)
 - T1: dilució de medi amb O.E. de timó comercial
 - T2: dilució de medi amb O.E. timó casolà
 - O1: dilució de medi amb O.E. d'orenga comercial
 - O2: dilució de medi amb O.E. d'orenga casolà
 - 0: medi sol que establirem com a valor 0

[1]: dilucions de concentració 1x

[1/2]: dilucions de concentració la meitat respecte l'anterior

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	+	+ [1]	+ [1]	T1 [1]	T1 [1]	T2 [1]	T2 [1]	O1 [1]	O1 [1]	O2 [1]	O2 [1]	0
C	+	+ [1/2]	+ [1/2]	T1 [1/2]	T1 [1/2]	T2 [1/2]	T2 [1/2]	O1 [1/2]	O1 [1/2]	O2 [1/2]	O2 [1/2]	0
D	-	-	-	T1 [1]	T1 [1/2]	T2 [1]	T2 [1/2]	O1 [1]	O1 [1/2]	O2 [1]	O2 [1/2]	0
E	+	+ [1]	+ [1]	T1 [1]	T1 [1]	T2 [1]	T2 [1]	O1 [1]	O1 [1]	O2 [1]	O2 [1]	0
F	+	+ [1/2]	+ [1/2]	T1 [1/2]	T1 [1/2]	T2 [1/2]	T2 [1/2]	O1 [1/2]	O1 [1/2]	O2 [1/2]	O2 [1/2]	0
G	-	-	-	T1 [1]	T1 [1/2]	T2 [1]	T2 [1/2]	O1 [1]	O1 [1/2]	O2 [1]	O2 [1/2]	0
H	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Fig.18: Distribució dels microorganismes i les drogues a la placa de l'espectrofotòmetre. Cada color correspon a un microorganisme diferent de cada espècie

- Una vegada preparades les plaques les taparem i procedirem a introduir-les a l'espectrofotòmetre. Aquest realitzarà una mesura de la OD (densitat òptica) cada un interval de temps determinat (20 minuts en el cas dels bacteris i 30 minuts, en el dels llevats) i, d'aquesta manera ens determinarà el creixement de les cèl·lules durant el període de temps establert (13h). Aquestes mesures es faran a 30° en els llevats i a 37° en els bacteris. A més, la mateixa màquina anirà barrejant el contingut dels pous per tal de que aquest es mantingui homogeni.

7.3. CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

Per acabar d'obtenir les dades necessàries, realitzarem una cromatografia en capa fina, una prova química que consta d'una fase mòbil i d'una estacionària, mitjançant la qual podrem conèixer gran part dels compostos orgànics presents a la composició química dels olis essencials emprats al llarg de la recerca.

APARELLS I PRODUCTES

- | | | |
|---------------------------------|------------------------|---|
| - cubeta cromatogràfica | - comptagotes | - vainillina |
| - vasos de precipitats (10mL) | - làmpada ultravioleta | - etanol (alcohol etílic 96%) |
| - micropipetes | - espraiador | - olis essencials (emprats ens les proves 1 i 2 de l'apartat 1.2. i tres més de referència) |
| - 2 matrassos erlenmeyer (10ml) | - estufa i assecador | |
| - Balança | - àcid sulfúric (98%) | |
| - placa 20x20 de sílica-gel | - toluè | |
| | - proveta (10mL) | |
| | - èter etílic | |

PROCEDIMENT

- Iniciarem la prova preparant les dissolucions que serviran com a agent revelador al final de la prova. Les prepararem en un matràs erlenmeyer i les reservarem fins al final de la prova.
 - DISSOLUCIÓ 1: 50mL de dissolució d'etanol (47,5mL) al 5% en àcid sulfúric (2,5mL).
 - DISSOLUCIÓ 2: 50mL de dissolució d'etanol (≈50mL) a l'1% en vainillina (0,5mg).
- Tot seguit, preparem les dissolucions dels olis essencials a estudiar juntament amb uns olis que ens serviran com a referència a l'hora d'obtenir les dades. Per aquestes dissolucions posarem, dins de diferents vasos de precipitats prèviament anomenats amb l'espècie que contenen i amb l'ajuda d'una micropipeta, dos gotes de l'oli respectiu i, seguidament, amb l'ajuda d'un comptagotes, 20 gotes de toluè.

- Una vegada preparades les diferents dissolucions, ens assegurarem de que els olis s'hagin homogeneïtzat correctament amb el toluè i passarem a la preparació de la dissolució que contindrà la cubeta cromatogràfica (fase mòbil) que serà la següent: 7mL d'èter etílic en 93mL de toluè per obtenir un total de 100mL de dissolució. Aquesta l'afegirem a la cubeta cromatogràfica que taparem a l'instant.
- Seguidament, prepararem la placa de sílica-gel (fase estacionària) on es distribuiran les diferents essències a estudiar. La distribució serà la següent (Fig.19):

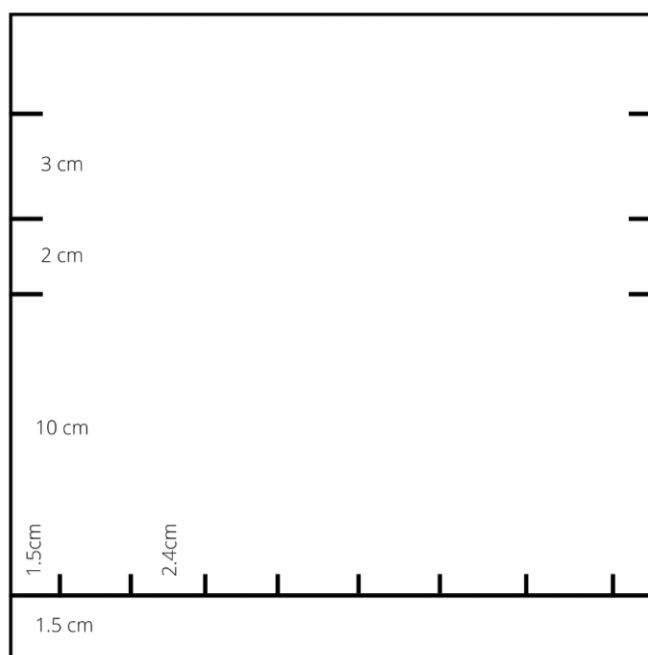


Fig.19: Distribució de la placa de sílica-gel

Anomenarem cada una de les divisions que hem realitzat a la línia inferior de la placa deixant clar l'oli que hi posarem.

- Una vegada preparada la placa, distribuïrem les dissolucions preparades al punt 2 a la seva zona corresponent. Per a fer-ho, posarem, al centre de cada divisió, 5 μ L de cada dissolució amb l'ajuda d'una micropipeta. És molt important que utilitzem una micropipeta diferent per a cada dissolució, d'aquesta manera evitarem que es contaminin les mostres.
- Seguidament, introduïrem la placa amb les mostres afegides dins la cubeta cromatogràfica. La situarem a una de les ranures de l'interior i la hi deixarem completament vertical. Esperarem uns minuts a que la dissolució de la cubeta ascendeixi per capil·laritat fins a la marca de 10cm que realitzada anteriorment.

- Una vegada assolida la marca, retirarem la placa i l'assecarem amb l'assecador per evitar que les taques s'expandeixin i es fusionin les unes amb les altres²³.
- Per a fer una primera observació de l'aspecte de la placa la sotmetrem a una làmpada de radiació ultravioleta a 254nm i 365nm (Fig. 20 i 21). Això en permetrà observar les diferents taques.

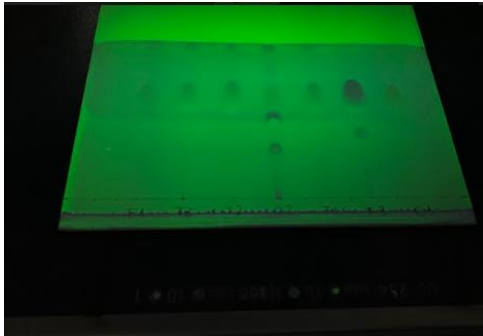


Fig.20: Aspecte de la cromatografia amb una radiació de 254nm

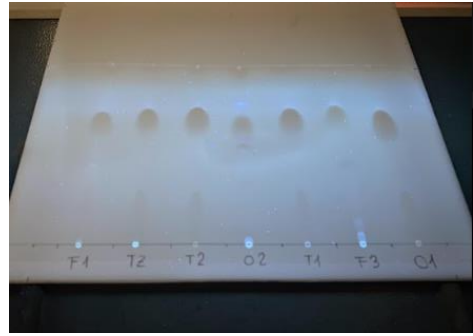


Fig. 21: Aspecte de la cromatografia amb una radiació de 365nm

- Per acabar, en un espai exterior i en una zona protegida, ruixarem la placa amb les dissolucions preparades al primer punt. Primer ho farem amb la dissolució d'àcid sulfúric i, seguidament, amb la de vainillina. Entre cada una, assecarem la placa amb l'assecador. Tot seguit, introduïrem la placa dins l'estufa a una temperatura de 105-110°C i la hi deixarem uns 15-20 minuts. Passat aquest temps, retirarem la placa i analitzarem els resultats obtinguts.

²³ En aquest moment encara no serà visible cap taca, tot i així, és important saber que hi és.

8. RESULTATS I ANÀLISI

Tots els resultats de les proves microbiològiques han estat analitzats en base a un grup control que ha permès comparar l'efectivitat dels diferents olis essencials en comparació a antimicrobians d'ús quotidià (grups control) que sabem que són efectius contra els bacteris i els llevats estudiats. A més, per a cada experiment s'ha tingut en compte una sèrie de variables que han fet que tots aquests es realitzessin sota les mateixes condicions.

VARIABLES DEPENDENTS

Temperatura de creixement dels microorganismes (37°C pels bacteris i 30°C pels llevats).

Concentracions d'antibiòtics i olis essencials.

Medis de cultiu (LB pels bacteris i YPD pels llevats).

Grups control (amplicil-lina, control positiu en bacteris; geneticina, control positiu en llevats i oli de microscopi, control negatiu en els dos casos).

VARIABLES INDEPENDENTS

Mostra de l'activitat antibacteriana i antifúngica dels olis essencials.

Per a determinar l'efectivitat dels diferents olis essencials mitjançant els resultats dels antibiogrames ens hem de fixar amb l'halo que s'ha format, en cas de ser efectiu, al voltant de cada paperet (impregnat amb els antibiòtics i olis). Com més gran sigui el radi d'aquest halo, més efectiu serà l'antibiòtic i l'oli (Fig. 22). D'aquesta manera, podrem obtenir resultats qualitatius que ens permetran comparar la sensibilitat dels diferents olis als microorganismes de forma visual.

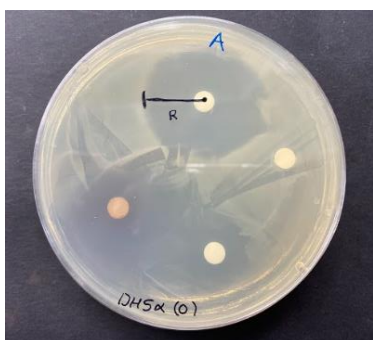


Fig.22: Mesura del radi dels halos d'inhibició

Per altra banda, l'espectrofotòmetre, dona resultats quantitatius, ja que mesura el creixement dels microorganismes mitjançant la variació de la densitat òptica dels cultius durant un període de temps determinat en intervals de 20 i 30 minuts. En aquest cas, si la OD dels cultius augmenta amb el temps, significa que l'essència és poc efectiva, perquè ens indica que els microorganismes s'han reproduït; mentre que si es manté constant o augmenta relativament poc, significa que l'antibiòtic i l'oli són efectius, ja que inhibeixen el creixement dels microorganismes.

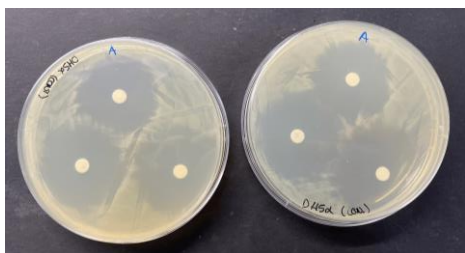


Fig.23: Antibiograma control de la soca d'E.Coli DH5α



Fig.25: Antibiograma control de la soca de S.C. BY

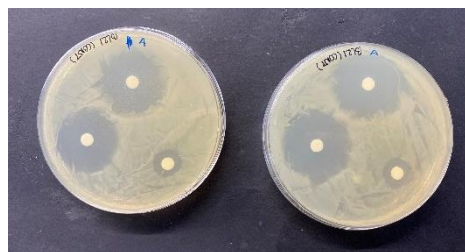


Fig.24: Antibiograma control de la soca d'E.Coli BL21

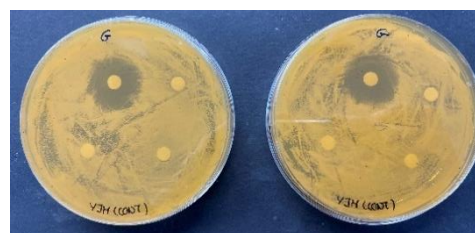
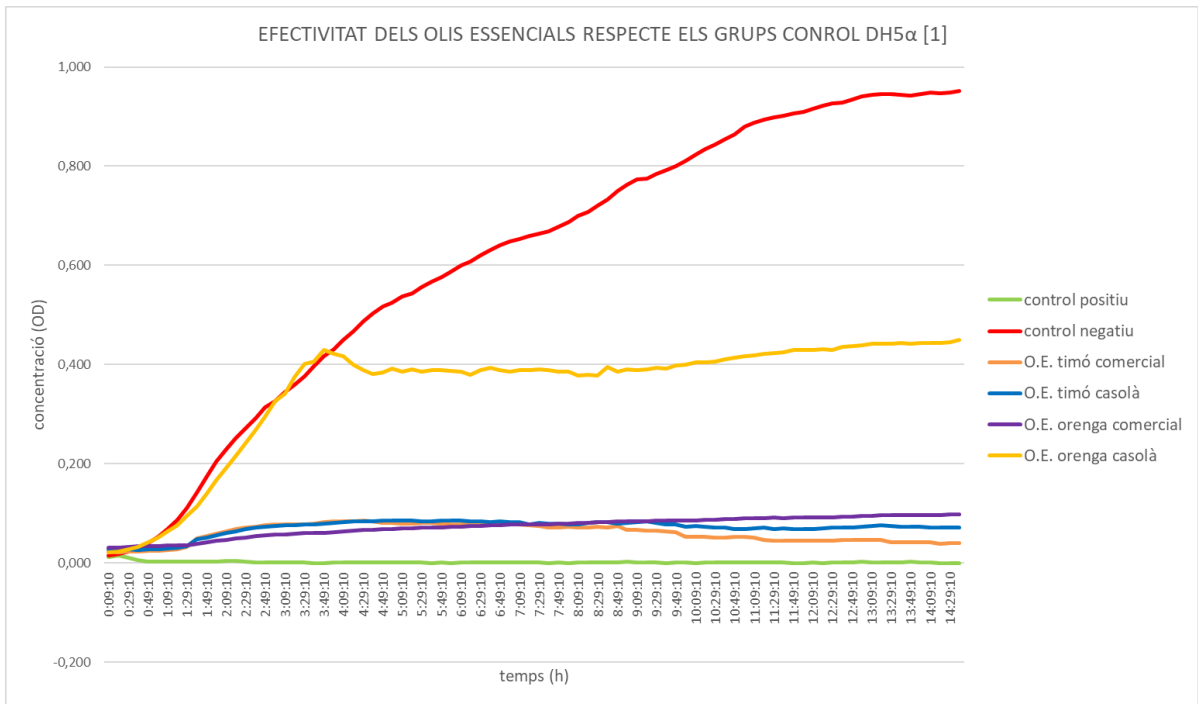


Fig.26: Antibiograma control de la soca de S.C. YJM

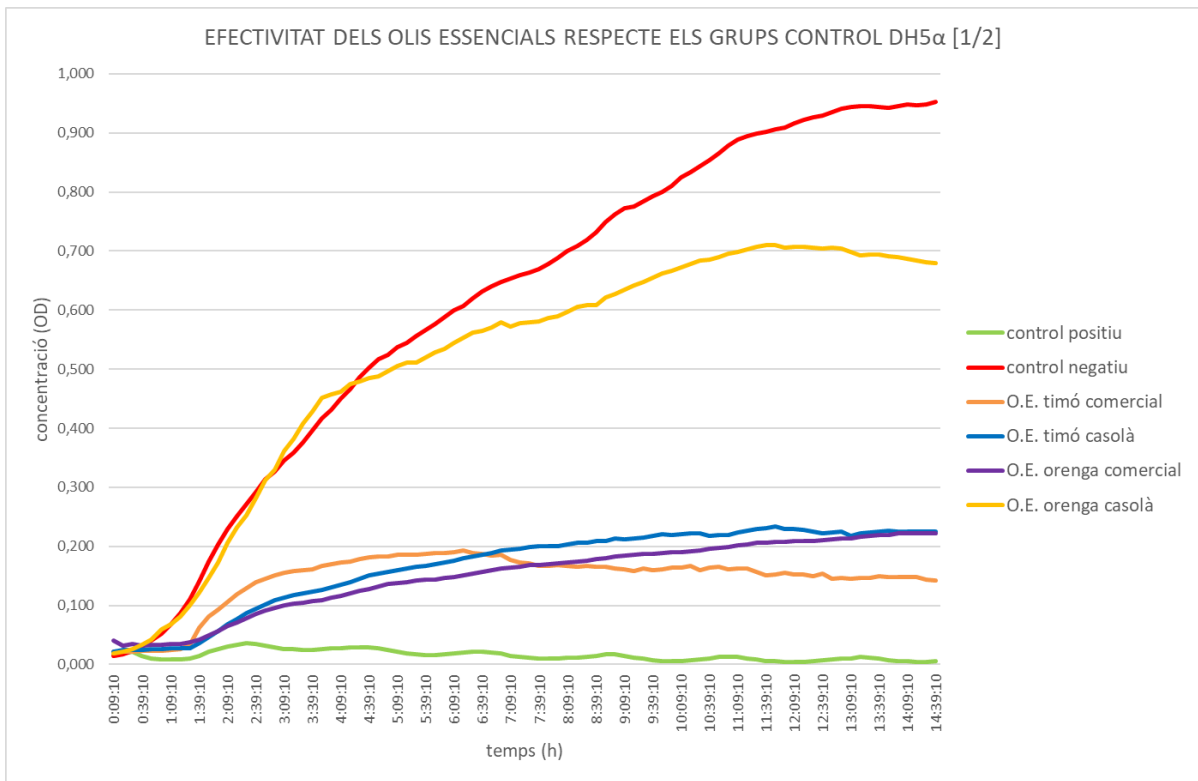
Els antibiogrames control (Fig. 23, 24, 25 i 26), que inclouen els controls positius en base als que es comparen els efectes dels diferents olis essencials, han permès diferenciar les espècies de microorganismes que s'han emprat al llarg de la pràctica (veure pàg. 29).

En primer lloc, observem que el cloramfenicol no té la mateixa efectivitat en les dos soques de bacteris utilitzades. Això es deu a que la soca d'E.Coli BL21 està modificada genèticament per tal de ser resistent a aquest antibiòtic. Per tant, amb això queda demostrat que s'ha utilitzat dos soques de bacteris diferents.

En segon lloc, si comparem l'efecte del cloramfenicol i l'ampicil·lina entre les espècies de bacteris i llevats, observem que en el segon cas aquests no tenen cap efecte significatiu, ja que es tracta d'antibiòtics i no antifúngics i, per tant, seran susceptibles a actuar contra els bacteris.



Gràfic 1: Efectivitat dels diferents olis essencials i grups control a la soca d'E.Coli DH5α



Gràfic 2: Efectivitat dels diferents olis essencials i grups control a la soca d'E.Coli DH5α

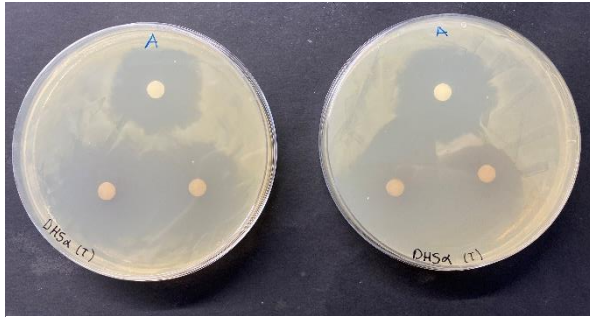


Fig.28: Antibiograma E.Coli DHα amb els olis essencials de timó

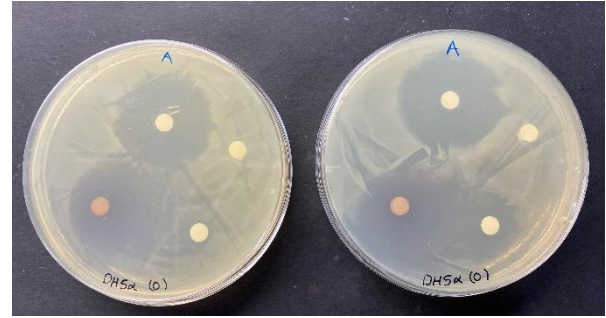
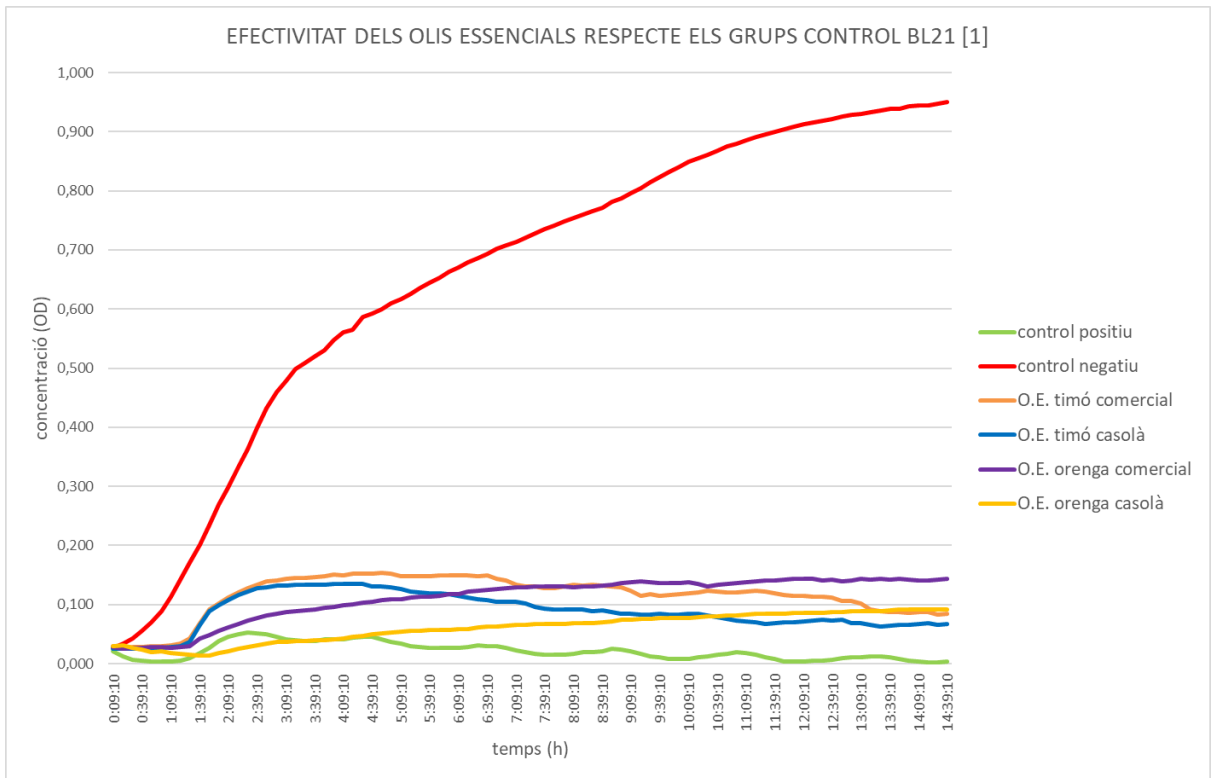


Fig.29: Antibiograma E.Coli DHα amb els olis essencials d'orenga

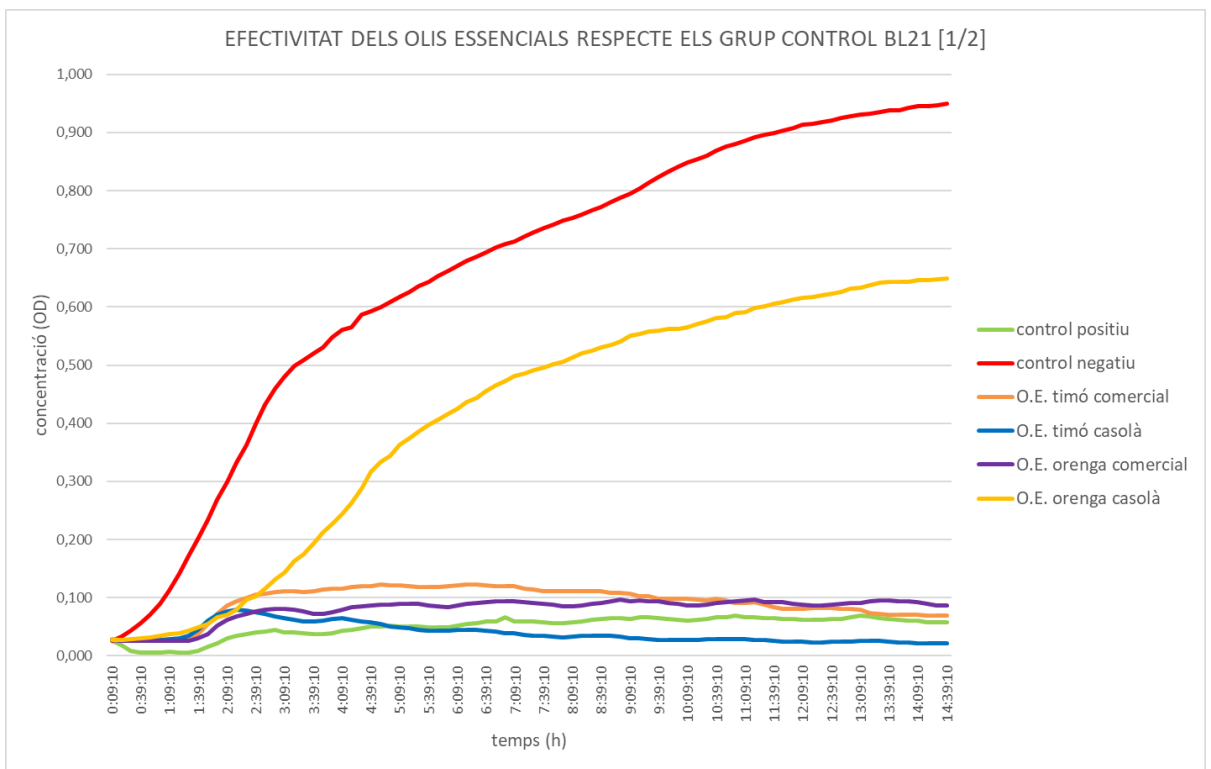
La distribució dels olis a la imatge 28 començant des de l'ampicil·lina (A) i amb el sentit de les agulles del rellotge és: ampicil·lina, oli essencial de timó casolà i oli essencial de timó comercial.

La de la imatge 29, també començant des de l'ampicil·lina és: ampicil·lina, oli de microscopi, oli essencial d'orenga casolà i oli essencial d'orenga comercial.

Els gràfics 1 i 2 i les imatges 28 i 29 mostren la sensibilitat de la soca d'E.Coli DH5α als diferents olis essencials estudiats. En aquest cas, podem veure que l'oli menys efectiu ha estat el d'orenga casolà; ja que si observem els gràfics, la corba que ascendeix més durant el pas del temps és la seva. A més, podem veure que els resultats dels antibiogrames i els del gràfic es corresponen, ja que l'halo de radi menor ha estat el que correspon a l'oli d'orenga casolà.



Gràfic 3: Effectivitat dels diferents olis essencials i grups control a la soca d'E.Coli BL21



Gràfic 4: Effectivitat dels diferents olis essencials i grups control a la soca d'E.Coli BL21

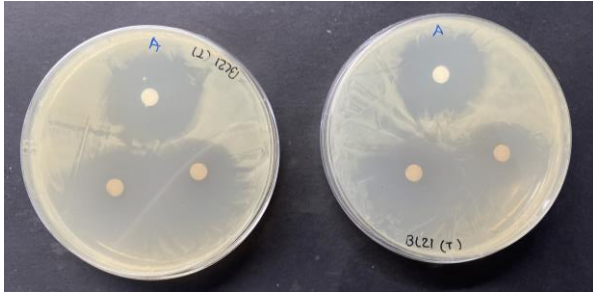


Fig.30: Antibiograma E.Coli BL21 amb els olis essencials de timó

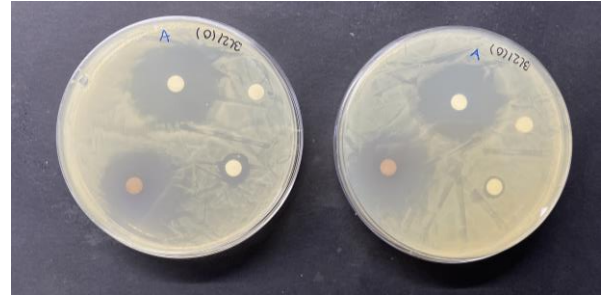
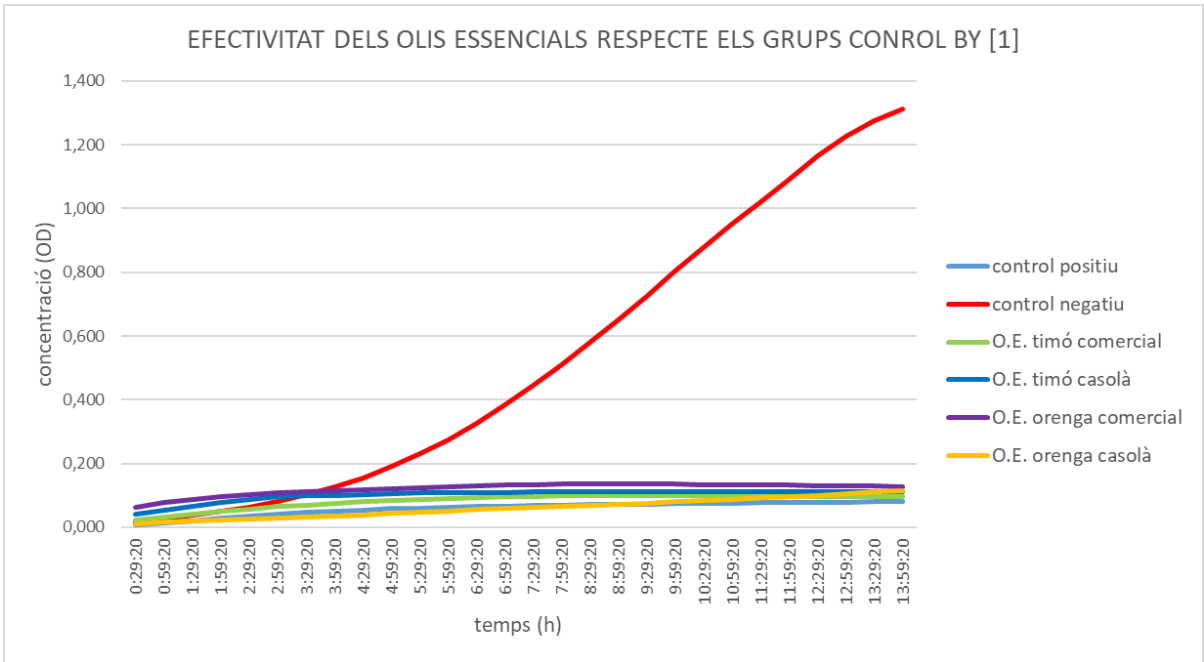


Fig.31: Antibiograma E.Coli BL21 amb els olis essencials d'orenga

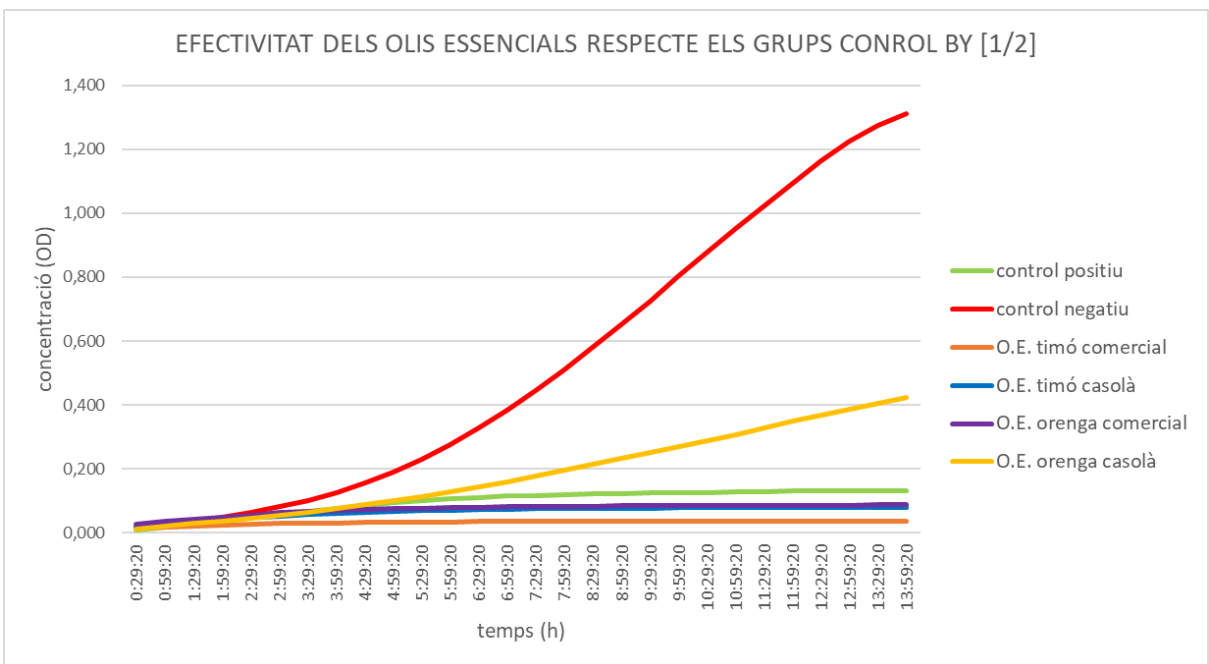
La distribució dels olis a la imatge 30 començant des de l'ampicil·lina (A) i amb el sentit de les agulles del rellotge és: ampil·lina, oli essencial de timó casolà i oli essencial de timó comercial.

La de la imatge 31, també començant des de l'ampicil·lina és: ampil·lina, oli de microscopi, oli essencial d'orenga casolà i oli essencial d'orenga comercial.

Els gràfics 3 i 4 i les imatges 30 i 31 mostren la sensibilitat de la soca d'E.Coli BL21 a les diferents essències. Als gràfics, sent la corba ocre la que correspon a l'oli d'orenga, podem veure que, de nou, torna a ser l'oli menys efectiu. Tot i així, en aquest cas, a una concentració d'1, es pot assegurar que el bacteri es mostra sensible contra aquest oli. De la mateixa manera que al cas anterior, els resultats de l'espectrofotòmetre es corresponen amb els dels antibiogrames.



Gràfic 5: Efectivitat dels diferents olis essencials i grups control a la soca de S.C. BY



Gràfic 6: Efectivitat dels diferents olis essencials i grups control a la soca de S.C. BY

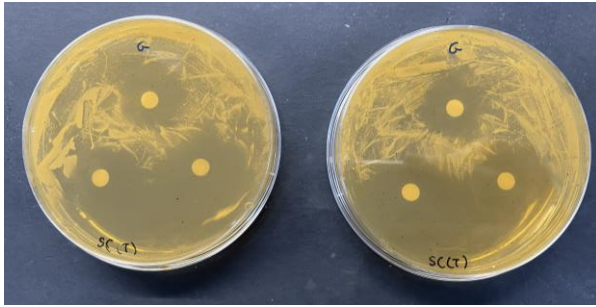


Fig.32: Antibiograma S.C. BY amb els olis essencials de timó

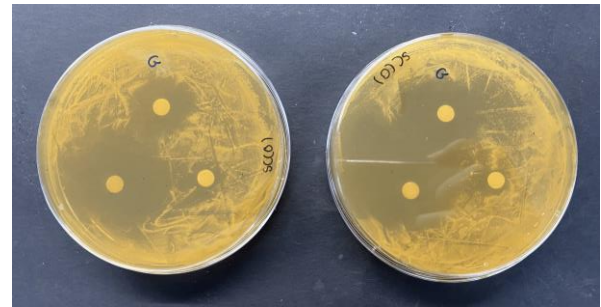
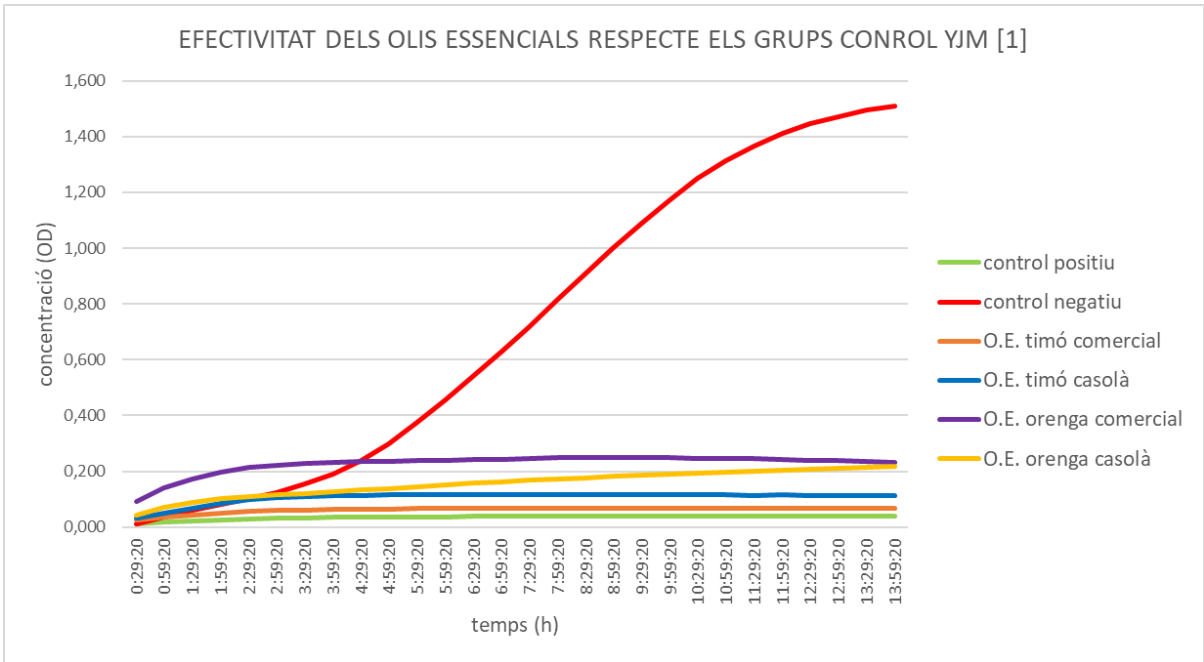


Fig.33: Antibiograma S.C. BY amb els olis essencials d'orenga

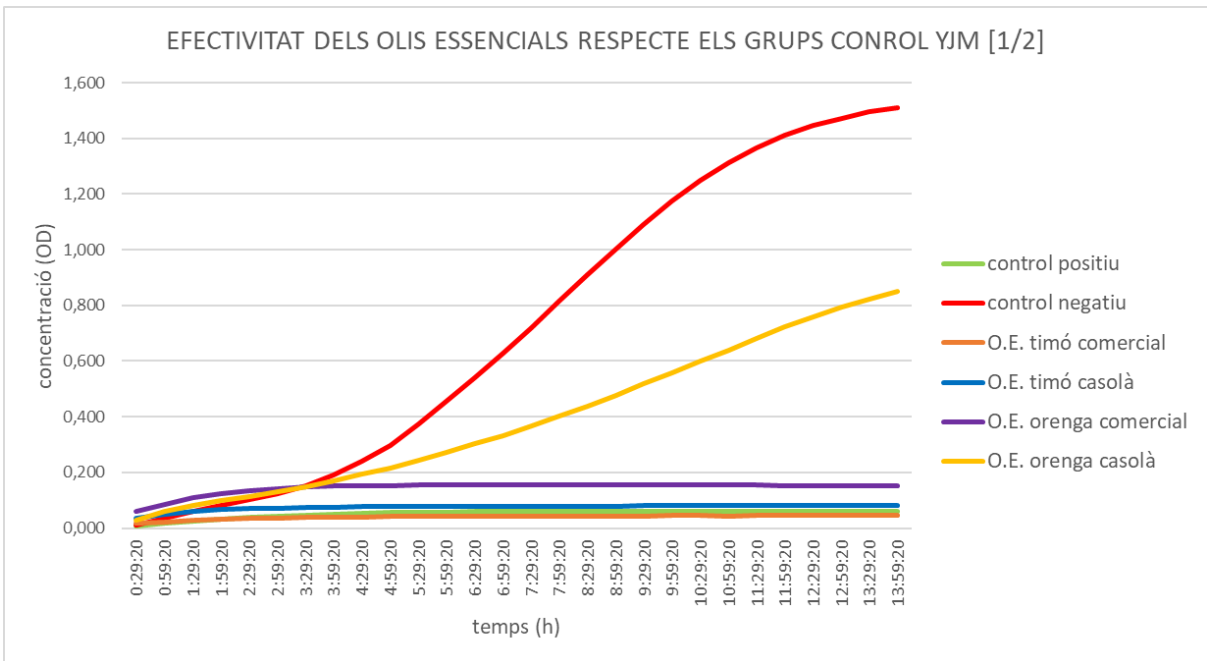
La distribució dels olis a la imatge 32 començant des de la geneticina (G) i amb el sentit de les agulles del rellotge és: geneticina, oli essencial de timó casolà i oli essencial de timó comercial.

La de la imatge 33, també començant des de la geneticina és: geneticina, oli essencial d'orenga casolà i oli essencial d'orenga comercial.

Els gràfics 5 i 6 i les imatges 32 i 33 mostren la sensibilitat de la soca del llevat *Saccaromissies Cerevisiae* BY. En aquest cas, podem veure que l'efectivitat dels diferents olis segueix el mateix patró que als dos casos anteriors; presentant una gran efectivitat totes les essències a excepció de la d'orenga casolana.



Gràfic 7: Efectivitat dels diferents olis essencials i grups control a la soca de S.C. YJM



Gràfic 8: Efectivitat dels diferents olis essencials i grups control a la soca de S.C. YJM

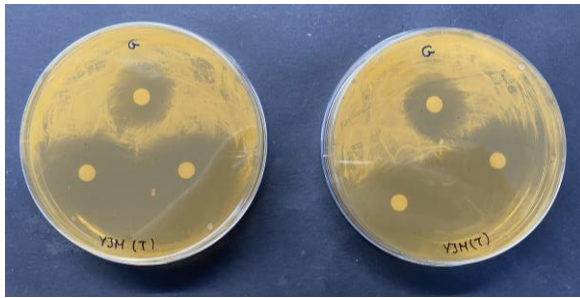


Fig.34: Antibiograma S.C. YJM amb els olis essencials de timó

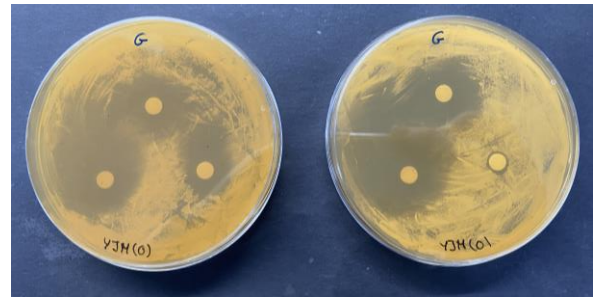


Fig.35: Antibiograma S.C. YJM amb els olis essencials d'orenga

La distribució dels olis a la imatge 34 començant des de la geneticina (G) i amb el sentit de les agulles del rellotge és: geneticina, oli essencial de timó casolà i oli essencial de timó comercial.

La de la imatge 35, també començant des de la geneticina és: geneticina, oli essencial d'orenga casolà i oli essencial d'orenga comercial.

Per acabar, els gràfics 7 i 8 i les imatges 34 i 35 mostren la sensibilitat de la soca de *Saccaromissies Cerevisiae* YJM als diferents olis. Com podem observar, aquest ha seguit el mateix patró que tots els anteriors i, de nou, l'oli essencial d'orenga casolà ha resultat el menys efectiu.

En resum, partint de la representació gràfica dels resultats obtinguts mitjançant la prova microbiològica de l'espectrofotòmetre, podem observar els efectes produïts pels diferents antibiòtics i olis essencials en un mateix microorganisme. En primer lloc, és important que diferenciem l'efecte dels grups control positiu (verd) i negatiu (vermell) de tots els casos, els quals es prenen com a punt de partida per estudiar la resta d'efectes.

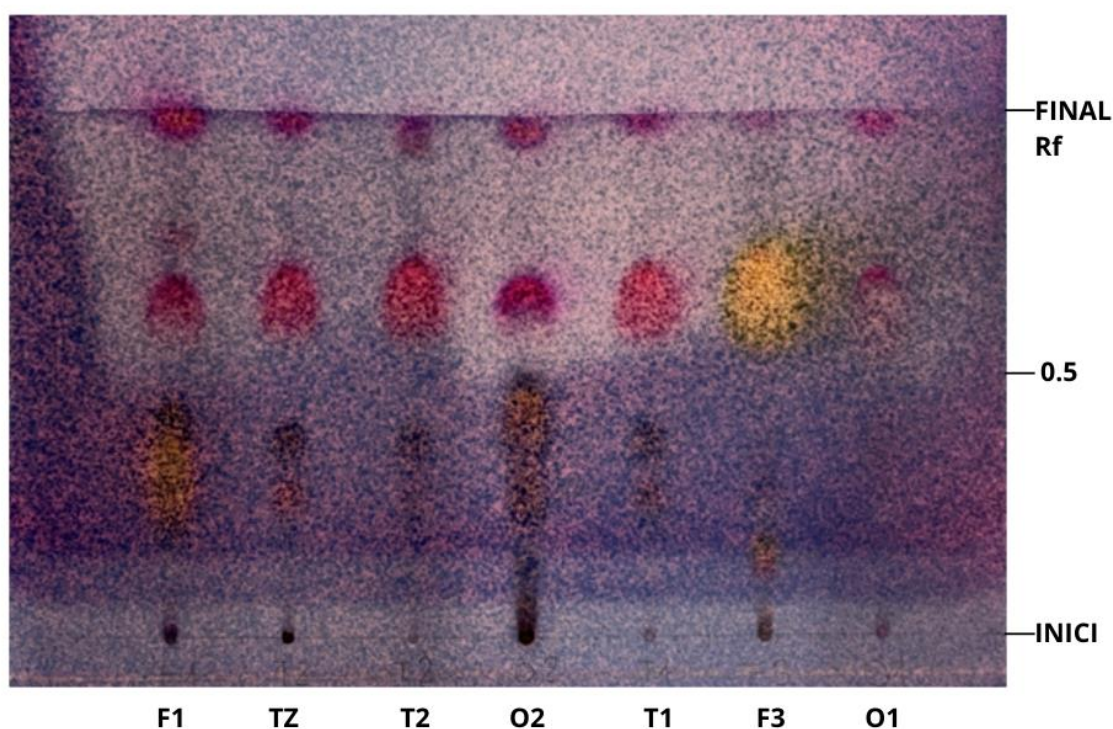
Per una banda, la concentració de cèl·lules (OD) del grup control negatiu, que no conté cap tipus d'antibiòtic, augmenta amb el pas de les hores. Això significa que les cèl·lules es reproduïxen. D'altra banda, la concentració de cèl·lules en el cas del control positiu es manté constant i en una concentració baixa en tots els casos, que vol dir que l'antibiòtic està inhibint el creixement d'aquestes.

A partir d'aquests controls podem deduir l'efecte dels olis essencials observant, de manera general, que el que presenta menor activitat antimicrobiana és l'oli d'orenga

produït artesanalment, mentre que la resta es mostren altament efectius en tots els microorganismes.

Si comparem els resultats amb els antibiogrames veiem que l'oli essencial menys efectiu és altra vegada l'oli d'orenga casolà, ja que és el que forma un halo d'inhibició amb el radi més petit.

Per a l'anàlisi de la cromatografia en capa fina s'han pres com a referència les dades establertes al llibre *Plant Drug Analysis*. H.Wagner, S.Bladt, E.M.Zgainski;. Pàgines: 13, 22, 41²⁴ que han permès detectar i diferenciar alguns dels principals compostos erpenoides presents a les estructures dels olis essencials. En aquesta prova també s'han establert una sèrie de controls per a prendre com a referència.



F1: oli essencial de farigola (ref.)

TZ: Thymus Zigi (ref.)

T2: oli essencial de timó casolà

O2: oli essencial d'orenga casolà

T1: oli essencial de timó comercial

F3: oli essencial de farigola (ref.)

O1: oli essencial d'orenga comercial

Començant des de l'inici (Fig. 36), observem unes taques allargades d'un color entre ocre i violat; tot seguit, una mica per damunt de la Rf central, observem una sèrie de taques més aviat arrodonides i d'un color rosat, exceptuant-ne una que té un color groguenc i que he descartat a l'hora d'analitzar els resultats perquè mostra una

²⁴ Veure Annex 1

composició química estranya per a ser una essència de timó. Finalment, a la zona final apareixen unes petites taques arrodonides d'un color entre violeta i lila.

- Les taques situades a una Rf més baixa, és a dir, les primeres començant des de l'inici, corresponen a alcohols terpènics com són el borneol, el geraniol i el linalol.
- Les que es situen exactament a la línia del final corresponen a compostos THC (tetrahidrocannabinol).
- Les taques que es situen a una Rf d'entre 0.6 i 0.66 corresponen, majoritàriament, a una mescla de timol i carvacrol (aquests compostos apareixen barrejats degut a la seva similitud química). Tot i així, si observem la taca que correspon a l'oli d'orenga casolà veiem que apareix amb un color i una tonalitat molt més intensa i que el seu centre es situa a un valor Rf inferior a la resta de taques. Aquesta diferència entre les taques permet suposar que correspon a un altre compost químic, probablement la carvona. Aquesta suposició queda sostinguda pel fet de que aquest oli no va presentar la mateixa la mateixa efectivitat antimicrobiana que la resta i, possiblement aquest fet es degui a una diferència en la composició química.

La resta de taques però, presenten similitud entre elles i entre les taques dels olis essencials de referència, igual que si comparem els resultats obtinguts a les proves microbiològiques veiem que l'efectivitat d'aquests olis essencials (T1, T2 i O1) és molt similar entre tots.

Finalment, podem observar que les taques de l'oli d'orenga comercial apareixen degradades, això probablement es deu a que la dissolució no es va fer correctament i, per tant, no va agafar suficient mostra. No obstant això, l'anàlisi s'ha pogut fer correctament.

CONCLUSIONS

Finalitzat el treball puc afirmar que es confirma la hipòtesi, ja que analitzats els resultats he pogut observar l'efectivitat antibacteriana i antifúngica dels olis essencials estudiats. Per tant, gràcies a aquesta recerca he pogut demostrar i confirmar les propietats esmentades d'aquestes essències.

Ara bé, havent observat i comparat detalladament els resultats de les proves microbiològiques, he pogut extreure diferents conclusions que m'han permès realitzar una millor justificació dels resultats.

En primer lloc, per mitjà de les proves microbiològiques he pogut determinar que l'oli essencial que ha mostrat menys activitat antimicrobiana ha estat el d'orenga elaborat personalment a l'inici del treball, en comparació a la resta d'essències que s'han mostrat altament efectives. Això, es deu a una diferència en la composició química d'aquest oli. Tot i així, s'ha de tenir en compte que les propietats antibacterianes i antifúngiques no han estat nul·les, sinó que s'han donat en concentracions més elevades de l'oli essencial.

La diferència en la composició química de l'oli essencial d'orenga casolà, ens la demostra la cromatografia en capa fina que mostra una diferència entre les taques de l'oli d'orenga artesà i les taques de la resta d'olis. Això confirma que existeix una diferència en la composició química d'aquests olis i que per tant, els compostos més abundants a l'oli en qüestió (segons bibliografia consultada, molt possiblement carvona) són diferents als de la resta d'olis estudiats (timol i carvacrol), atorgant-li així diferents activitats o amb menor rendiment.

Per tant, si es comparen els resultats de les proves microbiològiques (antibiograma i espectrofotòmetre) amb els resultats de la cromatografia en capa fina s'observa un equilibri entre els uns i els altres que m'han permès treure la següent conclusió: possiblement la carvona, principi actiu de la composició química de l'oli essencial d'orenga casolà, és efectiva per combatre bacteris i fongs però necessita concentracions més altes que el timol i el carvacrol, per això, l'oli essencial d'orenga casolà sols ha presentat efectivitat en concentracions més altes. Per a poder afirmar

de manera segura la conclusió, caldria un altre experiment més focalitzat en aquest aspecte que em permetés estudiar el problema i confirmar la nova hipòtesi.

En resum, la diferència entre l'efectivitat de l'oli essencial d'orenga elaborat artesanalment i la resta d'olis essencials, es deu a una diferència en la seva composició química que fa que tingui unes propietats diferents o que el rendiment dels compostos per a donar activitat antimicrobiana sigui menor.

Realitzar aquest treball de recerca, m'ha permès apropar-me al món de la recerca i m'ha ensenyat la importància d'una bona planificació i organització a l'hora de fer els experiments, i de la importància que té treballar de forma ordenada i adequada i sempre en base a unes variables controlades que permeti la realització correcta dels experiments i una anàlisi adequada dels resultats.

BIBLIOGRAFIA I WEBGRAFIA

- Calvo, Jorge; Martínez-Martínez, Luis. Elsevier. *Mecanismos de acción de los antimicrobianos* [en línia]. Gener 2009. [Consulta: 7 gen. 2022]
Accés: [Mecanismos de acción de los antimicrobianos | Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica \(elsevier.es\)](https://www.elsevier.es/pt/303275/articulo?show=abstract)
- Cursos IOC – Batxillerat. *Microbiologia* [en línia]. Gener 2020. [Consulta: 27 des. 2021]
Accès: <https://educacioidigital.cat/iocbatx/moodle/mod/book/view.php?id=12753&chapterid=8838>
- Dr. Cassan Tachlitzky, Adolf. *Malalties infeccioses, sistema immunitari i genètica*. 1a ed. Enciclopèdia Catalana, S.A. 1991. Enciclopèdia de medicina i salut, volum 7. ISBN obra completa: 84-7739-083-5; ISBN volum 7: 84-7739-160-2
- Dr. Llordachs Marqués, Frederic. Clinic Cloud. *Descubrimiento de la penicilina e invención de los antibióticos* [en línia]. [Consulta: 27 des. 2021]
Accés: <https://clinic-cloud.com/blog/descubrimiento-penicilina-invencion-antibioticos/>
- Enciclopèdia catalana. *Microbiologia* [en línia]. [Consulta: 27 maig 2022]
Accés: https://www.enciclopedia.cat/cerca/cec?search_api_fulltext=microbiologia&field_faceta_cerca_1=All
- Enciclopèdia-titànica. *Significat de llevat* [en línia]. Maig 2022. [Consulta: 26 maig 2022]
Accés: <https://ca.encyclopedia-titanica.com/significado-de-levadura>
- Equip editorial, Etecé. *Bacterias* [en línia]. 29 de desembre de 2021. [Consulta: 30 des. 2021]
Accés: <https://concepto.de/bacterias/>
- Gencat. Agència catalana de seguretat alimentària. *Bacteris* [en línia]. 26 d'octubre 2021. [Consulta: 28 des. 2021]
Accés: <https://acsa.gencat.cat/ca/detall/article/Bacteris-00004>

- Gencat. Scientiasalut. *Els antimicrobians* [en línia]. Desembre 2017 [Consulta: 26 maig 2022]
Accés: https://scientiasalut.gencat.cat/bitstream/handle/11351/4519/antimicrobians_2017_ca.pdf?sequence=6&isAllowed=y
- H. Wagner, S. Bladt, E.M.Zgainski. *Plant Drug Analysis*. 1a ed. Traduït per A.Scott. Springer-Verlag Berlin, 1984. ISBN-13 978-3540131953
- Mariana Olatz, Cristina. *Els bacteris. Malalties bacterianes* [en línia]. Maig 2009. [Consulta: 27 des. 2021]
Accés: <http://elsbacteris.blogspot.com/2009/03/malalties-bacterianes.html>
- Naturalsom. *El regne monera* [en línia]. [Consulta: 29 des. 2021]
Accés: <https://blocs.xtec.cat/naturalsom/1r-eso/6-regne-monera/>
- PROAntibióticos. *¿Cómo actúan los antibióticos?: Mecanismos de acción* [en línia]. 2020. [Consulta: 7 gen. 2022]
Accés: <https://proantibioticos.com/como-actuan-los-antibioticos-mecanismos-de-accion/>
- Proyecto biosfera. Gobierno de España. *Microbiología – 2º bachillerato* [en línia]. [Consulta: 03 gen. 2022]
Accés: <http://recursos.cnice.mec.es/biosfera/alumno/2bachillerato/micro/contenidos.htm>
- Salud. Blogs Mapfre. *Tinció de gram* [en línia]. 11 de març 2021. [Consulta: 03 gen. 2022]
Accés: <https://www.salud.mapfre.es/pruebas-diagnosticas/otras-pruebas-diagnosticas/tincion-de-gram/>
- Sánchez Martínez, Maribel. All you need is Biology. *Microbiología bàsica(II). Bacteris de mil i una formes* [en línia]. 10 de novembre 2016. [Consulta: 28 des. 2021]
Accés: <https://allyouneedisbiology.wordpress.com/2016/11/10/microbiologia-forma-bacteris/>
- Slideshare. *Unitat 16. Els microorganismes* [en línia]. 29 de gener 2013. [Consulta: 30 des. 2021]
Accés: <https://www.slideshare.net/oribara/biologia-2n-batxillerat-ud16-els-microorganismes>

- Vêda. *Bacteris gram positius vs gram negatius* [en línia]. 06 de febrer de 2020. [Consulta: 03 gen. 2022]
Accés: <https://www.greelane.com/ca/science-tech-math/v%c4%9bda/gram-positive-gramnegative-bacteria-4174239/>
- Viquipèdia. L'enciclopèdia lliure. *Espiril* [en línia]. 21 de maig 2021. [Consulta: 28 des. 2021]
Accés: <https://ca.wikipedia.org/wiki/Espiril>
- Viquipèdia. L'enciclopèdia lliure. *Antifúngics* [en línia]. 24 de desembre 2021 [Consulta: 27 maig 2022]
Accés: <https://ca.wikipedia.org/wiki/Antif%C3%BAngic>
- Viquipèdia. L'enciclopèdia lliure. *Farigola* [en línia]. 24 de desembre 2021 [Consulta: 10 gen. 2022]
Accés: <https://ca.wikipedia.org/wiki/Farigola>
- Viquipèdia. L'enciclopèdia lliure. *Antimicrobià* [en línia]. 8 de gen. 2022 [Consulta: 27 maig 2022]
Accés: <https://ca.wikipedia.org/wiki/Antimicrobi%C3%A0>
- Viquipèdia. L'enciclopèdia lliure. *Orenga* [en línia]. 7 de febrer 2022 [Consulta: 10 gen. 2022]
Accés: [https://ca.wikipedia.org/wiki/Orenga#Composici%C3%B3_qu%C3%ADmica_lliure_\(wikipedia.org\)](https://ca.wikipedia.org/wiki/Orenga#Composici%C3%B3_qu%C3%ADmica_lliure_(wikipedia.org))
- Wikipèdia. *Microbiología* [en línia]. 6 de maig 2022. [Consulta: 27 maig 2022]
Accés: <https://es.wikipedia.org/wiki/Microbiolog%C3%ADa>

ANNEX 1: Referències per a l'anàlisi de la cromatografia en capa fina

Les dades són procedents del llibre *Plant Drug Analysis*. H.Wagner, S.Bladt, E.M.Zgaiski;. Pàgines: 22, 23, 40 i 41

TLC Synopsis Terpene and Phenylpropane Reference Compounds			
Fig. 1	Compounds applied in order of increasing Rf-value and decreasing polarity		
Fig. 2	Monoterpene alcohols and their esters		
	Track	Reference compound	Colour
Fig. 1	1 =	borneol	violet-blue
	2 =	linalool	blue
	3 =	piperitone	orange
	4 =	cineole	blue
	5 =	citral	blue-violet
	6 =	carvone	red-violet
	7 =	eugenol	yellow-brown
	8 =	thymol	red-violet
	9 =	citronellal	blue
	10 =	apiol	brown-red
	11 =	myristicin (Macis aeth.)	red-brown
	12 =	anethole	red-brown
	13 =	safrol	red-brown
Fig. 2	14 =	geraniol	grey-blue
	15 =	geranyl acetate	grey-blue
	16 =	nerol	grey-blue
	17 =	neryl acetate	grey-blue
	18 =	linalool (\cong 2/Fig. 1)	grey-blue
	19 =	linalyl acetate	grey-blue
	20 =	trans-sabinene hydrate	violet
	21 =	terpineol	blue-violet
	22 =	phytol	violet
	23 =	farnesol (impure)	blue
Solvent system	A-1: toluene-ethyl acetate (93:7)		
Detection	Vanillin-sulphuric acid (VS No. 38, p. 304); vis.		

The reference compounds can be divided into four main groups on the basis of their characteristic colour reactions:

<i>brown-red/violet</i>	<i>phenylpropane derivatives</i> : safrol, anethole, myristicin, apiol and eugenol.
<i>orange to red-violet</i>	carvone, thymol, piperitone.
<i>blue/blue-violet</i>	citral, citronellal, cineole.
<i>grey-blue</i>	most monoterpene alcohols and their esters (geraniol, nerol, linalool, borneol; cf. menthol, menthyl acetate, Fig. 15, p. 37).

Remarks: Commercially available reference substances often show weak extra zones at lower Rf-values and sometimes also at higher Rf-values. These are partly due to resinification, decomposition products and incompletely removed impurities.

Fig. 1: Referència dels valors Rf corresponents a cada compost i aparença de la seva taca (Pàg.22)

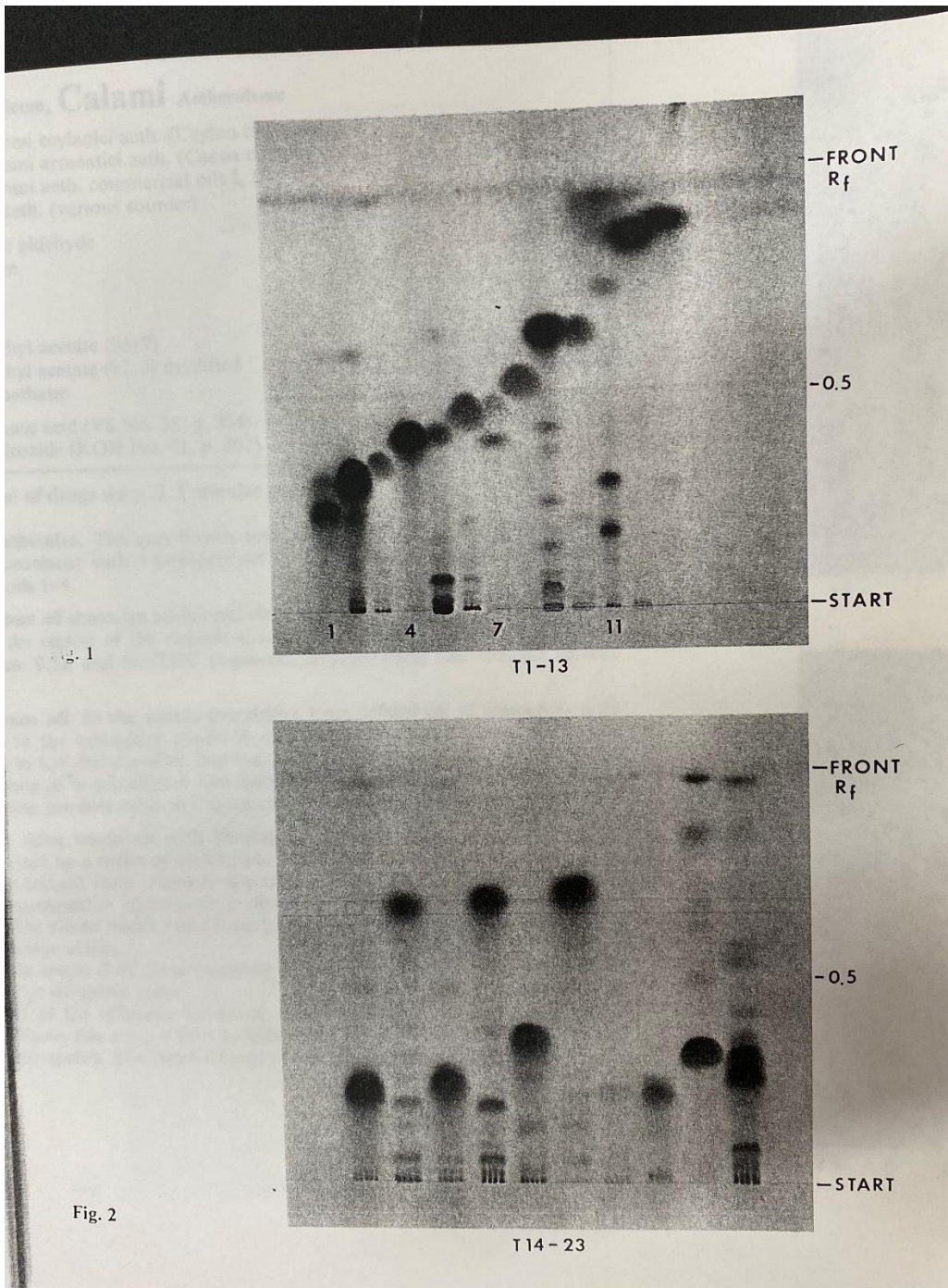


Fig. 2: Aparença de les taques dels compostos mencionats a la Fig.1 (Pàg. 23)

Thymi, Serpylli, Ajowani Aetherolea		Fig. 19
Tracks	1, 2 = Thymi aeth. (Thymi herba, steam distillate) 4, 5, 7 = Thymi aeth. (official commercial oils from various sources) 3, 8 = Serpylli aeth. (Serpylli herba, steam distillate) 6 = Ajowani aeth. (Ajowani fructus, steam distillate)	
Tests	T1 = carvacrol T2 = thymol	
Melissae Aetherolea and substitutes		Fig. 20
Tracks	9, 10, 11 = Melissae aeth. (Melissae folium, steam distillate) 12 = Citronellae aeth.	
Tests	T3 = lemon grass oil (for citral reference) T4 = citronellal	
Solvent system	A-1: toluene-ethyl acetate (93:7) A-3: chloroform (DAB 8)	Fig. 19 A, B; 20 B Fig. 20 A
Detection	Vanillin-sulphuric acid-reag. (VS No. 38, p. 304) Anisaldehyde-sulphuric acid-reag. (AS No. 2, p. 299)	vis. Fig. 19 A, B; 20 B vis. Fig. 20 A

For description of drugs see p. 13–14. Formulae p. 19.

Chromatogram
19

Thymi aeth. After treatment with VS-reagent, TLC of oils from the Thymus species, Th. vulgaris, Th. zygis (1, 2, 4, 7) and Th. serpyllum (3, 8) show a characteristic main zone in the Rf range 0.5–0.55, due to a mixture of *thymol* and *carvacrol* (cf. T1/T2).

There are also lower concentrations of the *terpene alcohols*, borneol, geraniol and linalool (grey zones, Rf 0.1–0.3), the terpene esters, bornyl and linalyl acetate (blue zones, Rf 0.55–0.8), and *THC* at the solvent front.

3, 8 **Thymi serpylli aeth.** shows one or two additional ester zones at Rf ca. 0.6.

5 **Thymi aeth. (rectified commercial oil)** from an unknown species of thyme shows additional zones in the Rf ranges 0.3–0.4 and 0.6–0.95, which give the characteristic red reaction of thymol derivatives.

6 **Ajowani aeth.** The oil from Ajowani fructus contains practically only *thymol* (cf. T2), with small quantities of terpene alcohols.

Remarks: The thymol-carvacrol mixture is efficiently separated by two-dimensional TLC: first dimension A-1, second dimension toluene-carbon tetrachloride-o-nitrotoluene (1:1:1).

20 A 9–11 **Melissae aeth.** Chromatograms of official melissa aeth., after treatment with VS- or AS-reagent, show a characteristic main blue zone, due to *citronellal* (cf. T4). Also present are the weak grey to blue zones of *citral* (cf. T3) and the terpene alcohols, *geraniol*, *linalool* and *citronellol* in the Rf range 0.2–0.4.

12 **Melissa oil substitutes:**

Ceylon or Java lemon grass oil (12) (Citronellae aeth.) resembles official Melissa oil (10) in its high content of *citronellal*, and its chromatographic picture is also largely similar.

20 B Rf values in A-3 (DAB 8) are somewhat lower than those in A-1 for the same substances.

Fig. 3: Anàlisi de la cromatografia de diferents essències de timó (Pàg. 40)

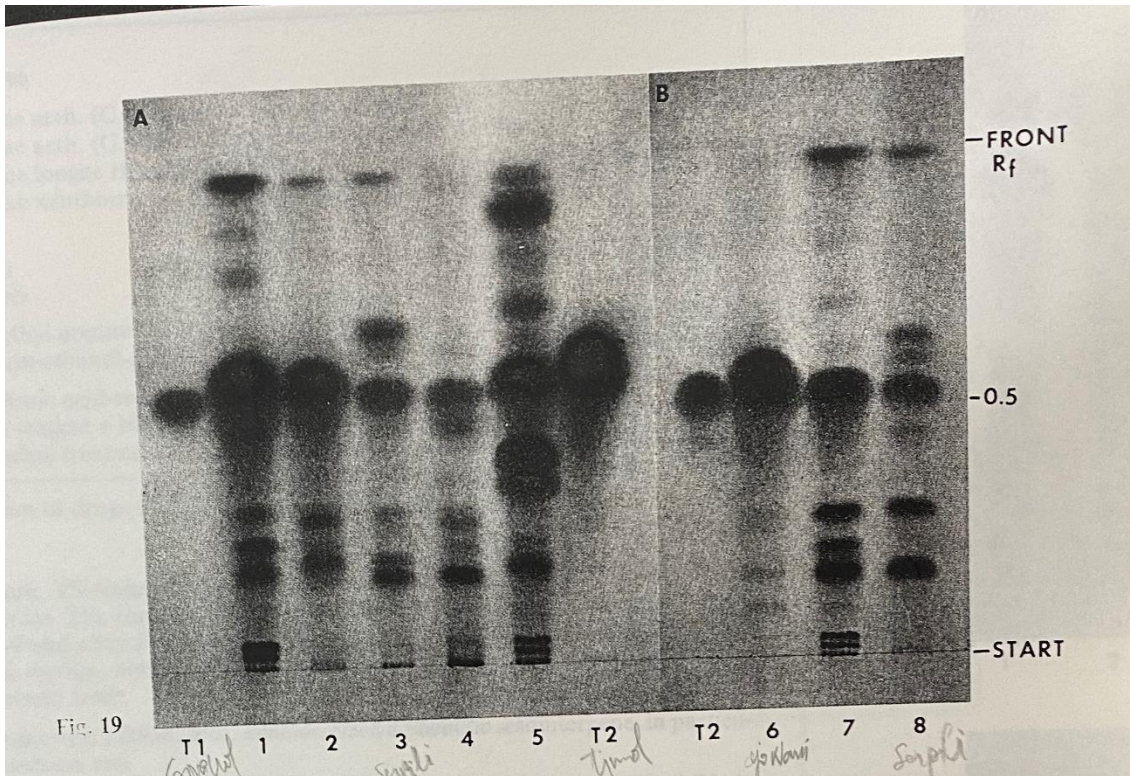
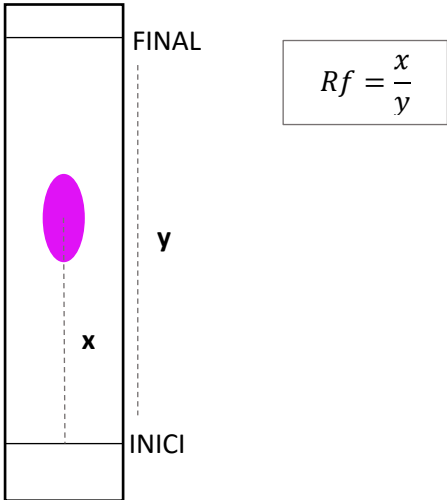


Fig. 4: Cromatografia de diferents essències de timó. Es prenen com a referència els compostos carvacrol (T1) i timol (T2) (Pàg. 41)

CÀLCUL DEL VALOR R_f

Aquest valor permet identificar els compostos apareguts en la cromatografia en funció de l'altura que hagin sigut arrastrats.

Per a calcular-lo hem de dividir la distància entre la línia d'inici i el centre de la taca (x) per la distància entre la línia d'inici i la línia final (y).



ANNEX 2: Fotos de la part pràctica

EL LABORACIÓ DELS OLIS ESSENCIALS



Fig. 1: Preparació de l'aparell de destil·lació



Fig. 2: Preparació del contingut del matràs



Fig. 3: Trinxada de l'orenga



Fig. 4: Oli essencial d'orenga

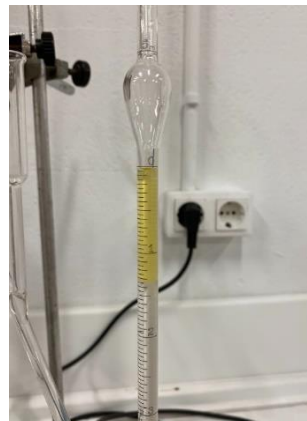


Fig. 5: Oli essencial de timó

EL LABORACIÓ DELS ANTIBIOGRAMES



Fig. 6: Preparació de les plaques



Fig. 7: Plaquerar



Fig. 8: Pipetejant medi amb bacteris



Fig. 9: Impregnació dels discs amb oli essencial

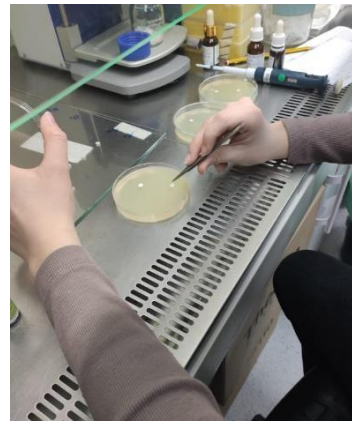


Fig. 10: Aplicació dels discs a la placa

PREPARACIÓ DE L'ESPECTROFOTÒMETRE

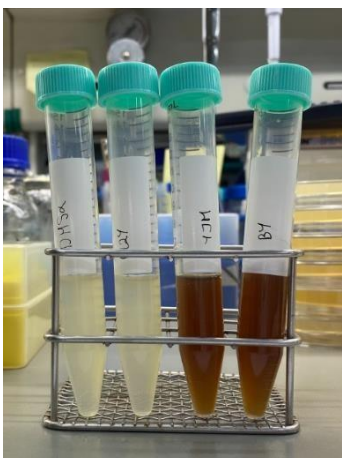


Fig. 11: Medis líquids amb els seus respectius microorganismes

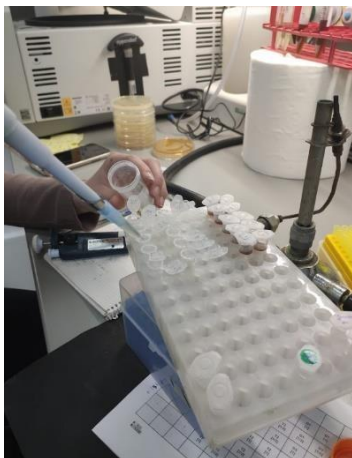


Fig. 12: Preparació de les dilucions per l'espectrofotòmetre



Fig. 13: Pipeteig de les dilucions a la placa de 96 pouets

EL LABORACIÓ DE LA CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA



Fig. 14: Preparació de les dissolucions dels agents reveladors



Fig. 15: Preparació de les dissolucions d'oli amb toluè



Fig. 16: Preparació de la fase mòbil



Fig. 17: Preparació de la placa de sílica-gel



Fig. 18: Extracció de la placa de la cubeta cromatogràfica



Fig. 19: Preparació de la placa per espraïar



Fig. 20: Preparació dels agents reveladors

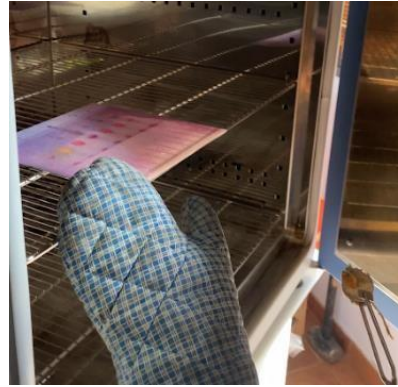


Fig. 21: Aspecte de la placa passats els 20 min.