

A microscopic view of numerous rod-shaped bacteria, likely Bacillus subtilis, arranged in a dense, overlapping cluster. The bacteria are a vibrant blue color and are set against a dark blue background. The lighting creates a sense of depth, with some bacteria appearing more prominent than others.

Resistència bacteriana: més enllà de les mutacions



“Per a l’investigador no hi ha alegria comparable a la d’un descobriment, per petit que sigui.”

Sir Alexander Fleming

ÍNDEX

INTRODUCCIÓ	3
1. JUSTIFICACIÓ	3
2. PRESENTACIÓ	4
3. OBJECTIUS	4
4. METODOLOGIA	4
5. EIXOS DEL TREBALL	5
PART TEÒRICA	6
1. BACTERIS	6
1.1. Història dels bacteris: dominis i regnes	6
1.2. Estructura i morfologia	8
1.3. Fisiologia	17
1.3.1. Nutrició i metabolisme.....	17
1.3.2. Relació.....	18
1.3.3. Reproducció.....	18
1.3.3.1. Bipartició.....	18
1.3.3.2. Reproducció parasexual.....	19
1.3.4. Creixement.....	20
2. ANTIBIÒTICS	22
2.1. Història dels antibiòtics	22
2.2. Classificació dels antibiòtics	23
2.2.1. Segons l'origen.....	23
2.2.2. Segons l'estructura.....	23
2.2.3. Segons l'efecte sobre el creixement bacterià.....	26
2.2.4. Segons l'espectre.....	26
2.3. Mecanismes d'acció dels antibiòtics	27
3. RESISTÈNCIA BACTERIANA	27
3.1. Tipus de resistència	28
3.2. Origen i factors que influeixen en la resistència	29
3.3. Mecanismes de resistència	29
3.4. Resistència en els principals grups d'antibiòtics	31

PART PRÀCTICA	32
1. OBJECTIUS	33
2. METODOLOGIA	33
2.1. Seguiment de la reacció	33
2.2. Rotavaporació	34
2.3. Estudi de l'activitat antimicrobiana	34
3. SÍNTESI D'UN COMPOST TENSIOACTIU	34
3.1. Compostos tensioactius	34
3.1.1. Propietats físico-químiques dels compostos tensioactius en dissolució ..	35
3.1.2. Fenòmens relacionats amb les associacions moleculars de tensioactius	35
3.1.3. Tipus de tensioactius	36
3.2. Procés de síntesi del LAM	36
4. SEMBRA DE MICROORGANISMES	39
4.1. Procés de sembra	39
4.2. Resultats	41
CONCLUSIONS	43
BIBLIOGRAFIA	46
WEBGRAFIA	48
AGRAÏMENTS	52
ANNEXOS	54
1. ANNEX I: GRÀFICS DELS TEMPS DE RETENCIÓ DELS COMPOSTOS	54
2. ANNEX II: ESTUDI DE LA C.M.C. MITJANÇANT LA CONDUCTIVITAT	70
2.1. Metodologia	70
2.2. Procés per a l'estudi de la C.M.C.	70
2.3. Resultats	71

INTRODUCCIÓ

1. JUSTIFICACIÓ

La resistència bacteriana és un fenomen en constant creixement que esdevé quan un bacteri es fa refractari parcialment o totalment als efectes d'un antibiòtic. Aquesta situació, molt cops produïda pel mal ús d'aquests fàrmacs, però també per la facilitat de mutar dels bacteris, comporta la necessitat de seguir avançant en la recerca per corregir-la.

La necessitat del coneixement teòric del món microbacterià i dels seus antídots va unida a la pràctica; eina essencial de l'investigador que permet que el conjunt de la societat avanci en aquest tipus de recerca. Per altra banda, és missió del conjunt de la societat conscienciar-se de la importància dels usos adequats del antibiòtics.

Amb aquest treball pretenem contribuir, tant des de l'àmbit teòric com el pràctic, a la divulgació de tot allò que pugui ser útil en el camp de la lluita contra la resistència bacteriana.

He escollit aquest tema perquè va estretament vinculat a les matèries que, d'una manera o altra, aspiro a donar continuïtat en la meva formació acadèmica. El món de la investigació científica forma part de la meva inquietud intel·lectual i és per aquí per on vull dirigir els meus esforços. Així mateix, aquesta temàtica té un abast que més enllà de la curiositat científica de ben segur que pot contribuir a la millora de la qualitat de vida en la nostra societat. La seva actualitat mediàtica i acadèmica va contribuir definitivament a fer-me decantar per aquesta qüestió.

2. PRESENTACIÓ

Què és un bacteri? Què és un antibiòtic? Per què els bacteris han desenvolupat resistència a alguns antibiòtics? Reaccionen igual tots els microorganismes a l'aplicar-los-hi el mateix compost? Per què el grau de concentració de dissolució d'un compost afecta de manera diferent als microorganismes?

En aquest treball pretenem donar resposta a aquestes i altres qüestions i, alhora, justificar-les. Per fer-ho, dividim aquest estudi en dues grans parts; una de teòrica i una altra de pràctica, la darrera producte d'una estada a l'Institut de Química Avançada de Catalunya (IQAC) a la ciutat de Barcelona durant tres setmanes, així com a la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona.

3. OBJECTIUS

Els objectius que ens marquem, en primer lloc, pretenen donar a conèixer el món dels bacteris, dels antibiòtics i les seves reaccions i comportaments des d'un punt de vista teòric. Al mateix temps, i des de plantejaments de pràctica científica, l'estudi té com a propòsit sintetitzar un compost tensioactiu amb propietats antibacterianes i descriure'n empíricament el seu comportament al ser aplicat a microorganismes.

4. METODOLOGIA

La metodologia emprada en la confecció del treball, per una banda, ha consistit en la recerca d'informació i recollida de dades en diferents espais: Biblioteca Municipal de Riudoms, Biblioteca Municipal de Reus, Internet i totes les seves eines de recerca, documentació pròpia, entre d'altres. Per altra banda, i essencialment en la part pràctica del treball, s'ha emprat el mètode empíric-analític basat en les proves experimentals així com el mètode científic-comparatiu que prova la validesa de les proposicions empíriques. Aquestes experimentacions, tal i com hem dit anteriorment, han estat realitzades a partir

del programa de Suport a la Realització de Treballs de Recerca en col·laboració amb Entitats de Recerca, en el meu cas l'Institut de Química Avançada de Catalunya (IQAC) i a la Universitat de Barcelona, promogut pel Departament d'Ensenyament.

La meua idea inicial era desenvolupar tot allò que fa referència als nous antibiòtics, però l'estada a l'empresa a l'IQAC i els consells de la investigadora que em va tutoritzar, van derivar el meu treball cap a la resistència bacteriana. Una vegada escollit el tema, vaig començar a buscar tot allò que feia referència a l'esmentada resistència fins que vaig adonar-me'n que per comprendre i treballar tota aquesta temàtica era preceptiu estudiar tot allò relacionat amb els bacteris i els antibiòtics. Sense aquest pas previ hauria resultat del tot impossible poder confeccionar el treball sobre els bacteris i la seva resistència.

Per altra banda, el salt qualitatiu de la meua relació amb un laboratori (a l'institut aquesta és molt lleugera) i totes les tècniques i materials allí presents per a mi van resultar una novetat, una dificultat i, alhora, una interessant experiència. La dificultat es va veure reduïda per l'acció entusiasta de les dues investigadores, tant la que em guiava en el dia a dia, com la que dirigia la meua estada.

5. EIXOS DEL TREBALL

El treball consta, a més d'aquesta introducció i de les corresponents conclusions, de dos gran eixos que conformen el nucli de l'estudi. El primer eix d'aquest nucli fa referència a la part teòrica del treball i es divideix en els següents apartats: Bacteris, Antibiòtics i Resistència bacteriana. El segon eix especifica la part pràctica del treball que és la que descriu la síntesi d'un compost tensioactiu amb propietats antibacterianes i la sembra de microorganismes.

Finalment, el treball es tanca amb el capítol de bibliografia i webgrafia, així com l'apartat d'agraïments i annexos.

PART TEÒRICA

1. BACTERIS

Els bacteris són microorganismes formats únicament per una cèl·lula procariota. Les cèl·lules procariotes es caracteritzen per la manca de nucli i de qualsevol altre compartiment delimitat per una membrana, dit en altres paraules, orgànul. El material genètic (DNA), format per un cromosoma, es troba dispers en la cèl·lula.

Els bacteris van ser els primers organismes que van aparèixer a la Terra fa aproximadament uns 3500 milions d'anys. Primerament, van tenir la capacitat de poder-se adaptar a un medi sense oxigen (bacteris anaerobis). Més tard, les concentracions d'oxigen van augmentar i els bacteris van sobreviure a aquesta nova condició (bacteris aerobis). I amb el pas del temps, es van anar acomodant a diferents situacions. Aquesta capacitat d'adaptació és possible gràcies a l'alta velocitat de reproducció (exponencial). En la divisió, quan es duplica el DNA, poden produir-se errors, anomenats mutacions. Existeixen mecanismes de reparació d'errors, però en el cas dels bacteris no són prou eficaços. Aquestes mutacions, però, no han de ser necessàriament perjudicials per al bacteri, sinó al contrari. En alguns casos són de gran interès donat que poden adquirir noves qualitats que els permeten sobreviure en un ambient on abans no podien. La capacitat d'adaptació, doncs, és un dels factors que influeix significativament en la resistència bacteriana.

1.1. Història dels bacteris: dominis i regnes

Fins a finals de segle XIX, els éssers vius es classificaven en els regnes *Animalia* i *Plantae*. Posteriorment, van ser descobertes altres formes de vida les quals no s'ajustaven en cap dels dos regnes existents.

El descobriment dels bacteris va associat amb l'aparició del microscopi. L'any 1674, Antonie van Leeuwenhoek¹ va observar els primers bacteris mitjançant un microscopi molt senzill.

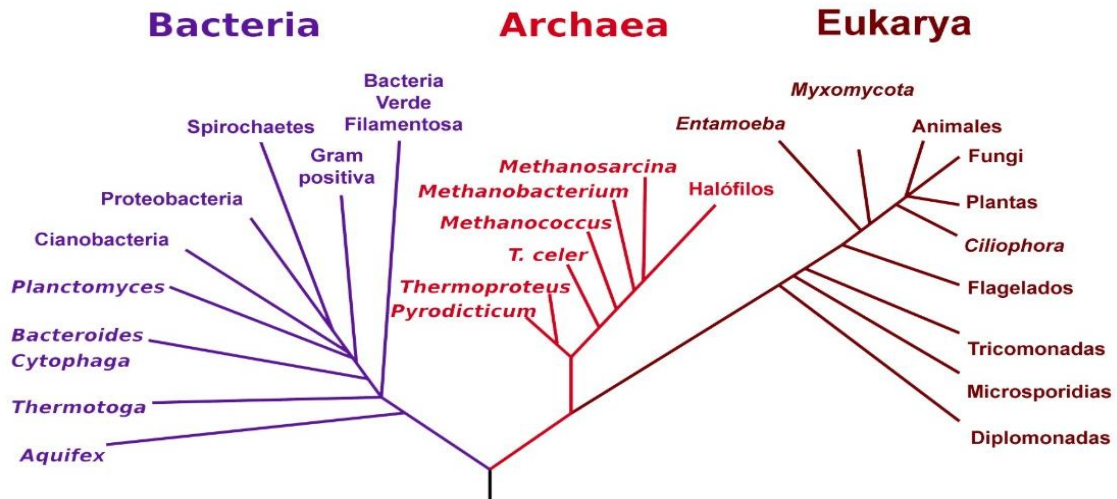
Antigament, tots els microorganismes procariotes s'anomenaven "bacteris". Carl Woese², l'any 1977, va demostrar mitjançant tècniques de seqüenciació que els microorganismes procariotes es dividien en dos, originalment anomenats *Eubacteria* i *Archebacteria*, els quals actualment són referenciats com *Bacteria* i *Archea*. Aquest dos dominis, juntament amb l'*Eukarya*, són els que l'any 1990 Woese va determinar com els Tres Dominis, que engloben tots els organismes dels 5 regnes (Moneres, Protocists, Fongs, Plantes i Animals) proposats per Robert Whittaker³ l'any 1969.

Els bacteris formen part del regne de les Moneres. Aquest regne inclou tots els organismes procariotes amb mides des de 1µm fins a 15µm. Les principals característiques són: la manca de nucli, la possessió de DNA circular, la inexistència d'òrgànuls en citoplasma i l'habitual embolcallament d'una paret cel·lular.

¹ Antonie Philips van Leeuwenhoek (Delft, 24 d'octubre de 1632 - 26 d'agost de 1723), fou un comerciant, topògraf, vidrier i microbiòleg holandès conegut com a pare de la microbiologia i inventor del microscopi, i per ser el primer a observar al microscopi diverses espècies de microorganismes i cèl·lules amb lents que ell mateix va construir. Font: Wikipèdia. Antonie Philips van Leeuwenhoek [en línia] http://ca.wikipedia.org/wiki/Antonie_van_Leeuwenhoek [consulta 8/9/14]

² Carl Richard Woese (15 de juliol del 1928, Syracuse - 30 de desembre de 2012, Urbana, Illinois) va ser un microbiòleg estatunidenc, que estudià a la Deerfield Academy i l'Amherst College. És cèlebre per ser el definidor dels arqueobacteris (un nou domini o regne de la vida) el 1977, per mitjà de la taxonomia filogenètica de l'ARN ribosomal 16S, una tècnica de la qual Woese fou pioner i que actualment és un procés estàndard. Font: Wikipèdia. Carl Richard Woese [en línia] http://ca.wikipedia.org/wiki/Carl_Richard_Woese [consulta 26/08/14]

³ Robert Whittaker Harding (Wichita, 27 de desembre de 1920 - Ithaca, 20 d'octubre de 1980) va ser un dels principals impulsors i desenvolupadors de l'anàlisi de gradients per abordar les qüestions d'ecologia vegetal i va aportar moltes evidències empíriques en contra d'algunes idees propugnades per Frederic Clements en relació a les comunitats vegetals. També va proposar una classificació dels organismes en cinc regnes (moneres, protists, fongs, plantes i animals) en comptes dels dos considerats fins llavors (plantes i animals) i fou un dels creadors de la teoria del continuum com a model d'estudi de la vegetació. Va ser elegit per l'Acadèmia Nacional de Ciències el 1974, va col·laborar amb molts altres ecòlegs i va ser particularment actiu en col·laboracions internacionals. Font: Wikipèdia. Robert Whittaker Harding [en línia] http://ca.wikipedia.org/wiki/Robert_Whittaker [consulta 6/10/2014]



Arbre filogenètic universal⁴

1.2. Estructura i morfologia

Estructura externa:

Membrana cel·lular: segons el model proposat per Singer⁵ i Nicholson⁶ l'any 1972, la membrana cel·lular està constituïda per una doble capa lipídica a la qual s'associen molècules proteiques, que es poden situar a les dues cares de la superfície de la capa o bé poden estar-hi totalment o parcialment

⁴ Aquest arbre s'ha constituït a partir de la comparació de les seqüències dels RNA ribosòmics 16S i 18S. S'hi poden observar els tres dominis d'éssers vius: Bacteria, Archaea i Eukarya. La distància evolutiva entre dos grups d'organismes es proporcional a la suma de les distàncies des del final de les rames fins al punt on s'uneixen els dos grups.

Font: Wikipèdia. Arbre filogenètic [en línia] http://ca.wikipedia.org/wiki/Arbre_filogen%C3%A8tic [consulta 8/9/14]

⁵ Seymour Jonathan Singer (Nova York, 1924) és un biòleg cel·lular i professor de la Universitat de Califòrnia, San Diego. Va co-descobrir la base de l'hemoglobina anormal a l'anèmia de les cèl·lules falciformes. L'any 1951, es va convertir en professor a Yale, on va desenvolupar la ferritina. Se li va concedir una beca Guggenheim per la Biologia Molecular i Cel·lular l'any 1959. També va treballar en les proteïnes de membrana que li va servir d'ajuda per al desenvolupament del "model del mosaic fluid" de la membrana cel·lular, l'any 1972. Font: Wikipèdia. Seymour Jonathan Singer [en línia] http://en.wikipedia.org/wiki/Seymour_Jonathan_Singer [consulta 29/9/2014]

⁶ Garth L. Nicolson (Los Angeles, 1 octubre 1943) és un bioquímic nord-americà que va fer un model científic de referència per a la membrana cel·lular, conegut com el Fluid Mosaic Model. És el fundador de l'Institut de Medicina Molecular de Califòrnia, i és el President, Director Científic i Professor Emèrit de Patologia Molecular. També és Professor Conjunt de la Facultat de Ciència i Tecnologia de la Universitat de Newcastle, Austràlia. Font: Wikipèdia. Garth L. Nicolson [en línia] http://en.wikipedia.org/wiki/Garth_L._Nicolson [consulta 29/9/2014]

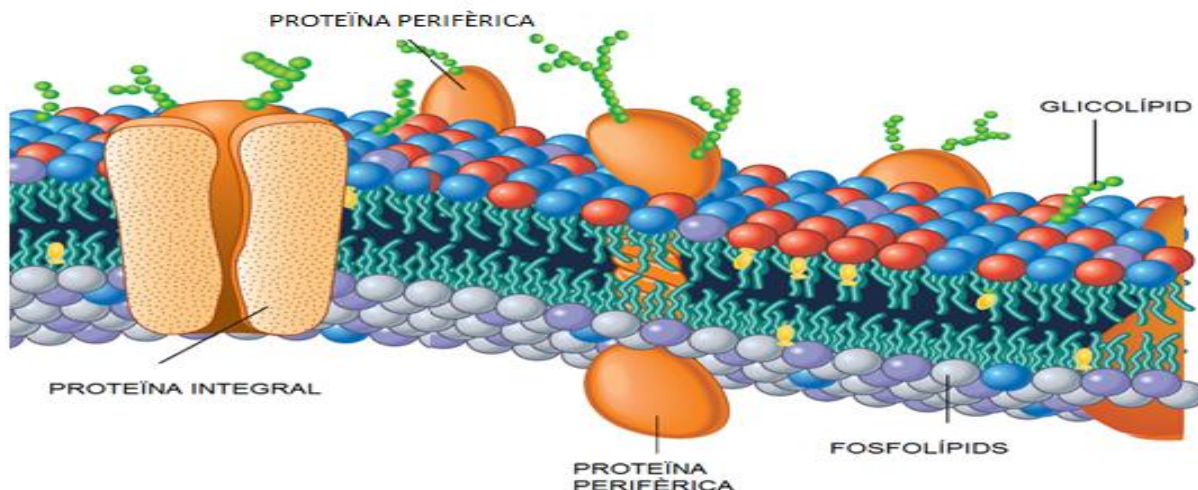
englobades. Rep el nom de model del mosaic fluid donat que totes les molècules es poden moure entre si.

Els components lipídics principals són els fosfolípids i glicolípid. Els fosfolípids i glicolípid tenen tendència a girar sobre si mateixos i a desplaçar-se lateralment per la seva monocapa. Aquesta mobilitat origina una fluïdesa que li permet adaptar-se als espais exteriors a la cèl·lula. Aquestes molècules són amfipàtiques i es troben en aigua, un medi polar. Les molècules s'orienten disposant els seus radicals polars cap al medi aquós i els seus radicals lipòfils cap als radicals lipòfils de l'altra capa. Aquesta disposició, anomenada autoacoblament, és la que origina la bicapa.

Per altra banda, a la membrana cel·lular també s'hi troben components proteics. Les proteïnes integrals o intrínseques són les que estan totalment o parcialment englobades a la bicapa atès que tenen un sector lipòfil que s'hi introdueix. I les proteïnes perifèriques o extrínseques són les adossades a la bicapa. Són solubles que tenen sectors polars que s'uneixen als radicals polars dels lípids de membrana i de les proteïnes integrals.

Les funcions de la membrana cel·lular són:

- Per part de la bicapa lipídica: mantenir separats el medi aquós exterior del medi aquós interior i dur a terme els processos de captació de material de l'espai extracel·lular cap al seu interior (endocitosi) i de secreció de soluts cap a l'exterior cel·lular (exocitosi).
- Per part de les proteïnes: regular l'entrada i la sortida de les molècules a la cèl·lula, regular l'entrada i la sortida d'ions, fer possible el reconeixement cel·lular, dur a terme l'activitat enzimàtica, intervenir en la traducció de senyals, constituir unions intercel·lulars i constituir ponts d'ancoratge.



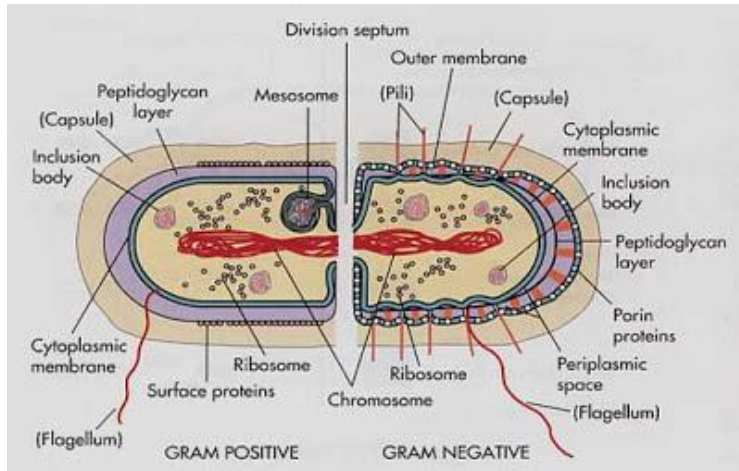
Estructura de la membrana plasmàtica⁷

Paret cel·lular: estructura multicapa que es troba per fora de la membrana cel·lular. Està formada per una capa interna de peptidoglicans i una capa externa que pot variar en gruix i composició química depenent del tipus de bacteri. Dóna forma i protegeix la cèl·lula. La paret cel·lular és on poden actuar els antibiòtics. Segons la seva tinció mitjançant el mètode de Gram⁸, un tractament amb lugol i etanol, els bacteris poden classificar-se en grampositius o gramnegatius.

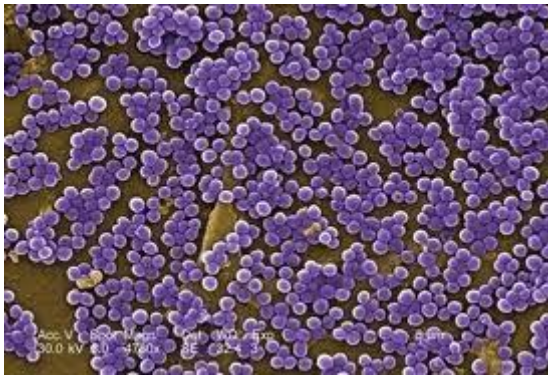
Els bacteris grampositius es caracteritzen per tnyir-se de color violat perquè tenen una capa de peptidoglicans (mureïna) de fins a 40 capes que rodeja la cèl·lula on queda atrapat el color violat. No tenen membrana externa ni espai periplasmàtic. En canvi, els gramnegatius, tenen una xarxa de mureïna de només una capa que no reté el color morat i queden tnyits de color vermell a causa de la safranina. La seva paret cel·lular és més completa i està formada per paret cel·lular interna, paret de peptidoglicà i bicapa lipídica. Té membrana externa i espai entre la superfície externa de la membrana citoplasmàtica i la interna de la membrana externa, l'anomenat espai periplasmàtic.

⁷ Font: <http://wallpaper-anime.com/la-membrana-plasm>

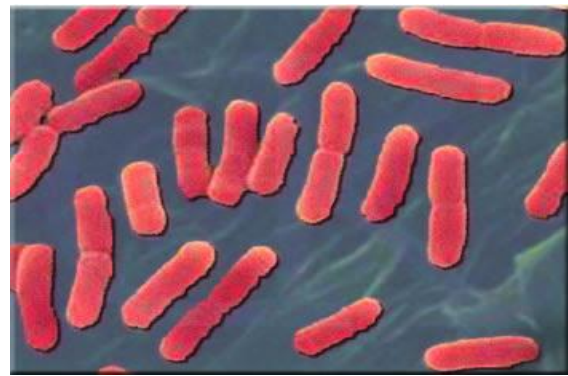
⁸ Hans Christian Joachim Gram (1853 - 1938) fou un bacteriòleg danès, que va desenvolupar la tinció de Gram, d'ampli ús en microbiologia. Font : Wikipèdia. Hans Christian Joachim Gram [en línia] http://ca.wikipedia.org/wiki/Hans_Christian_Gram [consulta 12/8/14]



Estructura d'un bacteri grampositiu i un gramnegatiu⁹



Gram Positiu: *Staphylococcus aureus*¹⁰



Gram Negatiu: *Escherichia coli*¹¹

Càpsula: no és una estructura vital. És una capa gelatinosa que es troba situada recobrint la paret cel·lular. Està composta per polisacàrids. És un mecanisme de defensa ja que limita l'acció dels anticossos, bacteriòfags i fagocitosi i també té la funció de regulació dels processos d'intercanvi de substàncies. Així mateix, és important perquè els bacteris amb càpsula tenen la capacitat d'adherir-se als teixits humans per iniciar una infecció.

^{9 10 11} Font : <http://biologiamedica.blogspot.com.es/2010/09/bacterias-gram-positivas-y-gram.html>

Flagels i filaments axials: els flagels són estructures proteiques, helicoïdals, primes, rígides, de diàmetre i longitud constant responsables del moviment bacterià. Es troben distribuïts uniformement per la superfície bacteriana.

Els filaments axials tenen forma d'hèlix i segons el seu moviment els bacteris es mouen d'una manera o una altra; si el moviment és en sentit antihorari el bacteri avança, si és horari volteja.

Fímbrics o pilis: filaments proteics que s'estenen per la superfície del bacteri. Són més curts i rectes que els flagels. La funció principal consisteix en intervenir en la unió del bacteri a receptors de la superfície de les cèl·lules humanes.

Estructura interna:

Cromosoma bacterià: té com a funció contenir la informació genètica i controlar el funcionament del metabolisme. Tots els bacteris tenen un nucleoide o regió nuclear, que és la zona on es troba la doble cadena de DNA supercargolat sobre si mateix i ancorat a proteïnes de la membrana plasmàtica. També poden tenir el plasmidi, unes molècules de DNA que posseeixen la capacitat de replicació autònoma. Aquest element, tot i no ser imprescindible per als bacteris, els aporta algunes avantatges com la resistència a antibiòtics.

Ribosomes: els ribosomes, partícules globulars, són orgànuls responsables de la síntesi de proteïnes, concretament la traducció. Estan constituïts per un complex de gairebé cent proteïnes diferents associades a algunes molècules d'ARNr. Cada ribosoma està format per dues subunitats: una major i una altra menor, les quals es dissocien reversiblement després de cada cicle de síntesi proteica.

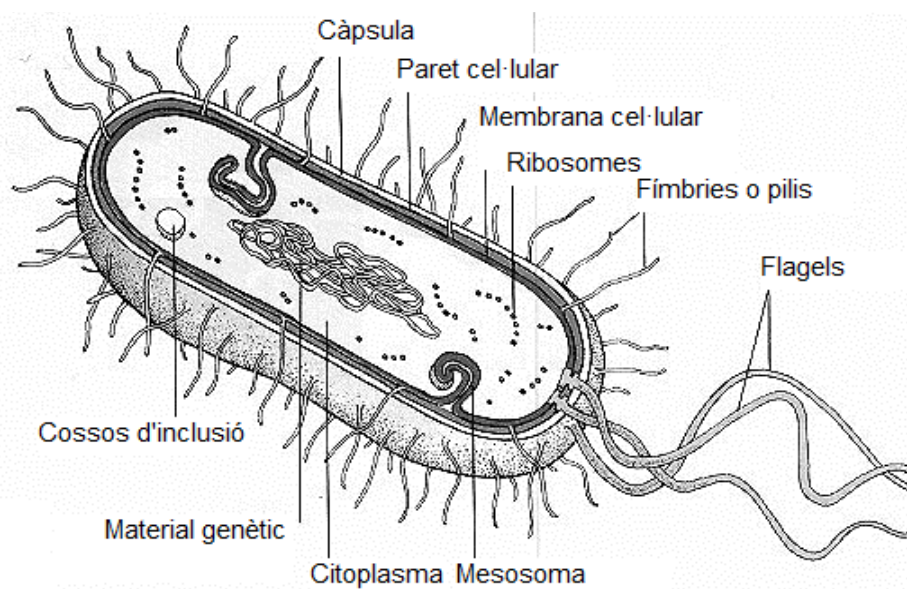
Mesosomes: penetracions de la membrana plasmàtica. Intervenien en la divisió cel·lular; és on es realitza part de la respiració cel·lular en bacteris aerobis; serveixen d'encaix per el DNA que serà el material genètic de cada una de les cèl·lules filles; i és on es troben les molècules necessàries per realitzar la fotosíntesi en bacteris fotosintètics.

Cossos d'inclusió: grànuls de matèria orgànica o inorgànica que poden estar rodejats per una membrana. La seva funció bàsica és emmagatzemar compostos energètics que seran utilitzats com a font d'energia.

Vacúols de gas: agrupació de petites vesícules allargades que estan plenes de gas anomenades vesícules de gas. Les vesícules estan proveïdes d'una paret proteica. Tenen com a funció regular la flotabilitat. No són indispensables per als bacteris.

Carboxisomes: són presents a molts bacteris autòtrofs (bacteris capaços d'utilitzar CO₂ per a cobrir la totalitat o la major part dels seus requeriments de carboni). Els carboxisomes són cobertes o sacs membranosos que contenen moltes còpies de l'enzim rubilosa-difosfat-carboxilasa (RuBisCO), l'implicat en la fixació de CO₂ atmosfèric.

Tilacoides: sacs membranosos aplanats que es troben a l'interior dels cianobacteris. Generalment se situen paral·lelament o adjacentment a la membrana cel·lular. En les seves membranes hi té lloc la fotosíntesi i fins i tot, en alguns casos, es pot dur a terme l'activitat respiratòria.



Estructura dels bacteris¹²

¹² Font:

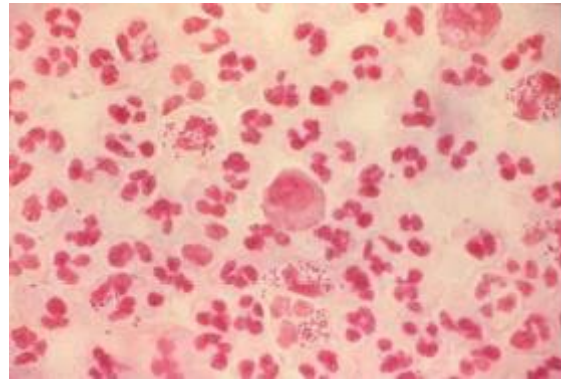
http://aulavirtual.usal.es/aulavirtual/demos/microbiologia/unidades/document/uni_02/57/caphtm/cap0401.htm

La forma dels bacteris ve determinada segons la rigidesa de la paret cel·lular. Depenent de quina forma adoptin, els podem classificar en cocs, bacils, vibrions, espirils o espiroquetes.

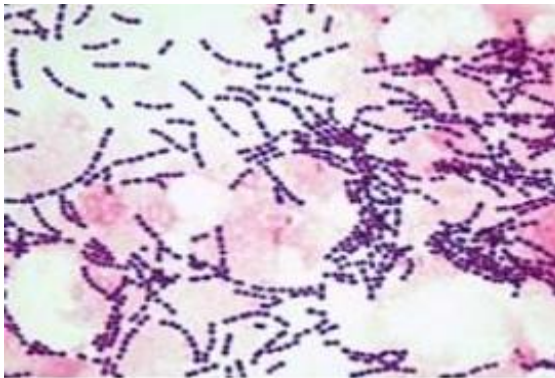
Cocs: tenen forma esfèrica o ovalar. Segons com s'associïn reben diferents noms: diplococs (parella), estreptococs (cadena), tètrada (agrupació de quatre en el pla), sarcines (estructura cúbica) i estafilococs (grapat de raïm).



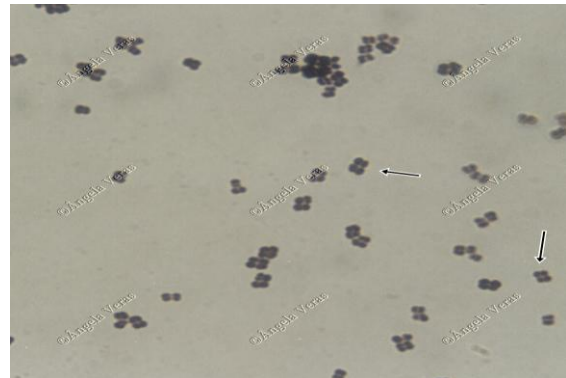
Cocs¹³



Diplococs¹⁴



Estreptococs¹⁵



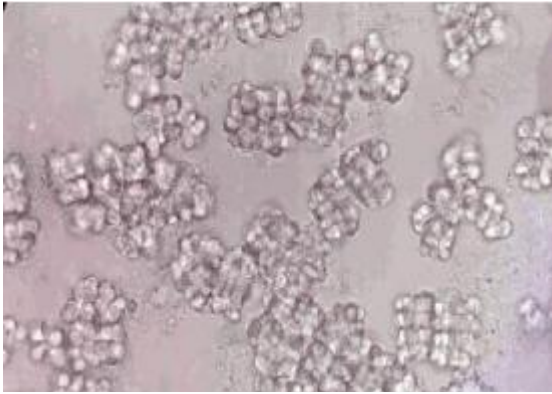
Tètrades¹⁶

¹³ Font: <http://bacterpato3b.blogspot.com.es/2011/11/cocos.html>

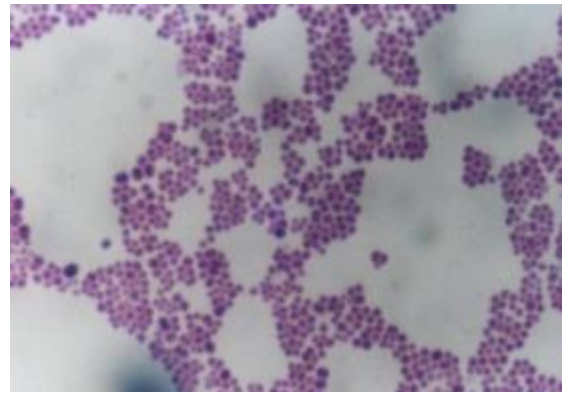
¹⁴ Font : <http://microdidatica.wordpress.com/microbiologia-geral/tipos-morfologicos-bacterianos-e-arranjos/1-cocos/>

¹⁵ Font: <http://www.dermapixel.com/2012/01/erisipela-el-estreptococo-ataca-de.html>

¹⁶ Font: <http://microdidatica.wordpress.com/microbiologia-geral/tipos-morfologicos-bacterianos-e-arranjos/1-cocos/>

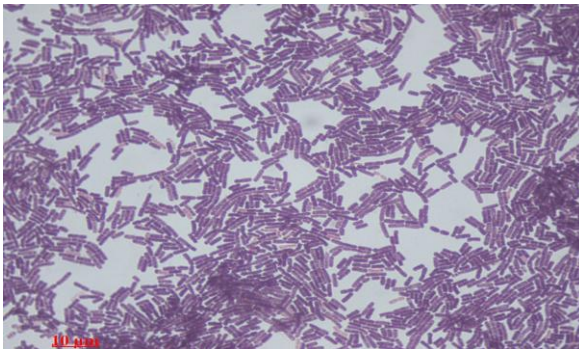


Sarcines¹⁷

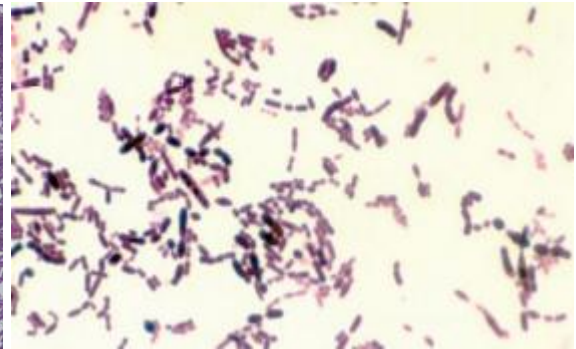


Estafilococs¹⁸

Bacils: són els que tenen forma de barra o vara. Els bacils s'agrupen de diferents maneres formant els coccobacils (lleugerament esfèrics), diplobacils (parella) i estreptobacils (cadena).



Bacils¹⁹



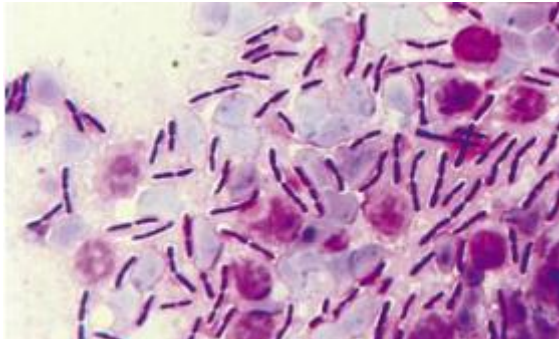
Coccobacils²⁰

¹⁷ Font: <http://www.keywordpicture.com/keyword/sarcina%20bacteria/>

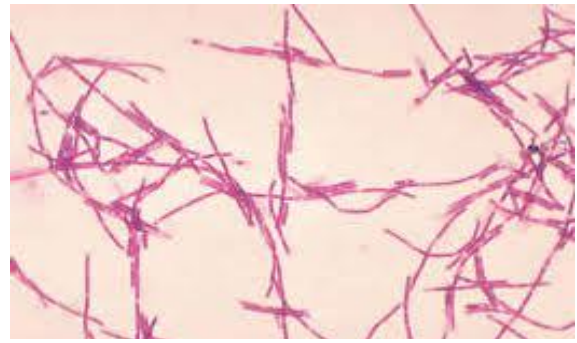
¹⁸ Font: <http://juliarabioifes.wordpress.com/2011/04/04/classificacao-das-bacterias-metodo-de-gram-morfologia/>

¹⁹ Font: http://en.wikipedia.org/wiki/Bacillus#mediaviewer/File:Bacillus_species.jpg

²⁰ Font: <http://zl.elsevier.es/es/revista/enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28/endoftalmitis-aguda-extraccion-catarata-13056693-diagnostico-primera-vista-2004>



Diplobacils²¹

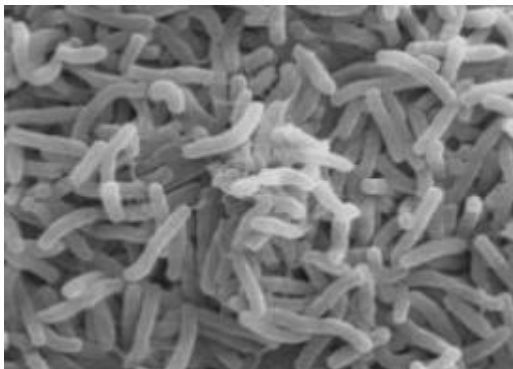


Estreptobacils²²

Vibrions: bacteris lleugerament corbats o en forma de coma.

Espirils: són els bacteris que tenen forma d'espiral.

Espiroquetes: bacteris que es presenten enrotllats.



Vibrons²³



Espirils²⁴



Espiroquetes²⁵

²¹ Font : <http://quizlet.com/51591440/medical-microbiology-lab-practical-1-flash-cards/>

²² Font : <http://quizlet.com/51591440/medical-microbiology-lab-practical-1-flash-cards/>

²³ Font : <http://ca.wikipedia.org/wiki/Vibri%C3%B3>

²⁴ Font : <http://ca.wikipedia.org/wiki/Espiril>

²⁵ Font : <http://ca.wikipedia.org/wiki/Espiroqueta>

1.3. Fisiologia

1.3.1. Nutrició i metabolisme

Els bacteris són organismes, tot i ser molt simples, capaços de dur a terme tots els tipus de metabolisme. Fins i tot, una mateixa espècie pot realitzar dos tipus diferents de metabolisme. Segons el tipus de metabolisme els podem classificar en:

- Quimioautòtrofs: capten energia química i s'alimenten a partir de substàncies inorgàniques. Exemples: bacteris de l'hidrogen, bacteris incolors del sofre, bacteris nitrificants, bacteris fèrmics.
- Quimioheteròtrofs: capten energia química i s'alimenten a partir de substàncies orgàniques. La majoria de bacteris són d'aquest tipus.
- Fotoautòtrofs: capten energia lluminosa i s'alimenten a partir de substàncies inorgàniques. Exemples: bacteris sulfurats verd i porpres.
- Fotoheteròtrofs: capten energia lluminosa i s'alimenten a partir de substàncies orgàniques. Exemples: bacteris porpres no sulfurats, bacteris vermells.

Taula 1. Tipus de metabolismes

		Font de Carboni	
		CO ₂ (AUTÒTROFS/ LITÒTROFS)	Matèria orgànica (HETERÒTROFS/ ORGANÒTROFS)
Font d'energia	Energia química d'enllaç (QUIMIÒTROFS)	Quimioautòtrofs/ quimiolitòtrofs	Quimioheteròtrofs/ quimioorganòtrofs
	Energia llum solar (FOTÒTROFS)	Fotoautòtrofs/ fotolitòtrofs	Fotoheteròtrofs/ fotoorganòtrofs

1.3.2. Relació

Gràcies a la capacitat de mobilitat, els bacteris poden realitzar diferents tipus de desplaçaments:

- Reptació sobre un substrat sòlid
- Moviments de contracció i dilatació
- Avançar mitjançant el moviment antihorari dels flagels
- Voltejar mitjançant el moviment horari dels flagels

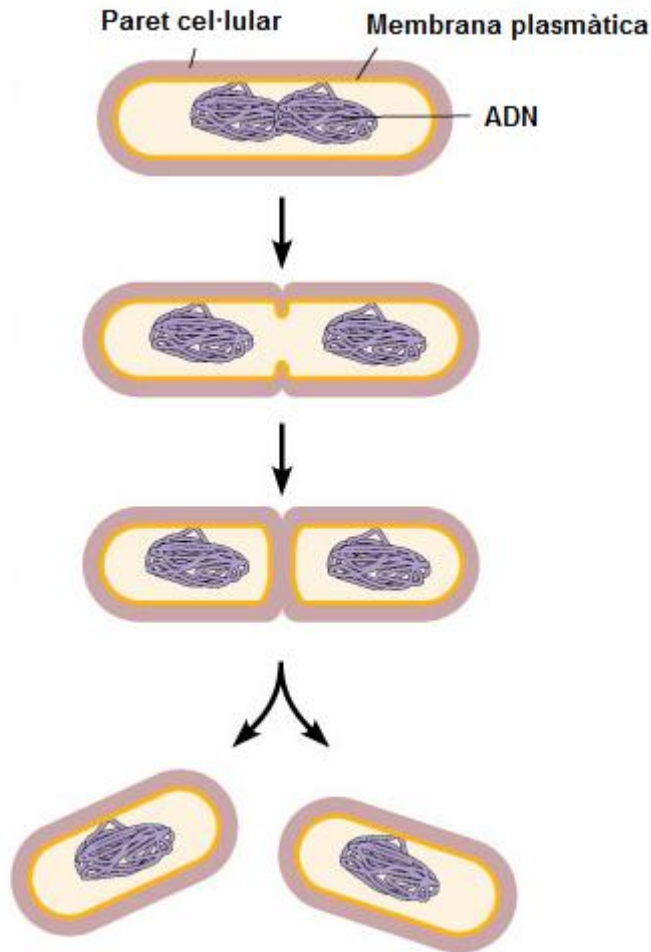
Davant d'estímuls lluminosos o bé químics presenten resposta. Una de les respostes davant de les variacions del medi és la formació d'espores. També poden respondre amb modificacions del metabolisme i, d'aquesta manera, protegeixen el DNA formant una complexa coberta que dona lloc a l'endòspora. Quan la resta de la cèl·lula bacteriana es destrueix, les endòspores queden lliures i reben el nom d'exòspores, que poden sobreviure molt de temps en condicions adverses. Quan les condicions tornen a ser adequades, les exòspores germinen i donen lloc a bacteris amb totes les seves funcions.

1.3.3. Reproducció

1.3.3.1. Bipartició

La major part de les cèl·lules bacterianes es reproduïxen asexualment per bipartició bacteriana. Mitjançant aquest tipus de reproducció s'obtenen dues cèl·lules filles amb idèntica informació genètica i contingut citoplasmàtic semblant. Amb aquest sistema es pretén aconseguir una colònia de cèl·lules amb material idèntic, però això no succeeix degut a que es produeixen un gran nombre de mutacions.

La reproducció comença quan la cèl·lula ha augmentat de mida i ha duplicat el DNA. El DNA s'uneix a l'ADN polimerasa dels mesosomes que separa el citoplasma en dos i reparteix les molècules de DNA duplicades a cada costat de la cèl·lula. La membrana cel·lular creix fins a formar un envà transversal que separa la cèl·lula en dues.



Esquema de la divisió bacteriana²⁶

1.3.3.2. Reproducció parasexual

La reproducció parasexual consisteix en una sèrie de mecanismes mitjançant els quals diferents bacteris, que poden ser de la mateixa espècie o no, intercanvien informació genètica. Podem trobar-ne tres tipus diferents :

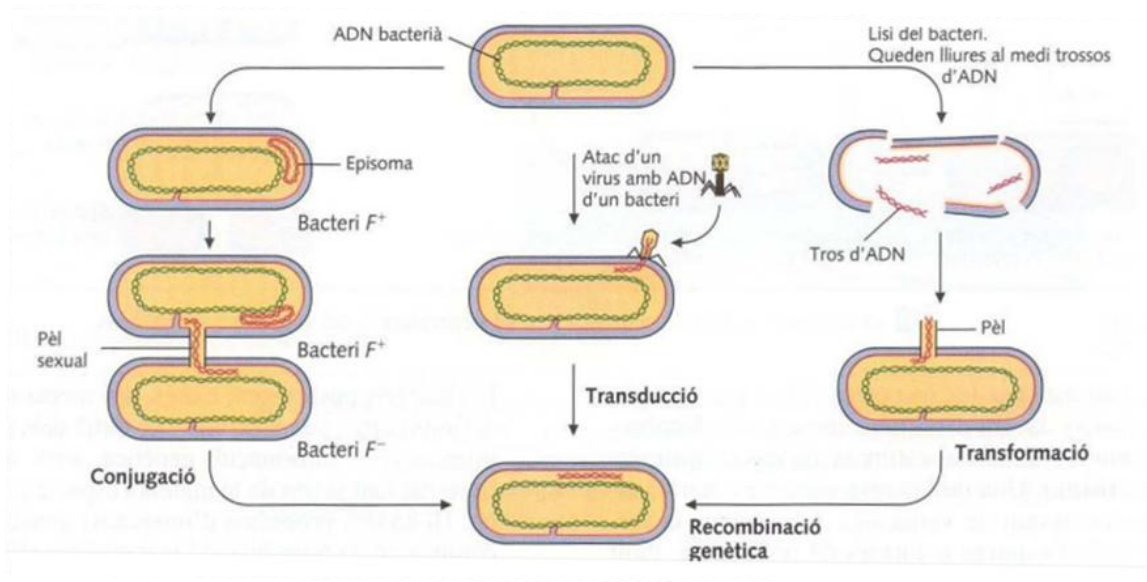
- 1) Conjugació:** en aquest procés intervenen dos bacteris. El primer en actuar es el bacteri donador o F^+ , que a més del seu DNA té un tipus de plasmidi (plasmidi F o factor F) que conté els gens encarregats d'informar de la producció dels pèls sexuals. Aquests pèls sexuals són ponts d'unió citoplasmàtica i a través seu es transmet la informació genètica del bacteri donador a un segon bacteri anomenat receptor o F^- . Es pot donar el cas que el plasmidi F (epistoma) s'introdueixi a l'anell de

²⁶Font: <http://classes.midlandstech.com/carterp/Courses/bio225/chap06/Microbial%20Growth%20ss4.htm>

DNA bacterià. Llavors, el bacteri donador rep del nom de Hfr (alta freqüència donadora). Aquest bacteri pot donar qualsevol gen a altres tipus de bacteris.

2) Transducció: consisteix en l'intercanvi genètic que requereix un agent transmissor (generalment un bacteriòfag) que transporta fragments de DNA parasitats que procedeixen de l'últim bacteri que ha parasitat.

3) Transformació: procés per mitjà del qual un bacteri introdueix al seu interior fragments de DNA procedents de la lisi d'altres bacteris que estaven lliures al medi.



Esquema de la reproducció parasexual bacteriana²⁷

1.3.4. Creixement

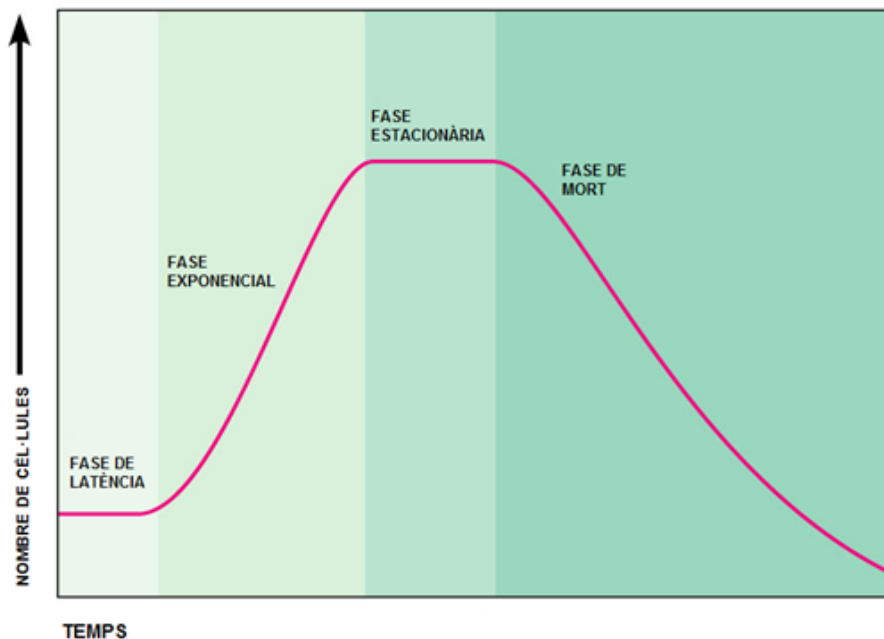
Quan parlem de creixement, ens referim a l'increment de totes les cèl·lules que componen un sistema, el que implica un augment de la massa cel·lular. En organismes pluricel·lulars, s'entén per creixement l'augment de la mida d'aquest organisme, però en el cas dels bacteris, que són organismes unicel·lulars, el creixement és l'augment de la població, no el de la mida de cadascun dels bacteris.

²⁷ Font: http://recursos.cnice.mec.es/biologia/bachillerato/segundo/biologia/ud07/02_07_04_02_032.html

El creixement bacterià està limitat per l'esgotament de nutrients o bé per l'acumulació de substàncies tòxiques producte del metabolisme. Com a conseqüència, el creixement es va reduint lentament fins al punt que s'atura.

El creixement es divideix en quatre fases:

- 1) Fase de latència:** en aquesta fase els bacteris s'adapten a les condicions del medi, per aquest motiu també rep el nom de fase adaptativa. Hi ha una gran activitat metabòlica però les cèl·lules no es divideixen.
- 2) Fase exponencial:** es caracteritza per la divisió cel·lular. Els antibacterians β -lactàmics actuen en aquesta fase ja que només són efectius quan la cèl·lula produeix peptidoglicà, és a dir, en la divisió.
- 3) Fase estacionària:** té lloc quan la taxa de creixement disminueix a causa que s'esgoten els recursos per als bacteris. El nombre de cèl·lules que creixen i el que moren és igual, per tant, el nombre de bacteris es manté constant.
- 4) Fase de mort:** disminueix el nombre de cèl·lules amb possibilitat de prosperar.



Corba del creixement bacterià²⁸

²⁸ Font: <http://cienciasdejoseleg.blogspot.com.es/2013/12/la-acumulacion-de-desechos-y-la.html>

2. ANTIBIÒTICS

Els antibiòtics són compostos químics, originalment produïts per microorganismes, que maten a altres microorganismes o bé impedeixen el seu creixement. Només tenen efecte sobre cèl·lules procariotes. La indústria farmacèutica ha desenvolupat compostos semi-sintètics a partir dels produïts pels microorganismes i, d'aquesta manera, en milloren la seva eficàcia. Els antibiòtics poden actuar de dues maneres: destruint el bacteri o bé inhibint el seu creixement.

2.1. Història dels antibiòtics

Es pot dir que l'inici de l'era antibacteriana va ser a principis de segle XX quan Paul Ehrlich²⁹ va estudiar el concepte de toxicitat selectiva, és a dir, l'activitat selectiva d'alguns microorganismes però no a cèl·lules humanes. Aquests estudis el van conduir al descobriment dels primers agents quimioterapèutics.

Va ser al 1928 quan Alexander Fleming³⁰ va descobrir accidentalment el primer antibiòtic: la penicil·lina. Fleming estava realitzant experiments quan va observar que una colònia de fongs havia crescut en plaques de petri amb *Staphylococcus aureus*. Més tard, va veure que les colònies bacterianes del voltant del fong eren transparents degut a que s'havia produït mort bacteriana. Fleming va caracteritzar el producte amb el nom de penicil·lina ja que el produïa un fong del gènere *Penicillium*. Aquesta troballa va ser subestimada fins que l'any 1939, Ernst Boris Chain³¹ y Howard Walter Florey³² van

²⁹ Paul Ehrlich (Strehlen, Alemanya 1854 - Bad Homburg vor der Höhe 1915) fou un bacteriòleg i professor universitari alemany guardonat amb el Premi Nobel de Medicina o Fisiologia el 1908. Font: Wiquipèdia. Paul Ehrlich [en línia]

http://ca.wikipedia.org/wiki/Paul_Ehrlich [consulta 15/9/14]

³⁰ Alexander Fleming (Lochfield, Escòcia, 6 d'agost de 1881 - Londres, Anglaterra, 11 de març de 1955) fou un biòleg, bacteriòleg i professor universitari escocès guardonat amb el Premi Nobel de Medicina o Fisiologia l'any 1945, famós per ser el descobridor de la penicil·lina. Font: Wiquipèdia. Alexander Fleming [en línia]

http://ca.wikipedia.org/wiki/Alexander_Fleming [consulta 23/12/14]

³¹ Ernst Boris Chain (Berlín, Alemanya, 1906 - Dublín, Irlanda, 1979) fou un bioquímic britànic, d'origen alemany, guardonat amb el Premi Nobel de Medicina o Fisiologia l'any 1945 per la seva recerca al voltant de la penicil·lina. Font: Wiquipèdia. Ernst Boris Chain [en línia]

http://ca.wikipedia.org/wiki/Ernst_Boris_Chain [consulta 23/12/14]

³² Howard Walter Florey (Adelaide, Austràlia 1898 - Oxford, Anglaterra 1968) fou un farmacòleg, patòleg i professor universitari australià guardonat amb el Premi Nobel de Medicina o Fisiologia l'any 1945 per la seva recerca sobre la penicil·lina. Font: Wiquipèdia. Howard Walter Florey [en línia]

desenvolupar mètodes per l'anàlisi i l'assaig de la penicil·lina i per a la seva producció a gran escala. També van ser els primers en assajar la penicil·lina en infeccions bacterianes en humans.

A partir d'aquest descobriment, la indústria farmacèutica va iniciar una cursa desenfrenada per a buscar nous compostos antibacterians, fet que va desencadenar l'inici de la coneguda "Era dels Antibiòtics" .

2.2. Classificació dels antibiòtics

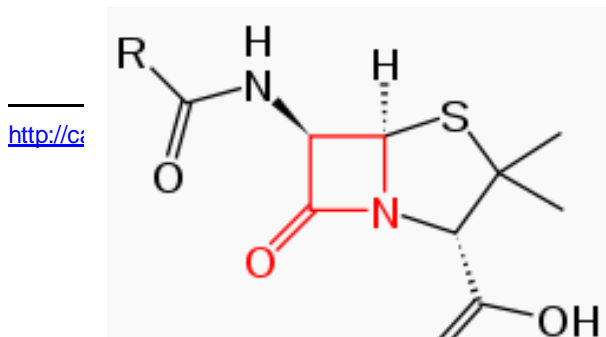
Es poden establir quatre classificacions antibiòtiques depenent del criteri que s'utilitzi: segons el seu origen, l'estructura, l'efecte sobre el creixement bacterià o bé l'espectre d'acció.

2.2.1. Segons l'origen

- Productes naturals: substàncies produïdes pel metabolisme d'organismes vius (principalment bacteris i fongs).
- Semisintètics: productes naturals amb modificacions químiques a la seva estructura que en milloren les seves propietats.
- Quimioterapèutics: són produïts de manera sintètica.

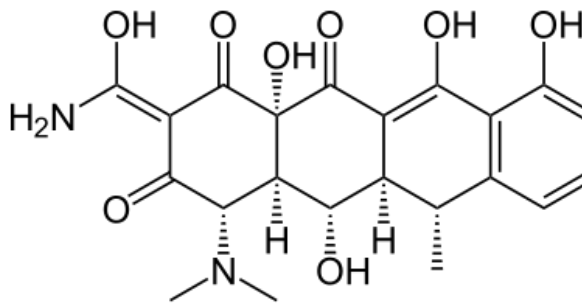
2.2.2. Segons l'estructura

- β -lactàmics: antibiòtics que contenen un nucli amb anell β -lactam, és a dir, un anell heteroatòmic (compost orgànic cíclic) que consta de tres àtoms de carboni i un àtom de nitrogen, en la seva estructura molecular. Un exemple d'antibiòtic β -lactàmic és la penicil·lina.



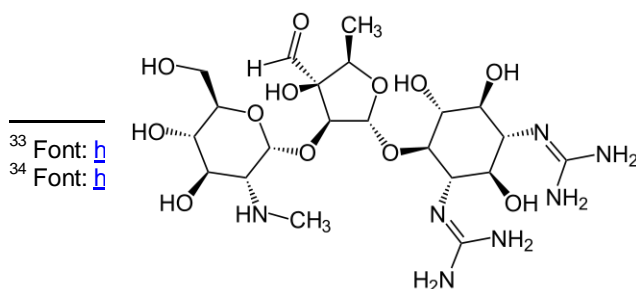
Estructura del nucli de les penicil·lines. En vermell l'anell β -lactam³³

- Tetraciclines: tenen una estructura formada per un nucli tetracíclic compost de quatre anells de benzè d'on es deriven la resta de les tetraciclines a partir la de substitució dels seus radicals R5, R6 i R7.



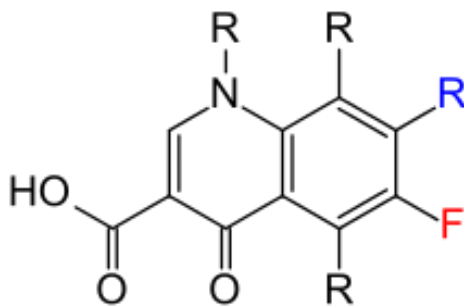
Estructura química de la doxiciclina³⁴

- Aminoglicosídics: es caracteritzen per tenir dos o més aminosucres units mitjançant un enllaç glicosídic a un nucli hexosa o aminociclitol que generalment es troba en posició central.



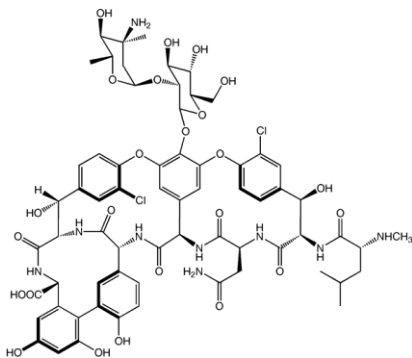
Estructura química de l'estreptomicina³⁵

- Quinolones: les seves característiques principals són l'efecte de quelant, és a dir, la formació d'ions amb metalls pesats i el caràcter àcid-base.



Estructura química de les quinilones³⁶

- Glicopèptids: estan compostos per pèptids no ribosòmics (unió de diversos aminoàcids mitjançant enllaços peptídics no sintetitzats per ribosomes) cíclics o policíclics.



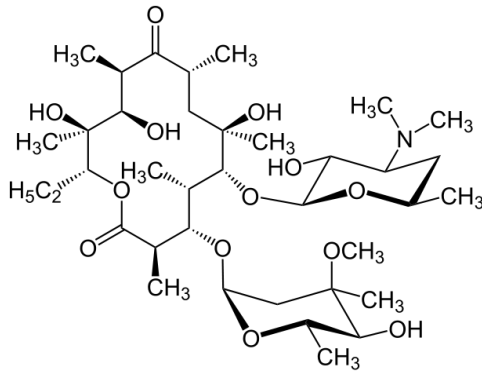
Estructura química de vancomicina, un antibiòtic glicopèptid³⁷

³⁵ Font: <http://ca.wikipedia.org/wiki/Estreptomicina>

³⁶ Font: <http://en.wikipedia.org/wiki/Quinolone>

³⁷ Font: <http://en.wikipedia.org/wiki/Vancomycin>

- Macròlids: la seva acció ve determinada per un anell de lactona, un compost orgànic del tipus èster cíclic que es forma com a producte de la condensació d'un grup alcohol amb un grup àcid carboxílic en una mateixa molècula.



Estructura química de l'eritromicina. Anell macròlid a l'esquerra³⁸

2.2.3. Segons l'efecte sobre el creixement bacterià

- Bactericides: produeixen la mort del bacteri.
- Bacteriostàtics: inhibeixen el creixement bacterià, però no maten el microorganisme. Quan se suspèn l'administració, pot recuperar-se i tornar-se a multiplicar.

2.2.4. Segons l'espectre

L'espectre és el conjunt d'agents patògens que poden ser afectats per les concentracions de l'antibiòtic.

- Espectre reduït: són actius davant de determinats grups de bacteris.
- Espectre ampliat: són eficaços contra grampositius i un grup reduït de gramnegatius.
- Espectre ampli: són actius davant la majoria de bacteris.

³⁸ Font: <http://ca.wikipedia.org/wiki/Macr%C3%B2lid>

2.3. Mecanismes d'acció dels antibiòtics

Per aconseguir destruir els bacteris o inhibir-ne el seu creixement, els antibiòtics tenen una sèrie de mecanismes que els permet travessar la barrera superficial del bacteri i fixar-se sobre alguna de les estructures o mecanismes bioquímics necessaris per reproduir-se o bé per sobreviure. Aquests mecanismes actuen de diferents maneres:

- 1) Inhibint la paret cel·lular
- 2) Inhibint la síntesi de proteïnes
- 3) Inhibint la síntesi d'àcids nucleics
- 4) Inhibint les funcions de la membrana plasmàtica

3. RESISTÈNCIA BACTERIANA

El terme resistència bacteriana es refereix a la resistència parcial o total de bacteris a l'efecte dels antibiòtics als que originalment eren vulnerables. Els organismes resistents poden suportar atacs de medicaments antimicrobians de tal manera que els tractaments convencionals es tornen ineficaços i les infeccions persisteixen, el que fa que augmenti el risc de propagació. Actualment la resistència dels bacteris als antibiòtics, segons la Organització Mundial de la Salut (OMS)³⁹, ha esdevingut un problema mundial per diversos motius:

Augmenta el risc de mort: si els bacteris es fan resistents a l'efecte de certs antibiòtics, les infeccions causades per aquests no responen als tractaments. Això prolonga la malaltia i posa en perill la vida de l'ésser humà.

Dificulta el control de les malalties infeccioses: la resistència redueix l'eficiència dels tractaments, els pacients estan més temps infectats i augmenta el risc de propagació dels resistents a altres individus.

³⁹ La OMS és l'autoritat directiva i coordinadora de l'acció sanitària en el sistema de les Nacions Unides. És la responsable d'exercir una funció de lideratge en els assumptes sanitaris mundials, configurar l'agenda de les investigacions en salut, establir normes, articular opcions de política basades en l'evidència, donar suport tècnic als països i vigilar les tendències sanitàries mundials. La OMS és l'autoritat directiva i coordinadora de l'acció sanitària en el sistema de les Nacions Unides. Font: OMS [en línia] <http://www.who.int/about/es/> [consulta 26/08/14]

Amenaça amb un retorn a l'era anterior als antibiòtics: l'aparició de la resistència als antimicrobians fa que algunes malalties es tornin intractables i incontrolables, sense cap tipus d'antibiòtic que pugui acabar amb elles.

Incrementa els costos d'atenció sanitària: com que moltes infeccions s'han tornat resistents, les teràpies originals han esdevingut ineficaces i es necessiten teràpies noves i més costoses. Per altra banda, les infeccions són més duradores i al seu torn també ho són les teràpies.

Amenaça els avenços de la societat en matèria d'atenció sanitària: la resistència bacteriana posa en perill els èxits de la medicina moderna. Si no hi ha antibiòtics eficaços, existeix el risc de dur a terme intervencions d'alt risc com ara els trasplantaments d'òrgans, les sessions de quimioteràpia contra el càncer i, fins i tot, operacions cirúrgiques.

Amenaça la seguretat sanitària i perjudica el comerç i l'economia: si hi ha un augment del comerç mundial i dels viatges internacionals, incrementa el risc que els microorganismes resistents es propaguin a països on aquests no eren presents.

3.1. Tipus de resistència

La resistència bacteriana pot ser de dos tipus: natural o adquirida

Quan parlem de resistència natural, també anomenada intrínseca, ens referim a una propietat específica dels bacteris. La seva aparició és anterior a l'ús dels antibiòtics degut a mutacions cromosòmiques espontànies. Això implica que no totes les espècies bacterianes són susceptibles de manera natural o intrínseca als antimicrobians.

Pel que fa a la resistència adquirida, sorgeix quan un microorganisme, sobre el qual l'antibiòtic era eficaç, s'exposa contínuament a aquest. Això fa que es produeixi un creixement de cèl·lules resistents i emergeix una nova població de cèl·lules passives a l'acció dels antibiòtics. Aquest tipus de resistència es pot produir per la mutació de gens cromosòmics ja existents, per adquisició de material genètic aliè o per mutació de material genètic adquirit.

3.2. Origen i factors que influeixen en la resistència

Originalment s'ha parlat de l'origen dels gens de resistència com a gens procedents dels propis bacteris. Aquests bacteris disposen de mecanismes que els permeten defensar-se dels antimicrobians de manera que eviten la seva pròpia mort. Aquests mecanismes estan codificats en gens de resistència i, si són captats pels bacteris patògens, esdevindran resistents.

Un altre possible origen podrien ser els gens implicats en processos de detoxificació, és a dir, l'eliminació de tòxics del bacteri, com senyalitzadors en la comunicació intercel·lular o bé altres molècules que intervenen en el metabolisme bacterià.

Segons la OMS tot i que la resistència als antimicrobians és un fenomen natural, hi ha algunes activitats humanes que acceleren la seva aparició i propagació. Aquestes activitats són: la falta d'una resposta integral i coordinada a aquest fenomen, la manca de sistemes per a la vigilància i el seguiment de la resistència als antimicrobians, l'ús de sistemes insuficients per a assegurar la qualitat i el subministrament ininterromput de medicaments, un ús inapropiat de medicaments antimicrobians, la pràctica ineficient per a la prevenció i el control de la infecció i la falta d'instruments de diagnòstic, prevenció i tractament.

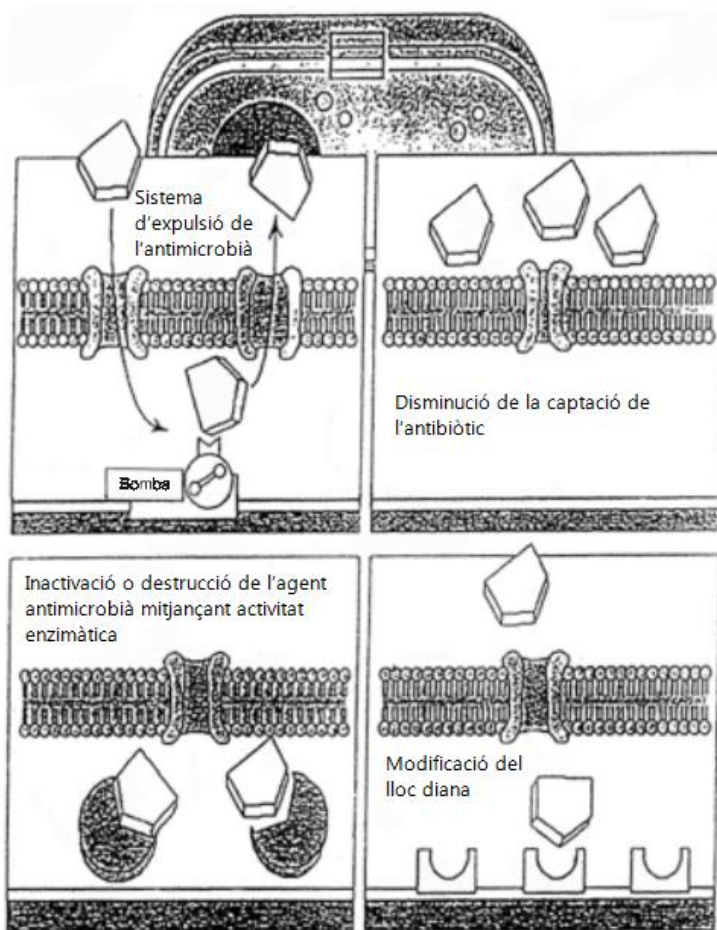
3.3. Mecanismes de resistència

Els bacteris poden utilitzar quatre mecanismes per fer-se resistents a l'acció dels antibiòtics:

- 1) Disminució de la captació de l'antibiòtic:** consisteix en la disminució de la permeabilitat de la membrana, amb la pèrdua o modificació dels canals d'entrada, les purines.
- 2) Sistema d'expulsió de l'antimicrobià:** unes bombes de reflux d'antimicrobians que depenen de l'energia, són les encarregades d'expulsar l'antibiòtic un cop ha entrat al bacteri. Actua contra el gradient de concentració.
- 3) Inactivació o destrucció de l'agent antimicrobià mitjançant activitat enzimàtica:** si el bacteri no ha pogut evitar l'entrada de l'antibiòtic, o no

ha sigut capaç d'expulsar-lo, el que fa és desactivar-lo o destruir-lo. Per defensar-se, els bacteris han desenvolupat mecanismes enzimàtics.

4) Modificació del lloc diana: es basa en la pèrdua d'afinitat i impossibilitat de destrucció del microorganisme. Aquesta modificació es pot produir a nivell ribosòmic, alterant el lloc diana intracel·lular, o bé pot ser a nivell extracel·lular mitjançant la modificació de l'enzim blanc en la paret bacteriana.



Esquema dels diferents tipus de mecanismes de resistència ⁴⁰

Fonamentalment, hi ha dues estratègies utilitzades pels bacteris per tornar-se resistents als antibiòtics:

⁴⁰ Font: http://bvs.sld.cu/revistas/mil/vol32_1_03/mil07103.pdf

Mutacions: els bacteris tenen la capacitat de dividir-se molt ràpidament i tenen una alta taxa de mutació, és a dir, una elevada possibilitat de modificar el seu DNA. La mateixa pressió selectiva de l'antibiòtic afavoreix l'aparició d'una població resistent mentre que la que n'és sensible mor.

Captació de gens de resistència exògens: els bacteris poden adquirir material genètic exogen que els hi permeten sobreviure en presència d'antibiòtics. Aquest material genètic pot ser adquirit mitjançant contacte físic directe amb altres bacteris (conjunció), per adquisició de "DNA despulat" a través dels porus de les cobertes cel·lulars que tenen alguns bacteris de forma natural (transformació) o per infeccions amb virus (transducció).

3.4. Resistència en els principals grups d'antibiòtics

- **β-lactàmics:** aquest tipus d'antibiòtic és el més utilitzat, per això la resistència que alguns bacteris presenten suposa un problema important. Els bacteris poden desenvolupar tres tipus de resistència, que són independents, és a dir, poden actuar per separat, però també poden actuar conjuntament, que és quan presenten major efecte. Els mecanismes són els següents: alteració del lloc diana, la producció d'enzims desactivants (β-lactamases) que poden produir la resistència total i, finalment, la modificació de la membrana externa. Aquest darrer mecanisme, si actua sol no té gaire importància però conjuntament amb la producció d'enzims desactivants representa un problema greu.
- **Tetraciclines:** els mecanismes més importants són l'expulsió activa i la producció de proteïnes citoplasmàtiques que impedeixen la unió de la molècula al ribosoma. També existeix la modificació enzimàtica codificada per transposons però no és tan freqüent.
- **Aminoglicosídics:** el mecanisme principal és la inactivació enzimàtica duta a terme pels plasmidis. També trobem alteracions en la permeabilitat de la membrana i mutacions cromosòmiques.
- **Quinolones:** el mecanisme de resistència més freqüent és l'alteració del lloc diana. Recentment, també estan esdevenint importants els mecanismes d'expulsió que impedeixen aconseguir concentracions

intracel·lulars d'antibiòtics, d'altres que dificulten el pas a través de la paret i finalment, ha aparegut un plasmidi amb resistència múltiple.

- Glicopèptids: es presenta resistència degut a la incapacitat de la molècula de travessar la membrana externa i, per tant, d'arribar al lloc diana.
- Macròlids: com a conseqüència de ser hidrofòbics, és a dir, repel·lits per l'aigua, no aconsegueixen travessar correctament la membrana externa. També es presenta resistència per metilacions que impedeixen la unió del fàrmac al ribosoma 50S.

PART PRÀCTICA

1. OBJECTIUS

En aquesta part pràctica el que ens proposem és estudiar l'activitat antimicrobiana d'un compost tensioactiu, en concret del N^α-lauroyl-arginine methyl ester (LAM). El procés s'ha dut a terme gràcies a l'estada realitzada durant tres setmanes a l'Institut de Química Avançada de Catalunya i al departament de Microbiologia de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona.

Aquesta pràctica es divideix en dos punts: la síntesi d'un compost tensioactiu i la determinació de l'activitat antimicrobiana d'aquest. En el primer punt s'explica el procés realitzat per obtenir el compost tensioactiu, mentre que al segon comprovem l'activitat d'aquest compost enfront diferents microorganismes.

2. METODOLOGIA

La realització d'aquesta part pràctica comporta la utilització de diferents tècniques experimentals que s'expliquen a continuació.

2.1. Seguiment de la reacció

El procés de seguiment d'aquesta reacció es du a terme mitjançant la cromatografia líquida d'alta precisió (HPLC).

Instrumentació utilitzada: Cromatògraf HPLC model LaChrom ELITE VWR Hitachi, Bomba L-2130, Injector L2224, Detector L2400 UV. i Columna Lichrospher 100 CN de 5 µL, 250 x 4 mm.

El mètode de cromatografia líquida d'alta precisió es basa en la separació dels components d'una mescla i, d'aquesta manera, poden ser identificats i quantificats. El sistema cromatogràfic consta de dues fases: la fase mòbil, on s'injecta una mescla d'aigua i acetonitril i una fase estacionària. Les interaccions dels compostos amb les dues fases donen com a resultat els diferents temps de retenció que ens permeten comprovar si la reacció avança correctament.

2.2. Rotavaporació

Instrumentació: Rotavapor BUCHI, model R-210.

El mètode de rotavaporació s'utilitza per eliminar dissolvents en substàncies a través de l'evaporació. El que fa l'aparell és disminuir la pressió fent el buit a la dissolució que conté el matràs. Això fa que el punt d'ebullició de la dissolució disminueixi i, per tant, l'evaporació resulta més fàcil i ràpida. El dissolvent extret que està evaporat va per un conducte fins a un circuit on es refreda, es condensa i arriba a un col·lector on es pot recuperar. El dissolvent i els compostos sòlids queden separats.

2.3. Estudi de l'activitat antimicrobiana

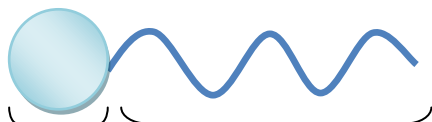
Instrumentació utilitzada: Caldo Müeller Hinton de OXOID Ltd. Basingstoke, Hampshire, UK., Plaques de petri estèrils, Plaques microtiters, Micropipeta automàtica de 8 canals de LABBOX LABWARE.

L'estudi de l'activitat antimicrobiana s'ha dut a terme en un ambient artificial (*in vitro*). S'han utilitzat bacteris grampositius, bacteris gramnegatius i un fong. L'estudi consisteix en determinar la concentració més baixa que es necessita per inhibir el creixement d'un microorganisme, el que s'anomena concentració mínima inhibidora (C.M.I.).

3. SÍNTESI D'UN COMPOST TENSOACTIU

3.1. Compostos tensioactius

Els tensioactius són compostos químics que, a la mateixa molècula, contenen un grup hidròfob (no soluble en aigua), generalment format per una cadena hidrocarbonada, i un grup hidròfil (soluble en aigua). Es tracta de dos grups funcionals oposats; no polar i polar, respectivament.



Grup hidròfil Grup hidròfob

Estructura d'un compost tensioactiu

3.1.1. Propietats físico-químiques dels compostos tensioactius en dissolució

Quan un compost tensioactiu es troba en dissolució pot presentar diverses propietats:

- Tensió superficial: tensió en la capa superior d'un líquid, dirigida al seu interior, degut a les atraccions entre les molècules situades a la superfície existent i les existents sota de dita superfície.
- Poder humectant: capacitat d'una substància que fa que els líquids s'estenguin sobre la seva superfície.
- Poder escumant: capacitat per formar un conjunt de cel·les gasoses, separades per làmines fines de líquid, formats per la superposició de bombolles originades per una dispersió d'un gas en un líquid, dit en altres paraules, escuma.

3.1.2. Fenòmens relacionats amb les associacions moleculars de tensioactius

- Micel·lació: a partir d'una certa concentració crítica, els compostos tensioactius tenen la tendència de formar micel·les, agregats organitzats de molècules, d'ions, o dels dos.
- Poder solubilitzant: capacitat que té un agent de superfície en dissolució per poder concedir a cossos poc solubles en dissolvents purs una solubilitat aparent per formació de micel·les.
- Poder dispersant: capacitat d'una substància per promoure la formació d'un sistema de dos o més fases (dispersió), de les quals una és contínua i, almenys, una altra està finament dividida.
- Emulsions: mescla de dos o més líquids immiscibles on un d'ells es troba distribuït en l'altre en forma de gotes finament dividides. El que es

troba al voltant de les petites gotes rep el nom de fase externa, contínua o dispersant, i les petites gotes són anomenades fase interna, discontinua o dispersa.

- Microemulsions: dispersions estables de líquids immiscibles que es formen espontàniament i són estabilitzades per tensioactius amb un balanç hidròfil-hidròfob adequat.

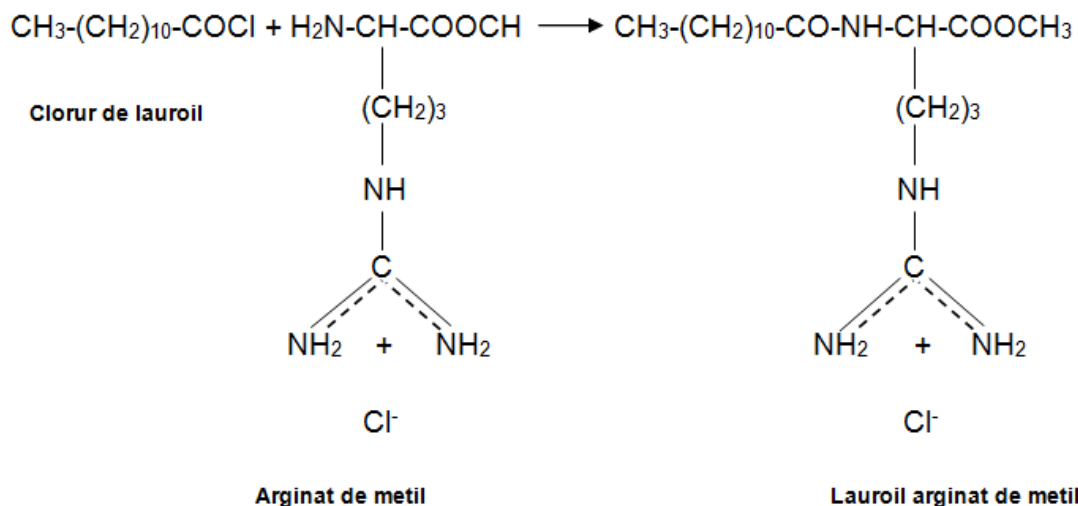
3.1.3. Tipus de tensioactius

Els compostos tensioactius es poden dividir en quatre grans grups: aniònics, catiònics, no iònics i anfotèrics.

- Aniònics: compost que posseeix un o diversos grups funcionals que s'ionitzen en dissolució aquosa originant ions orgànics amb càrrega negativa i responsables de l'activitat superficial.
- Catiònics: compost químic amb un o diversos grups funcionals que s'ionitzen en dissolució aquosa, originant ions orgànics carregats positivament i responsables de l'activitat superficial.
- No iònics: compost que en dissolució aquosa no origina ions. La seva solubilitat en aigua és deguda a la presència a la seva molècula de grups funcionals amb una elevada afinitat per l'aigua.
- Anfotèrics: compost que posseeix a la seva estructura molecular un o més grups funcionals que poden ionitzar-se en dissolució aquosa, conferint al compost el caràcter de tensioactiu aniònic o catiònic, segons les condicions del medi.

3.2. Procés de síntesi del LAM

Per a realitzar la síntesi d'aquest compost, fem reaccionar arginat de metil ($C_7H_{16}N_4O_2$) amb clorur lauroil ($C_{12}H_{23}ClO$).



Esquema de la reacció

En primer lloc preparam dues mostres de cadascun dels reactius i s'analitzen per l'HPLC. L'HPLC ens dóna els temps de retenció dels reactius que podem comprovar amb els que anem obtenint durant l'avanç de la síntesi (veure temps de retenció a l'Annex I).

El procés per dur a terme les preparacions per l'HPLC consisteix en dissoldre 5 mg del compost que es vol estudiar en 500 µL de metanol (CH₄O) dins d'un vial i portar-los a l'HPLC.



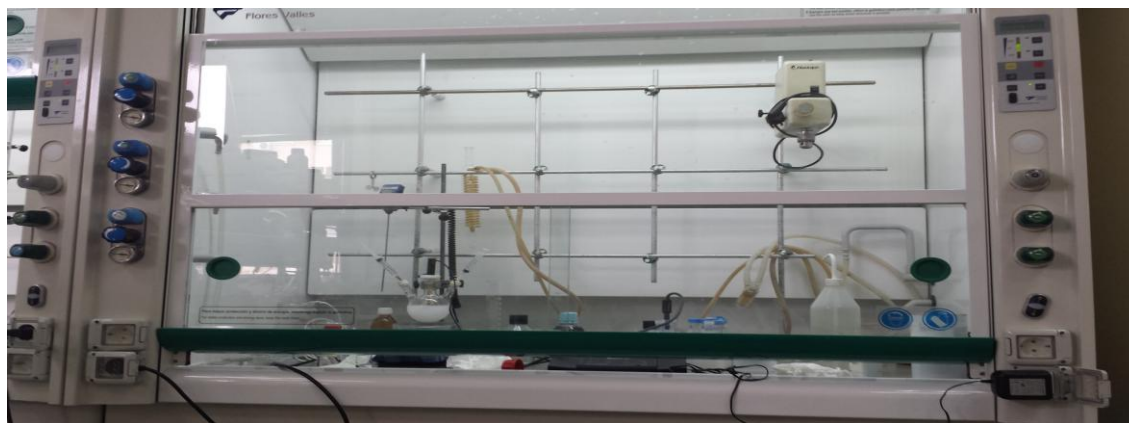
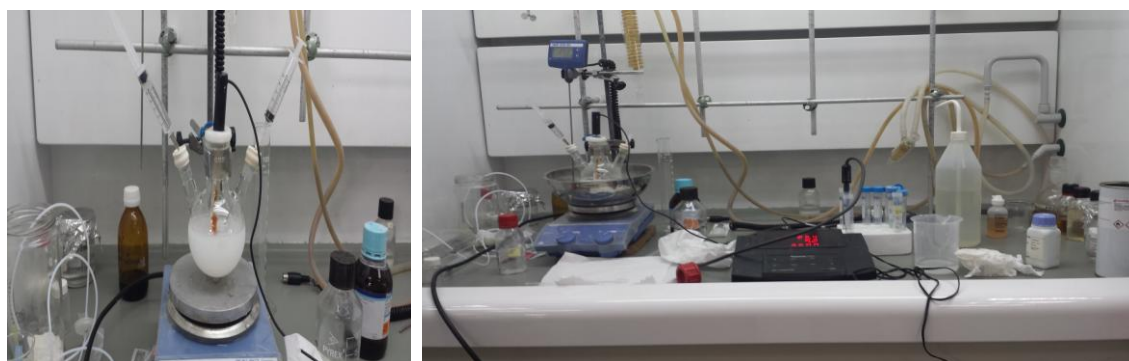
Imatges de l'HPLC⁴¹

En un matràs rodó amb tres boques dissolem 3 g d'arginat de metil en 200 mL d'una mescla acetona/aigua (30/70). En una de les boques col·loquem una xeringa amb una dissolució aquosa de Na(OH) i en l'altra una xeringa que conté el clorur d'àcid. Es porta la solució del matràs fins a pH=11 amb Na(OH) i a 0 °C mitjançant un bany de gel. A continuació afegim gota a gota el clorur

⁴¹ Font: fotografia de l'autora

d'àcid. Durant tot el procés es manté el pH de la reacció a 11 mitjançant l'addició de Na(OH).

L'avanç de la reacció es controla amb mesures d'HPLC. Quan tot el producte de partida (arginat de metil) ha reaccionat aturem la reacció afegint HCl fins pH=6. Es deixa el cru de reacció a pH=5 durant una nit a 4 °C i al següent dia apareix un precipitat blanc. Filtrem i rotavaporem per separar el precipitat del dissolvent i el sòlid es cristal·litza varies vegades en metanol/acetoneitril. Quan el producte és pur, el dissolem en aigua i es liofilitza.



Instantànies del procés de síntesi⁴²



Imatges del rotavapor⁴³

4. SEMBRA DE MICROORGANISMES

4.1. Procés de sembra

En aquest treball s'ha determinat la concentració mínima inhibidora (C.M.I.) de dos tensioactius purs, un de catiónic (LAM) i un altre iònic (decanoil leucina (DL)). Així mateix s'ha determinat la C.M.I. de mescles d'aquests dos compostos en dos proporcions diferents: LAM/DL (8/2) i LAM/DL (2/8).

Es prepara una solució concentrada (10 mg/ 2 mL) de cadascun dels productes a assajar: LAM, DL, LAM/DL (8/2) i LAM/DL (2/8). Totes aquestes dissolucions es fan en aigua excepte la del DL que es fa en dimetilformamida perquè el producte no es soluble en aigua. A partir d'aquestes dissolucions es fan unes altres 7 solucions més diluïdes de manera que al final ens quedin les següents concentracions: 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312, 0.156, 0.078, 0.039 mg/mL.

El procediment és el següent: Per fer la primera dilució, en un vial afegim 500 µL (el que és equivalent a 0,5 mL) de la dissolució inicial i 500 µL d'aigua. Per la segona, agafem 500 µL de la primera dilució i hi afegim 500 µL d'aigua. Per

⁴³ Font: Fotografia de l'autora



la tercera, 500 µL de la segona dilució i 500 µL i així successivament fins a arribar a 8.

Imatge de les 32 dilucions fetes⁴⁴

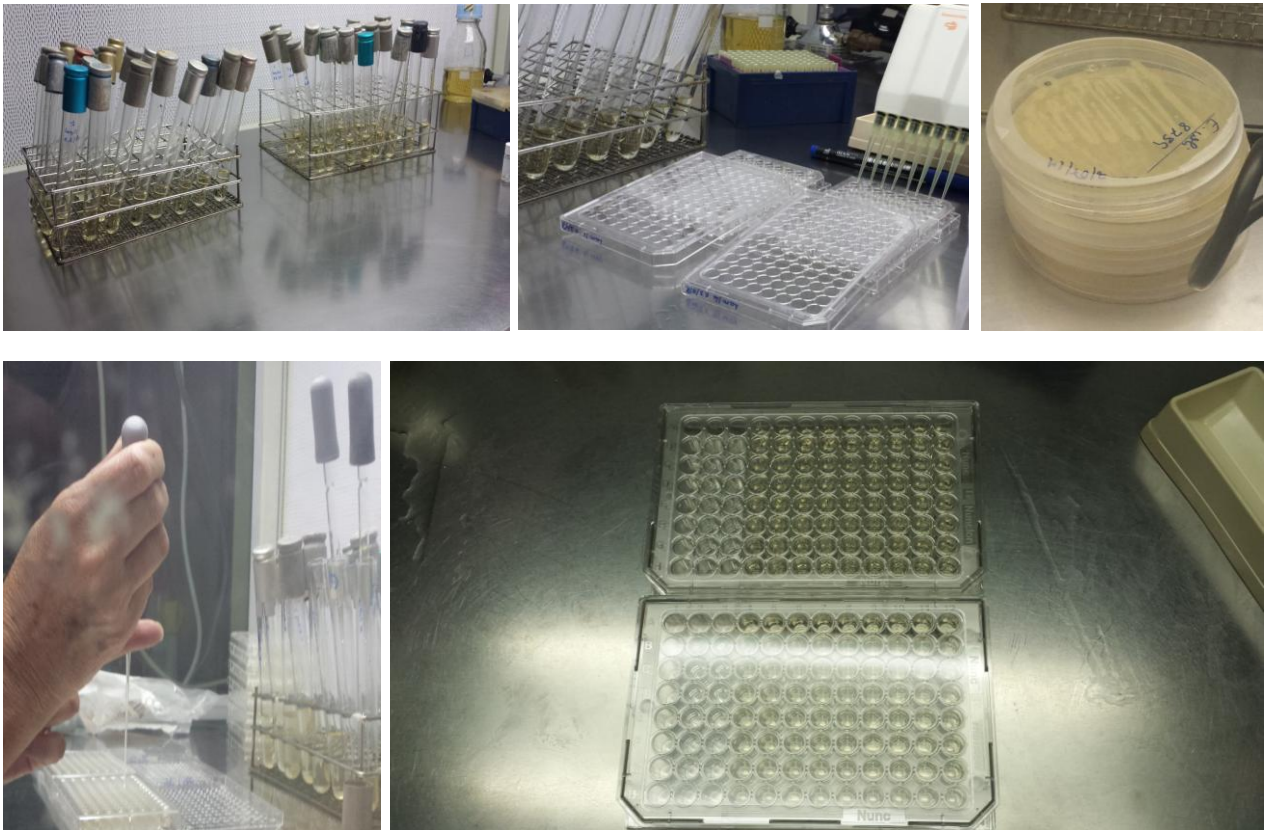
Un cop preparades totes les dilucions, afegim 260 µL de cadascuna en uns tubs d'assaig amb 5 mL caldo de cultiu. Ho fem de la més diluïda a la més concentrada, així no és necessari canviar cada vegada les puntes de la pipeta. Amb la micropipeta de 8 canals introduïm 200 µL de les dissolucions dels tubs (caldo i dilucions) a cadascun dels pouets de les plaques microtiters classificats en columnes (1, 2, 3, 4, ... 12). Cada columna correspon a una concentració diferent i a la primera fila només posem caldo per comprovar que els microorganismes creixin bé (control). Ho tornem a fer de la menys diluïda a la més per no canviar puntes ni banyera. A cada pouet de cada fila introduïm una gota dels microorganismes cultivats prèviament. Els agafem de les plaques de petri amb una vareta d'acer i els posem als tubs on només hi ha caldo. Cada vegada que agafem un microorganisme esterilitzem el material amb un fogó. Cada placa microtiter es fa per duplicat. Els microorganismes utilitzats són: *M. luteus*, *K. pneumoniae*, *S. epidermis*, *E. coli*, *C. albicans*, *C. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*. Quan els hem posat tots ho deixem a l'estufa a 37°C durant 24 hores.

← + concentració de compost -

Caldo (control)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>M. luteus</i>	●	●	●	●	●	●	●	●	●
<i>K. pneumoniae</i>	●	●	●	●	●	●	●	●	●
<i>S. epidermis</i>	●	●	●	●	●	●	●	●	●
<i>E. coli</i>	●	●	●	●	●	●	●	●	●
<i>C. albicans</i>	●	●	●	●	●	●	●	●	●
<i>P. aeruginosa</i>	●	●	●	●	●	●	●	●	●
<i>B. subtilis</i>	●	●	●	●	●	●	●	●	●

Esquema de la placa microtiter⁴⁵



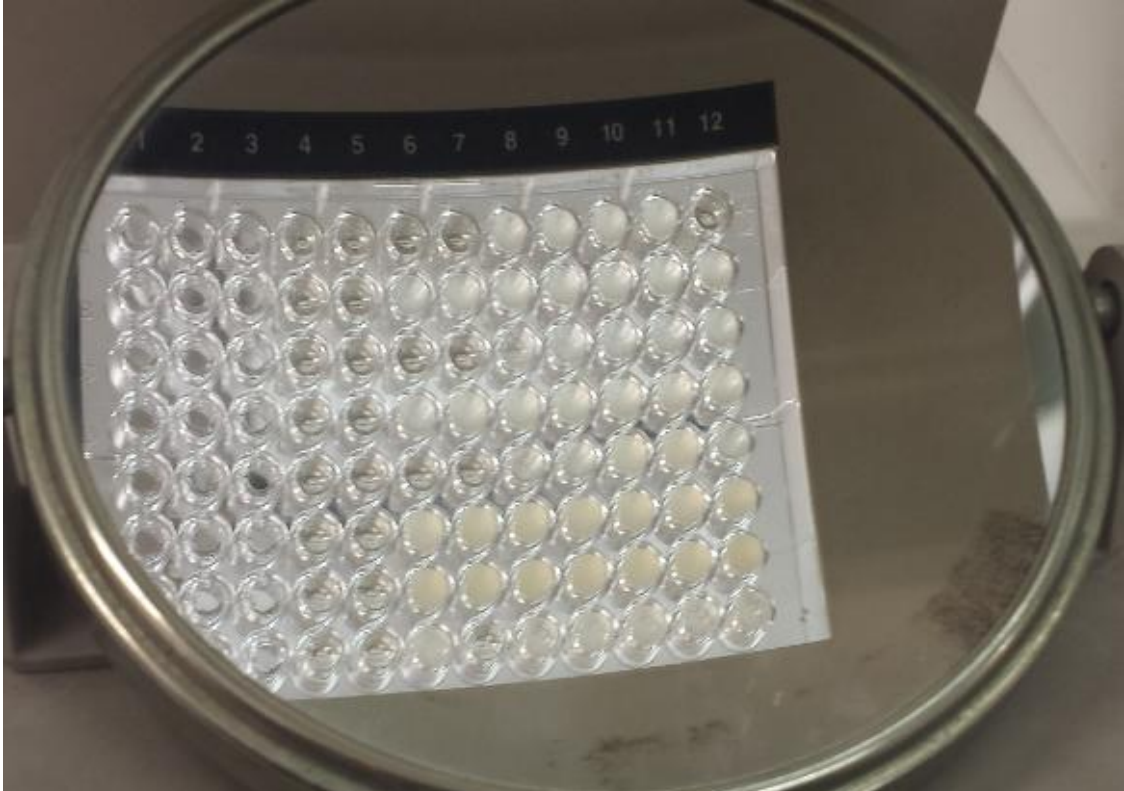
Instantànies fetes durant la sembra de microorganismes⁴⁶

4.2. Resultats

Per conèixer els resultats, col·loquem les plaques microtiters a un mirall amb augments i a ull nu mirem fins a quin pouet s'ha inhibit el creixement dels microorganismes. El procediment és molt simple: on el contingut del pouet sigui tèrbol, voldrà dir que els microorganismes han crescut, en canvi on sigui transparent serà on el compost ha pogut aturar el creixement.

⁴⁵ Font: fotografia de l'autora

⁴⁶ Font: fotografia de l'autora



Placa microtiter vista amb un mirall amb augments⁴⁷

Taula 2. Valors de C.M.I. obtinguts pels tensioactius purs i per les seves mescles.

		LAM (µg/mL)	DL (µg/mL)	LAM/DL (2/8) (µg/mL)	LAM/DL (8/2) (µg/mL)
Bacteris grampositius	<i>M. luteus</i>	32	32	128	32
	<i>S. epidermis</i>	16	> / >	64	32
	<i>C. aureus</i>	64	> / >	> / >	128

⁴⁷ Font: fotografia de l'autora

	<i>B. subtilis</i>	64	> / >	> / 1	32
Bacteris gramnegatius	<i>K. pneumoniae</i>	256	> / >	> / >	128
	<i>E. coli</i>	64	> / >	> / >	128
	<i>P. aeruginosa</i>	128	> / >	> / >	128
Fong	<i>C. albicans</i>	64	256	>	32

Com es pot observar a la Taula 2, el Lam presenta un major efecte antibacterià que no pas el DL, de fet el LAM és actiu enfront de tots el microorganismes assajats mentre que el DL només és actiu davant del *M. luteus* i *C. albicans*. La major activitat del LAM és deguda al seu caràcter catiònic. Les membranes dels microorganismes tenen cargues negatives i per això els tensioactius catiònics interaccionen millor i tenen una activitat antimicrobiana superior.

També hem observat que la mescla de LAM/DL (8/2) manté una activitat similar a la del LAM pur, en canvi la mescla en la qual el LAM està en menor proporció gaire bé no presenta activitat. Això pot ser atribuït al fet que el LAM és el compost que presenta millor activitat, quan aquest producte és en una proporció molt baixa la mescla perd l'activitat.

CONCLUSIONS

En la primera part d'aquest treball hem pretès donar a conèixer què són els bacteris, així com el seu comportament, mutacions i altres característiques. Així mateix, ens hem endinsat en el món dels antibiòtics com a elements

d'eliminació bacteriana. Aquests coneixements ens han permès encarar una de les problemàtiques que més amoïnen actualment a la comunitat científica: la resistència bacteriana. També hem evidenciat el perquè d'aquesta resistència, masses vegades fruit del mal ús dels antibiòtics (entès com tractaments inacabats o un excés del seu consum) per part de la població, però també a causa de les mutacions accidentals dels bacteris.

Tant és així aquesta resistència que, segons la notícia apareguda a la publicació digital *eldiario.es*⁴⁸ i que fa referència a un estudi d'Ana García Tello, uròloga de l'Hospital de Getafe (Madrid), el consum d'antibiòtics ha augmentat un 15,7% els darrers 12 mesos. Per altra banda aquesta mateixa notícia situa l'Estat espanyol com a un dels països majors consumidors d'antibiòtics amb una dosi diària de 24,3 per cada 1.000 habitants. La mitjana europea és de 20,5 i països com Holanda són dels menys consumidors amb el 10,8, menys de la meitat que l'Estat espanyol. L'OMS adverteix, en un informe global sobre resistència microbiana, que el món s'apropa a una era en la que els antibiòtics actuals seran inútils i les infeccions comunes tornaran a ser mortals⁴⁹.

Aquestes dades, juntament amb els coneixements plasmats en aquest Treball de Recerca, posen en evidència l'existència d'un problema tant en tot allò que fa referència a la resistència com al consum desmesurat i en contínua ascendència. Coneixements com aquests han de servir per fixar les "regles del joc" que haurien de permetre determinar quins han de ser els comportaments de la població davant d'aquests fenòmens. Les autoritats sanitàries, per altra banda, tenen un paper determinant que fins ara, d'acord amb les dades de la doctora Ana García Tello, si més no, li ha mancat efectivitat. Cal que aquests responsables sanitaris emprenguin accions que contribueixin a donar el tomb a aquesta situació. També és del tot necessari que la indústria farmacèutica jugui

⁴⁸ REJÓN, RAÚL. Crece un 15% el uso de antibióticos y las bacterias se vuelven cada vez más resistentes. *Eldiario.es* [en línia] http://www.eldiario.es/sociedad/consumo-antibioticos-disparano_0_327917846.html [consulta 3/1/15]

⁴⁹ SALAS, JAVIER. La resistencia a los antibióticos "amenaza los logros de la medicina moderna" en todo el mundo. *Materia* [en línia] <http://esmateria.com/2014/04/30/resistencia-antibioticos-medicina-oms/> [consulta 6/1/15]

un paper més transparent a favor dels interessos de la població malgrat que això pugui minvar els seus beneficis⁵⁰.

Crec que tot plegat passa per augmentar notablement i fer més efectives les campanyes de sensibilització i conscienciació en l'ús adequat i responsable d'aquests fàrmacs per part de la població. Així mateix, cal tenir molt present, en tot allò que fa referència a la lluita contra la resistència bacteriana, el que en el món de la investigació s'anomenen "nous antibiòtics", una esperança que contribuiria també a minorar-ne el consum. Recentment, per exemple, segons publica el diari *El País*⁵¹, un equip internacional de científics ha descobert un tipus d'antibiòtics que combaten els bacteris *Clostridium difficile*, causant de diarrees, o *Bacillus anthracis*, que provoca l'àntrax. La novetat d'aquest antibiòtic és que s'ha aconseguit cultivar mitjançant una metodologia que permet aprofitar bacteris que habitualment no ho són i amplia molt el rang d'espècies que es poden utilitzar per cercar antibiòtics. Probablement però, això ja no correspon a aquest Treball de Recerca sinó que obre la porta a futurs treballs en aquesta línia d'investigació.

Per altra banda, la part pràctica del treball, que ha consistit en la síntesi d'un compost tensioactiu i la comprovació del seu caràcter antibacterià sobre diferents microorganismes, ens ha ofert uns resultats que ens permeten arribar a diverses conclusions d'acord amb el principi bàsic del mètode científic i el criteri de verificabilitat de Karl R. Popper.

En primer lloc, estem en condicions d'afirmar que el DL com a compost utilitzat per inhibir el creixement de microorganismes no és el més efectiu⁵². El LAM, degut que és un tensioactiu de tipus catiònic, presenta una major activitat davant dels microorganismes assetjats, i per tant és més efectiu en el combat contra la resistència bacteriana.

⁵⁰ L'exdirector de la revista mèdica *British Medical Journal*, Richard Smith, en un article aparegut al diari al *El País* l'any 2005, critica amb duresa el paper dels laboratoris farmacèutics i denuncia amb dades contrastades els "maquillatges" que aquesta indústria fa a favor dels seus interessos en els diferents assajos clínics. L'autor aposta perquè aquests tipus d'assajos siguin finançats i controlats pel sector públic perquè tinguin més credibilitat. Font: SAMPEDRO, JAVIER. *elpais.com*. El ex director de una revista mèdica revela los trucos de las farmaceuticas

[en línia] http://elpais.com/diario/2005/05/17/sociedad/1116280806_850215.html [consulta 6/1/15]

⁵¹ MEDIAVILLA, DANIEL. Una nueva técnica amplia el arsenal contra las superbacterias. *elpais.com* [en línia] http://elpais.com/elpais/2015/01/07/ciencia/1420651243_369191.html [consulta 7/1/15]

⁵² Nota de l'autora: aquesta afirmació queda centrada i reduïda a les diferents proves que vaig practicar durant la meua estada a l'IQAC. No estic en condicions d'afirmar que aquest compost no es trobi en algun tipus d'antibiòtic.

Fer recerca en un laboratori ha estat una experiència extraordinària que de ben segur, ha contribuït a enriquir enormement aquest Treball de Recerca. Una de les qüestions complementàries que més m'han cridat l'atenció ha estat comprovar l'enorme dificultat dels investigadors per arribar a conclusions en les seves recerques que derivin en èxits. Aquest fet hauria de servir per sensibilitzar tant les autoritats sanitàries com la població en general atès que mals hàbits contribueixen, a més de perjudicar la salut, a augmentar la despesa econòmica i també la dedicació dels investigadors. Aquest fet impedeix tant invertir com actuar en altres àmbits. El doctor Richard Smith, citat anteriorment, defensa que la intervenció del sector públic en els assajos clínics significaria, a la llarga, un estalvi econòmic i alhora benefici en la salut de la població.

Les autoritats sanitàries, la indústria farmacèutica, la comunitat científica així com el conjunt de la població hem de remar en la mateixa direcció, perquè la lluita contra la resistència bacteriana, més enllà de les inevitables mutacions, és responsabilitat de tots plegats.

BIBLIOGRAFIA

- BROCK, THOMAS D. *Biología de los microorganismos*. Omega, cop. Barcelona, 1978.

- BUHNER, STEPHEN HARROD. *Antibióticos naturales: alternativas naturales para combatir las bacterias resistentes a los fármacos*. Obelisco. Barcelona, 2002.
- GARCÍA DOMÍNGUEZ, J. J. *Tensioactivos y detergencia*. Dossat S.A. Madrid, 1986
- JIMENO, ANTONIO I BALLESTEROS, MANUEL. *Biología 2 batxillerat*. Santillana. Barcelona, 2009.
- LEVINSON, WARREN. *Microbiología e inmunología médicas*. McGraw-Hill DL. Madrid, 2006.
- MORROS, ROSA. *Recomanacions per a l'ús d'antibiòtics*. Badalona, Institut Català de la Salut, Divisió d'Atenció Primària, 1999
- SINGLETON, PAUL. *Bacterias en biología, biotecnología y medicina*. Acriba. Saragossa, 2003.
- STRUTHERS, J. KEITH I WESTRAN, ROGER P. *Bacteriología clínica*. Masson, cop. Barcelona, 2005.
- TORRES MANRIQUE, CARMEN. *La resistencia bacteriana a los antibióticos: ¿Cuestión de inteligencia o de azar?* Universidad de La Rioja, Servicio de Publicaciones, 2007
- WIDMER, FRANÇOIS. *Diccionario de bioquímica y biología molecular*. Acribia. Saragossa, 2000.

WEBGRAFIA

- Fotografia de la portada: Parece controlado el brote de legionella.
Lapalomerafarma. [en línia]
<http://lapalomerafarma.es/blog/parece-controlado-el-brote-de-legionella/>
[consulta: 24/12/2014]

- EMBID, ALFREDO. Resistencia de las bacterias a los antibióticos. *amcmh.org* [en línia]
<http://www.amcmh.org/PagAMC/medicina/articulospdf/53ResistenciaBacterias.pdf> [consulta: 17/6/2014]
- TTE. COR. FERNANDO FERNÁNDEZ RIVERÓN, MY. JORGE LÓPEZ HERNÁNDEZ, DRA. LAIDA MARÍA PONCE MARTÍNEZ, I DRA. CARIDAD MACHADO BETARTE. Resistencia bacteriana. *bvs.sld.cu*. [en línia]
http://bvs.sld.cu/revistas/mil/vol32_1_03/mil07103.pdf [consulta: 17/6/2014]
- OTTO ALBERTO SUSSMANN, LORENZO MATTOS, ANDRÉS RESTREPO. Resistencia bacteriana. *med.javeriana.edu.co*. [en línia]
<http://med.javeriana.edu.co/publi/vniversitas/serial/v43n1/0026%20Resistencia.PDF> [consulta: 17/6/2014]
- CRISTINA EUGENIA CABRERA, M.SC., ROMMEL FABIÁN GÓMEZ, B.SC., ANDRÉS EDMUNDO ZÚÑIGA, B.SC. La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Colombia Médica*. [en línia]
<http://www.bioline.org.br/pdf?rc07034> [consulta: 17/6/2014]
- R. VIGNOLI, V. SEIJA. Principales mecanismos de resistencia antibiótica. *higiene.edu.uy* [en línia].
<http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/Principalesmecanismosderesistenciaantibiotica.pdf> [consulta: 17/6/2014]
- M. PÍREZ, M. MOTA. Morfología y estructura bacteriana. *higiene.edu.uy* [en línia].
<http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/MorfologiayEstructuraBacteriana.pdf> [consulta: 17/6/2014]

- La célula bacteriana. *Proyecto Biosfera*. [en línia]
<http://recursos.cnice.mec.es/biosfera/alumno/2bachillerato/micro/contenidos4.htm> [consulta: 17/6/2014]
- Biología celular y molecular-Bacterias. *Monografias.com*. [en línia]
<http://www.monografias.com/trabajos71/biologia-celular-molecular-bacterias/biologia-celular-molecular-bacterias2.shtml> [consulta: 17/6/2014]
- PÉREZ, CARLOS. Resistencia bacteriana. *Susmedicos.com*. [en línia]
http://www.susmedicos.com/art_Resistencia_Bacteriana.htm [consulta: 2/7/2014]
- Bacteria Gram Positivas y Gram Negativas. *Biología Médica*. [en línia]
<http://biologiamedica.blogspot.com.es/2010/09/bacterias-gram-positivas-y-gram.html> [consulta: 4/8/2014]
- Hans Christian Joachim Gram. *Wikipèdia*. [en línia]
http://ca.wikipedia.org/wiki/Hans_Christian_Gram [consulta: 12/8/2014]
- DAZA PÉREZ, R.M. Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. *Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad*. [en línia]
<https://www.msssi.gob.es/biblioPublic/publicaciones/docs/bacterias.pdf> [consulta: 21/8/2014]
- Carl Richard Woese. *Wiquipèdia*. [en línia]
http://ca.wikipedia.org/wiki/Carl_Richard_Woese [consulta: 26/08/2014]
- Organització Mundial de la Salut. *OMS* [en línia]
<http://www.who.int/about/es/> [consulta: 26/08/2014]

- Los cinco reinos de la naturaleza. *Bioquímica*. [en línia]
<http://bioquimicacoadvil.blogspot.com.es/2012/09/los-cinco-reinos-de-la-naturaleza.html> [consulta: 8/9/2014]
- Antonie Philips van Leeuwenhoek. *Wikipèdia*. [en línia]
http://ca.wikipedia.org/wiki/Antonie_van_Leeuwenhoek [consulta: 8/9/2014]
- Arbre filogenètic. *Wikipèdia*. [en línia]
http://ca.wikipedia.org/wiki/Arbre_filogen%C3%A8tic [consulta: 8/9/2014]
- Reino Moneras. *Proyecto Biosfera*. [en línia]
<http://recursostic.educacion.es/ciencias/biosfera/web/alumno/1bachillerat/o/organismos/contenidos5.htm> [consulta: 8/9/2014]
- Reproducción Bacteriana. *Proyecto Biosfera*. [en línia]
<http://recursos.cnice.mec.es/biosfera/alumno/2bachillerato/micro/contenidos6.htm> [consulta: 14/9/2014]
- Microbiología: tema 15. *Universidad Complutense Madrid*. [en línia]
https://cv2.sim.ucm.es/moodle/file.php/21298/Clases_de_teor%C3%ADa/Tema_2_bacteriologia_general/Tema15BGZBN.pdf [consulta: 15/9/2014]
- Paul Ehrlich. *Wikipèdia*. [en línia]
http://ca.wikipedia.org/wiki/Paul_Ehrlich [consulta: 15/9/2014]
- Seymour Jonathan Singer. *Wikipèdia*. [en línia]
http://en.wikipedia.org/wiki/Seymour_Jonathan_Singer [consulta: 29/9/2014]
- Garth L. Nicolson. *Wikipèdia*. [en línia]
http://en.wikipedia.org/wiki/Garth_L._Nicolson [consulta: 29/9/2014]

- Robert Whittaker Harding. *Wikipèdia*. [en línia]
http://ca.wikipedia.org/wiki/Robert_Whittaker [consulta: 6/10/2014]
- Clasificación de los antibióticos. *fbioyf.unr.edu.ar*. [en línia]
http://www.fbioyf.unr.edu.ar/evirtual/pluginfile.php/108387/mod_resource/content/1/Crecimiento%20parte%20d.pdf [consulta: 10/11/2014]
- Alexander Fleming. *Wikipèdia*. [en línia]
http://ca.wikipedia.org/wiki/Alexander_Fleming [consulta: 23/12/2014]
- Ernst Boris Chain. *Wikipèdia*. [en línia]
http://ca.wikipedia.org/wiki/Ernst_Boris_Chain [consulta: 23/12/2014]
- Howard Walter Florey. *Wikipèdia*. [en línia]
http://ca.wikipedia.org/wiki/Howard_Walter_Florey [consulta: 23/12/2014]
- REJÓN, RAÚL. Crece un 15% el uso de antibióticos y las bacterias se vuelven cada vez más resistentes. *Eldiario.es* [en línia]
http://www.eldiario.es/sociedad/consumo-antibioticos-disparano_0_327917846.html [consulta: 3/1/2015]
- SAMPEDRO, JAVIER. El ex director de una revista médica revela los trucos de las farmacéuticas. *elpais.com*. [en línia]
http://elpais.com/diario/2005/05/17/sociedad/1116280806_850215.html [consulta: 6/1/2015]
- MEDIAVILLA, DANIEL. Una nueva técnica amplía el arsenal contra las superbacterias. *elpais.com* [en línia]
http://elpais.com/elpais/2015/01/07/ciencia/1420651243_369191.html [consulta 7/1/15]

- SALAS, JAVIER. La resistencia a los antibióticos “amenaza los logros de la medicina moderna” en todo el mundo. *Materia* [en línia]
<http://esmateria.com/2014/04/30/resistencia-antibioticos-medicina-oms/>
[consulta 6/1/15]

AGRAÏMENTS

Aquest treball ha estat possible gràcies a la desinteressada i inestimable col·laboració de:

Miquel Sánchez, el tutor del Treball, qui va confiar en mi des d'un bon principi i va proporcionar-me l'estada a l'IQAC.

El Departament d'Ensenyament, promotor del programa de Suport a la Realització de Treballs de Recerca en col·laboració amb Entitats de Recerca.

L'Institut de Química Avançada de Catalunya i la Universitat de Barcelona, per oferir-me les instal·lacions.

Dra. Lourdes Pérez, per tutoritzar-me l'estada al laboratori i assessorar-me la part pràctica.

La investigadora de l'IQAC Marta Bustelo, per guiar-me durant la realització de la part pràctica al laboratori.

La família i els amics, en especial el meu pare, Lluís Aragonès, que m'ha ajudat sempre que ha estat necessari.

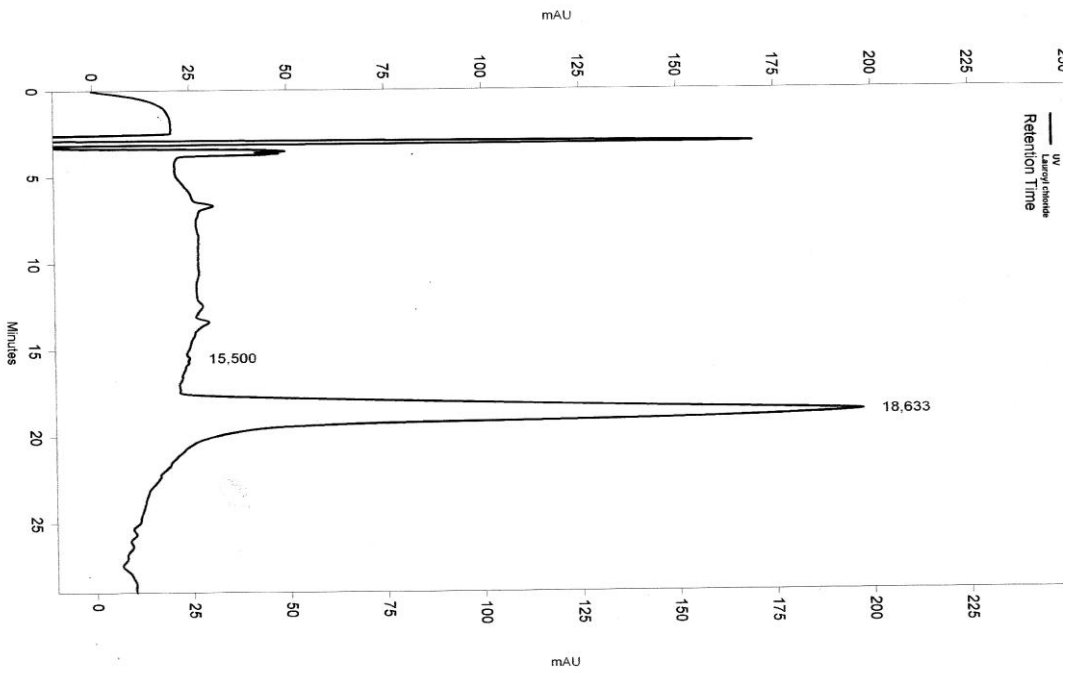
ANNEXOS

1. ANNEX I: GRÀFICS DELS TEMPS DE RETENCIÓ DELS COMPOSTOS

Saber el temps de retenció d'un compost serveix per controlar que la reacció que s'està duent a terme avança correctament, tal com s'ha explicat en l'apartat 2.1. *Seguiment de la reacció*. A continuació, es pot observar cadascuna de les

mostres analitzades per l'HPLC. El nom de la mostra estudiada es pot veure a *Sample ID*, mentre que els resultats a la part inferior del gràfic.

Data File: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\MARINA\Data\Júlia\Lauroyl chloride.dat
Method: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\MARINA\Method\PROG1.met
Acquired: 01/07/2014 13:28:44
Printed: 01/07/2014 13:58:57
Sample ID: Lauroyl chloride
Vial: 171

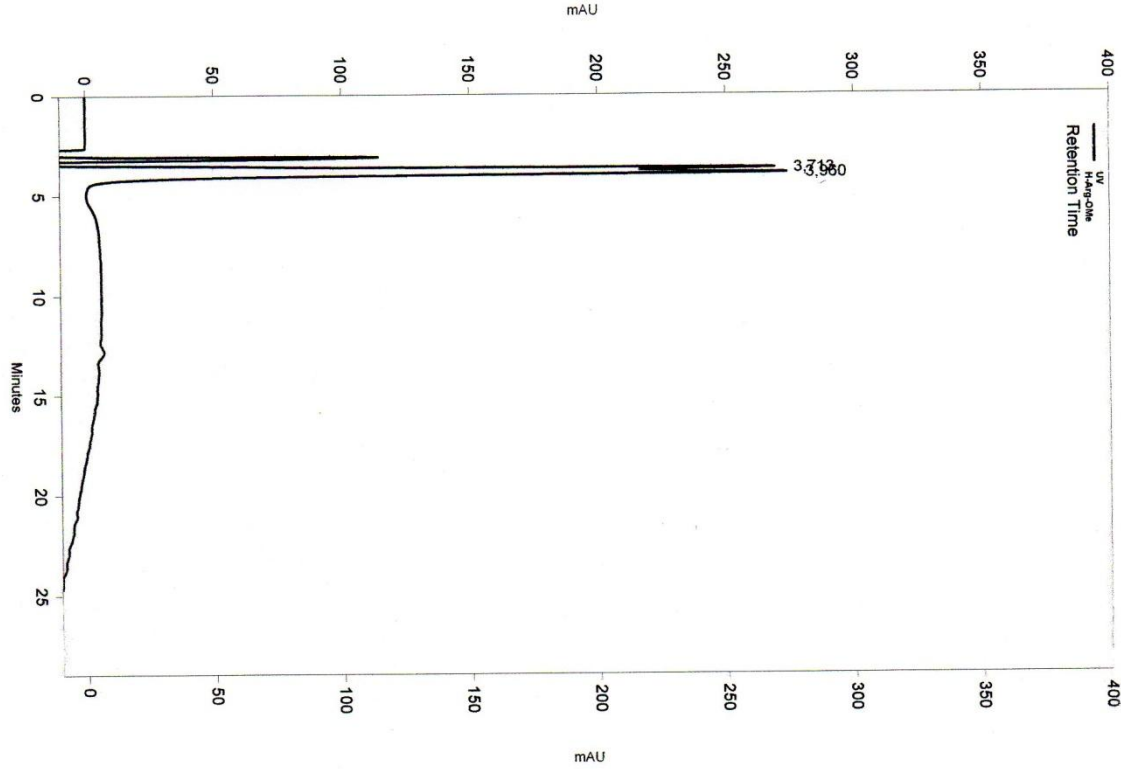


UV Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
15,500	3433	0,01	655	0,09
18,633	46714885	99,99	704518	99,91

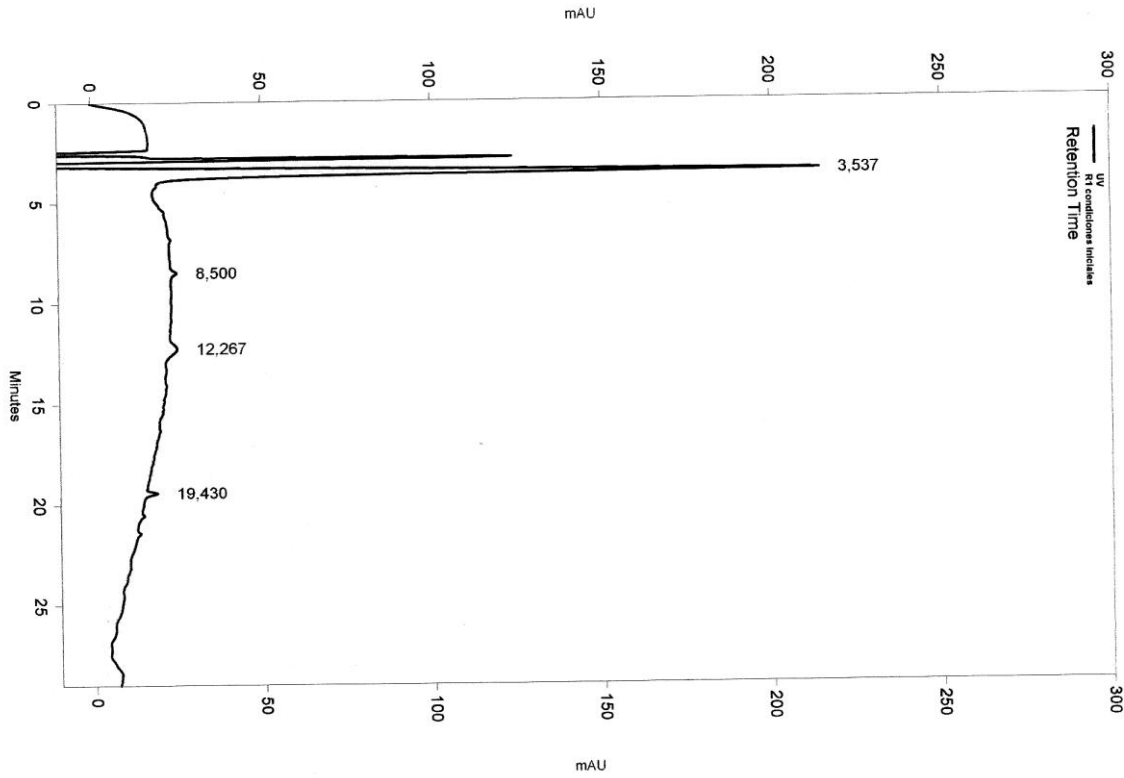
Totals	46718318	100,00	705173	100,00
--------	----------	--------	--------	--------

Data File: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\MARINA\Data\Júlia\H-Arg-OMe.dat
Method: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\MARINA\Method\PROG1.met
Acquired: 01/07/2014 12:51:36
Printed: 01/07/2014 13:46:51
Sample ID: H-Arg-OMe
Vial: 181



UV Results				
Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
3,713	2977194	43,82	514998	49,22
3,960	3817460	56,18	531230	50,78
Totals	6794654	100,00	1046228	100,00

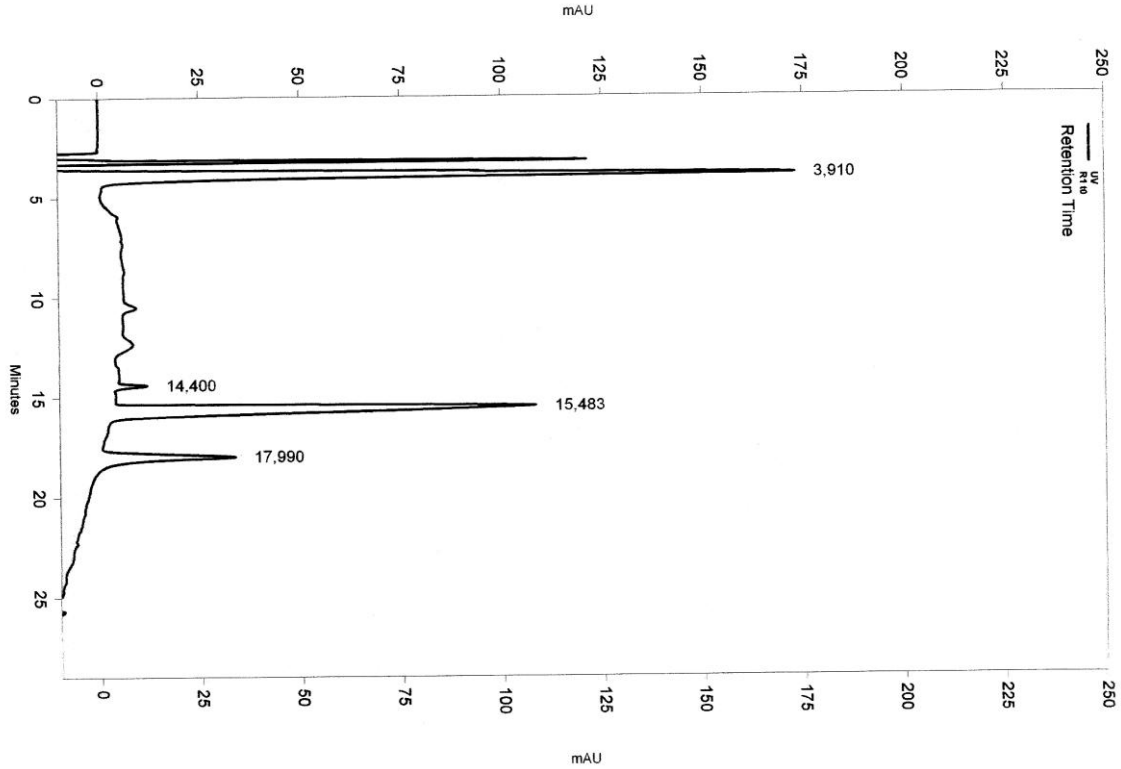
Data File: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\MARINA\Data\Júlia\R1 condiciones
iniciales.dat
Method: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\MARINA\Method\PROG1.met
Acquired: 02/07/2014 11:32:23
Printed: 02/07/2014 13:17:59
Sample ID: R1 condiciones iniciales
Vial: 182



UV Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
3,537	10619274	94,34	754969	96,03
8,500	113546	1,01	7122	0,91
12,267	369336	3,28	10565	1,34
19,430	154384	1,37	13514	1,72
Totals	11256540	100,00	786170	100,00

Data File: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\MARINA\Data\Júlia\R1 t0.dat
Method: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\MARINA\Method\PROG1.met
Acquired: 02/07/2014 10:55:16
Printed: 02/07/2014 11:23:47
Sample ID: R1 t0
Vial: 192

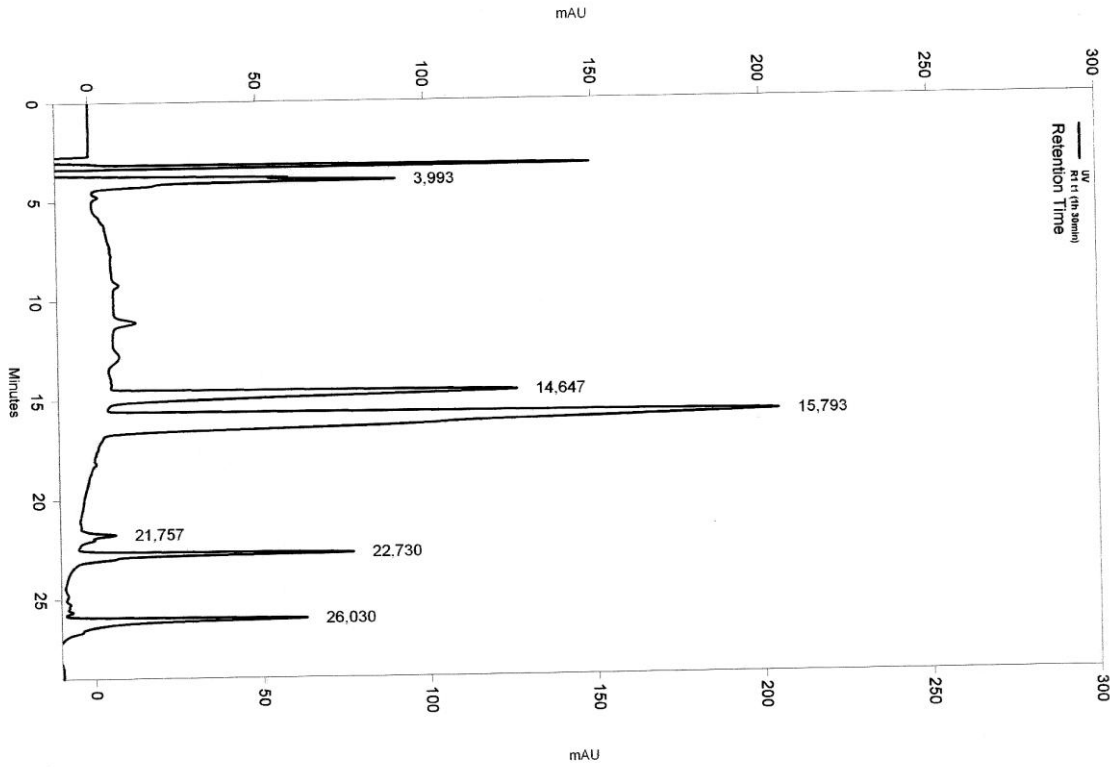


UV Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
3,910	12785394	49,80	691847	54,28
14,400	300823	1,17	30149	2,37
15,483	9920360	38,64	419990	32,95
17,990	2669109	10,40	132604	10,40

Totals	25675686	100,00	1274590	100,00
--------	----------	--------	---------	--------

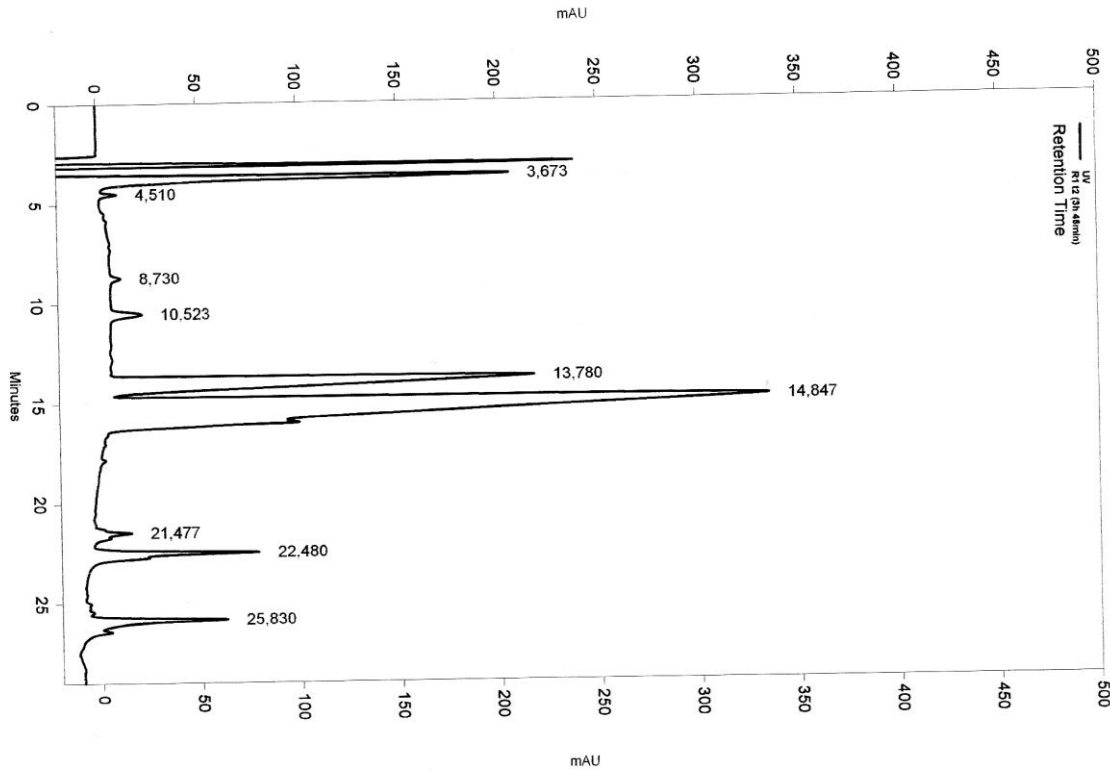
Data File: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\MARINA\Data\Júlia\R1 t1 (1h 30min).dat
 Method: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\MARINA\Method\PROG1.met
 Acquired: 02/07/2014 13:19:50
 Printed: 02/07/2014 14:40:52
 Sample ID: R1 t1 (1h 30min)
 Vial: 172



UV Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
3,993	6050375	11,30	367230	15,88
14,647	10176308	19,00	484990	20,98
15,793	27883235	52,06	801813	34,68
21,757	768292	1,43	41935	1,81
22,730	4140532	7,73	329036	14,23
26,030	4544904	8,49	287090	12,42
Totals	53563646	100,00	2312094	100,00

Data File: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\MARINA\Data\Júlia\R1 t2 (3h 45min).dat
 Method: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\MARINA\Method\PROG1.met
 Acquired: 02/07/2014 14:40:43
 Printed: 02/07/2014 15:23:10
 Sample ID: R1 t2 (3h 45min)
 Vial: 183

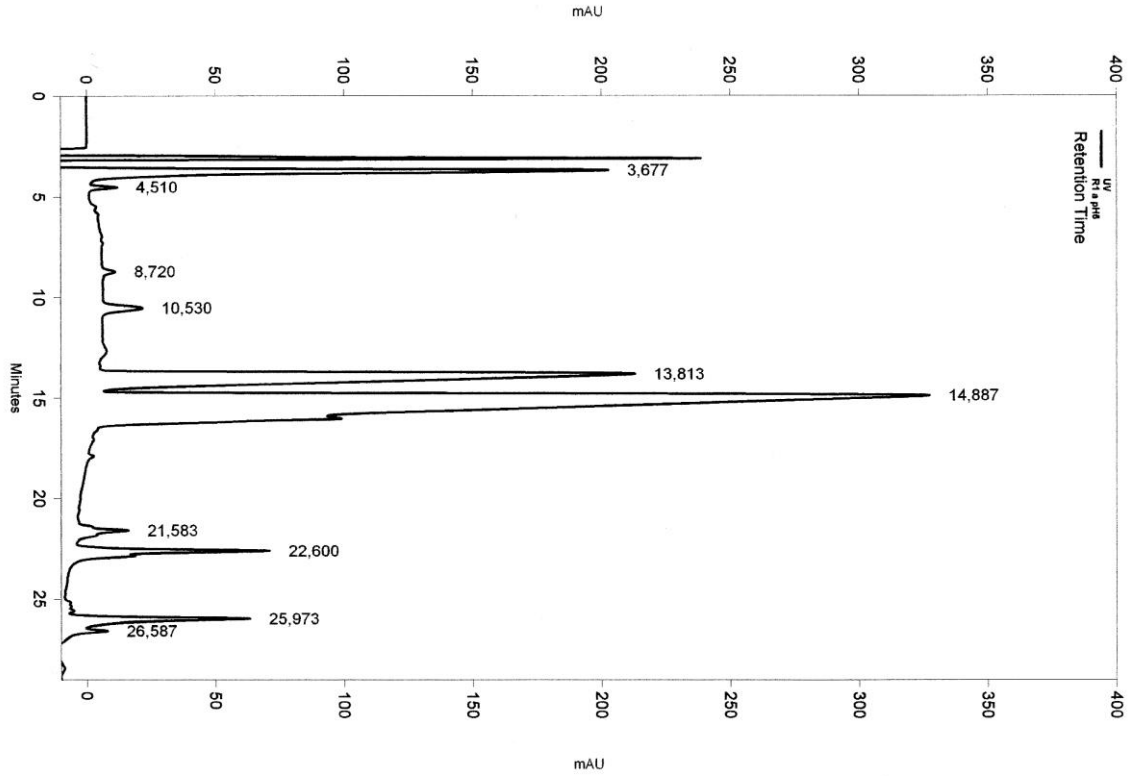


UV Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
3,673	6373347	5,86	564139	16,11
4,510	318736	0,29	33515	0,96
8,730	322788	0,30	20622	0,59
10,523	1117873	1,03	61031	1,74
13,780	24294670	22,35	843727	24,09
14,847	65586305	60,34	1311751	37,45
21,477	1437567	1,32	73476	2,10
22,480	5526279	5,08	331814	9,47
25,830	3717794	3,42	262804	7,50

Totals	108695359	100,00	3502879	100,00
--------	-----------	--------	---------	--------

Data File: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\MARINA\Data\Júlia\R1 a pH5.dat
Method: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\MARINA\Method\PROG1.met
Acquired: 02/07/2014 16:10:14
Printed: 02/07/2014 17:03:15
Sample ID: R1 a pH5
Vial: 184

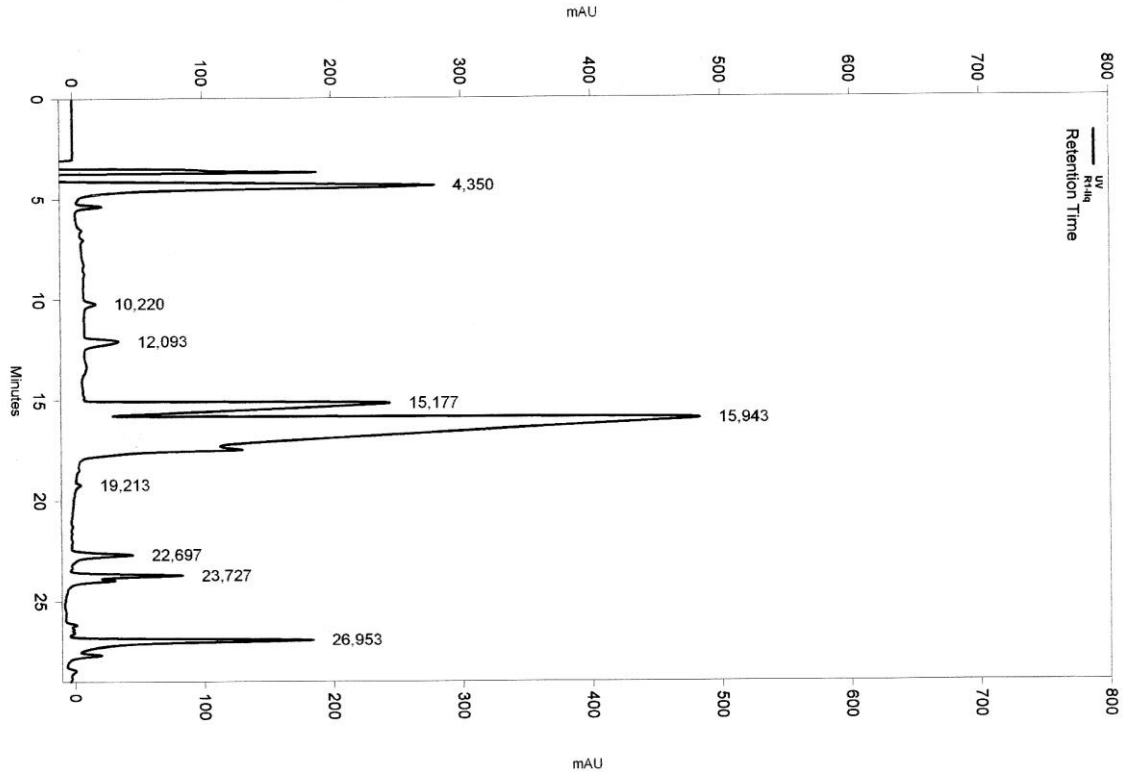


UV Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
3,677	12496696	11,10	836970	22,25
4,510	393323	0,35	41984	1,12
8,720	275685	0,24	19290	0,51
10,530	1126560	1,00	61155	1,63
13,813	23719838	21,07	828418	22,02
14,887	64165179	56,99	1283590	34,12
21,583	1524536	1,35	78822	2,10
22,600	4764343	4,23	300867	8,00
25,973	3700705	3,29	269096	7,15
26,587	415553	0,37	42043	1,12

Totals	112582418	100,00	3762235	100,00
--------	-----------	--------	---------	--------

Data File: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\MARINA\Data\Júlia\R1-liq.dat
 Method: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\MARINA\Method\PROG1.met
 Acquired: 03/07/2014 10:30:02
 Printed: 03/07/2014 11:05:11
 Sample ID: R1-liq
 Vial: 192

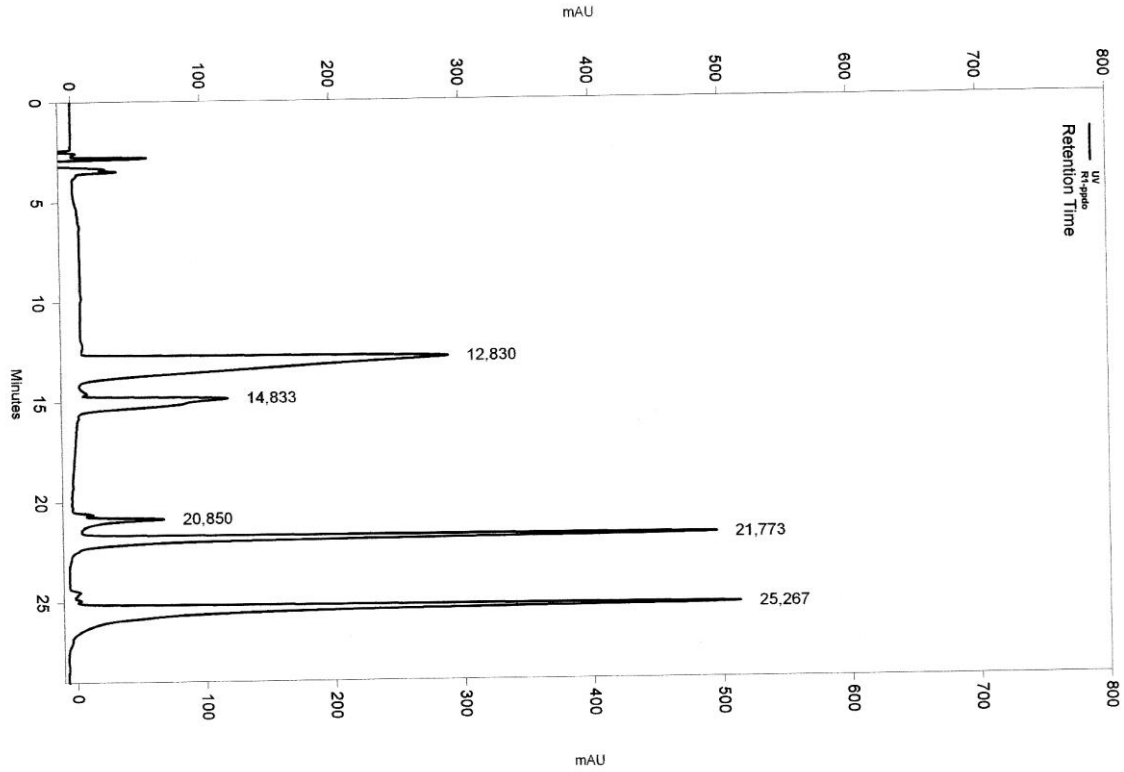


UV Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
4,350	13305423	8,11	845951	16,83
10,220	470775	0,29	34803	0,69
12,093	1998211	1,22	105098	2,09
15,177	22000270	13,41	920742	18,32
15,943	106134611	64,68	1819536	36,20
19,213	166227	0,10	15769	0,31
22,697	2574425	1,57	188206	3,74
23,727	5286280	3,22	347677	6,92
26,953	12143915	7,40	749106	14,90

Totals	164080137	100,00	5026888	100,00
--------	-----------	--------	---------	--------

Data File: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\MARINA\Data\Júlia\R1-ppdo.dat
 Method: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\MARINA\Method\PROG1.met
 Acquired: 03/07/2014 11:13:25
 Printed: 03/07/2014 12:04:00
 Sample ID: R1-ppdo *deixatado*
 Vial: 193



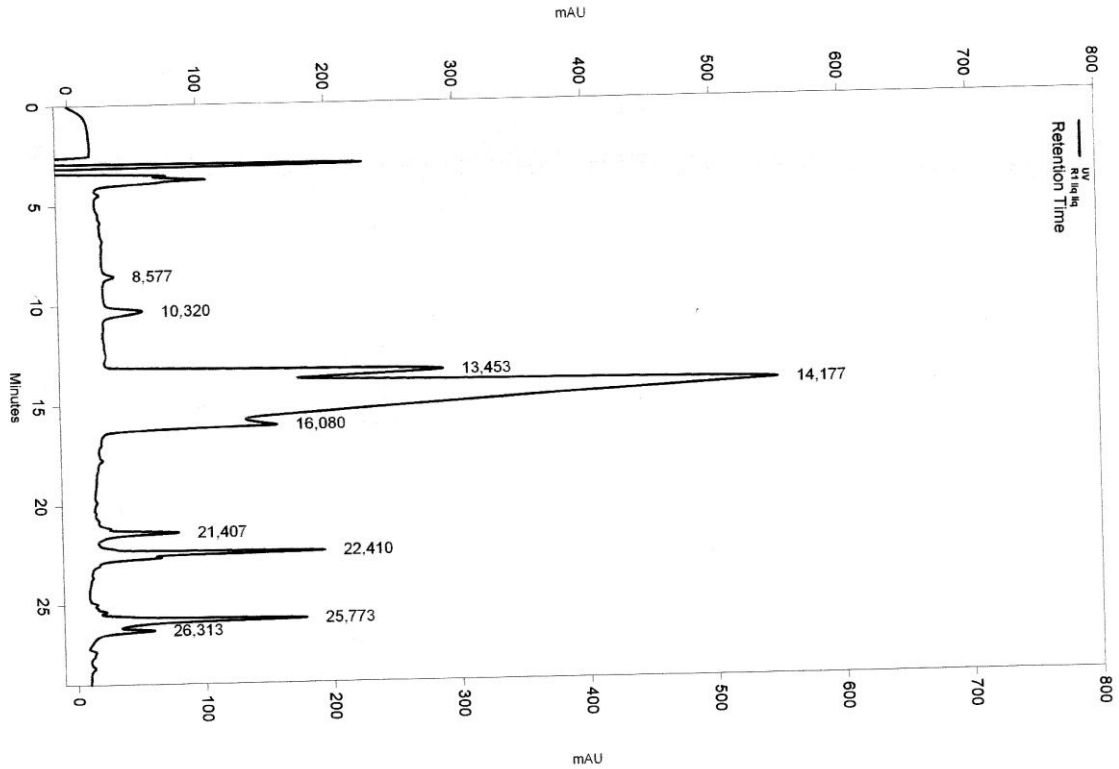
UV Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
12,830	44468269	34,63	1135110	19,33
14,833	12339279	9,61	450492	7,67
20,850	4193617	3,27	266816	4,54
21,773	27840011	21,68	1969310	33,53
25,267	39580675	30,82	2051667	34,93

Totals	128421851	100,00	5873395	100,00
--------	-----------	--------	---------	--------

1^a CRISTAL·LITZACIÓ : en MeOH

Data File: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\MARINA\Data\Júlia\R1 liq liq.dat
 Method: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\MARINA\Method\PROG1.met
 Acquired: 07/07/2014 12:10:51
 Printed: 07/07/2014 12:43:15
 Sample ID: R1 liq liq
 Vial: 192

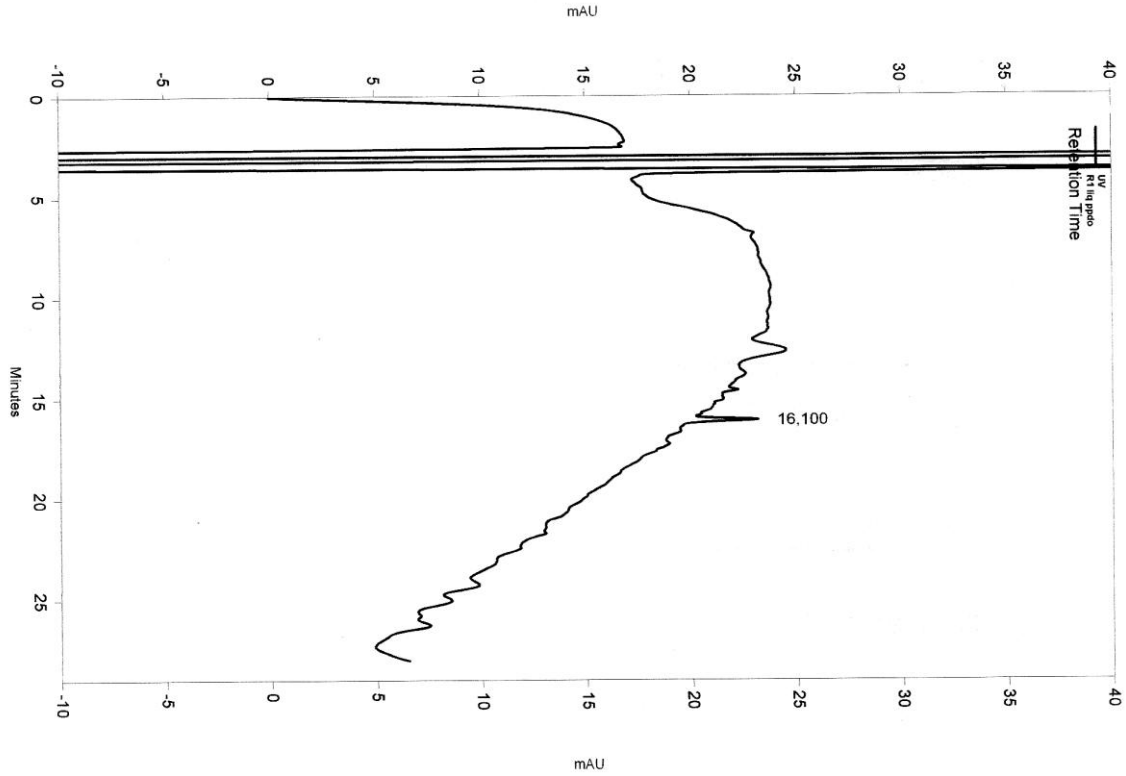


UV Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
8,577	603672	0,45	35754	0,80
10,320	2606137	1,95	121672	2,73
13,453	15995619	11,99	749414	16,83
14,177	84974944	63,69	1527983	34,32
16,080	5043198	3,78	319046	7,17
21,407	3835958	2,88	251956	5,66
22,410	11066108	8,29	710647	15,96
25,773	8036793	6,02	611467	13,74
26,313	1257801	0,94	123858	2,78

Totals	133420230	100,00	4451797	100,00
--------	-----------	--------	---------	--------

Data File: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\MARINA\Data\Júlia\R1 liq ppdo.dat
Method: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\MARINA\Method\PROG1.met
Acquired: 07/07/2014 12:48:04
Printed: 07/07/2014 13:16:02
Sample ID: R1 liq ppdo
Vial: 182



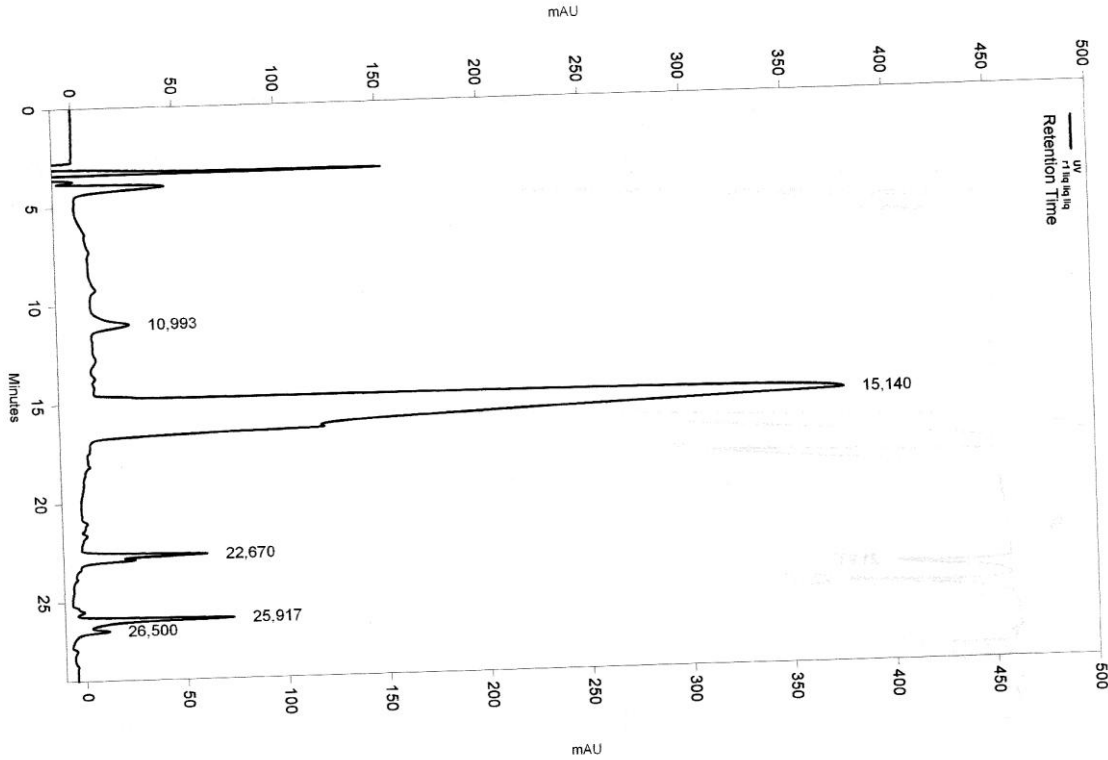
UV Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
16,100	119621	100,00	12771	100,00
Totals	119621	100,00	12771	100,00

J^a cristallizacions TEOH / ACN

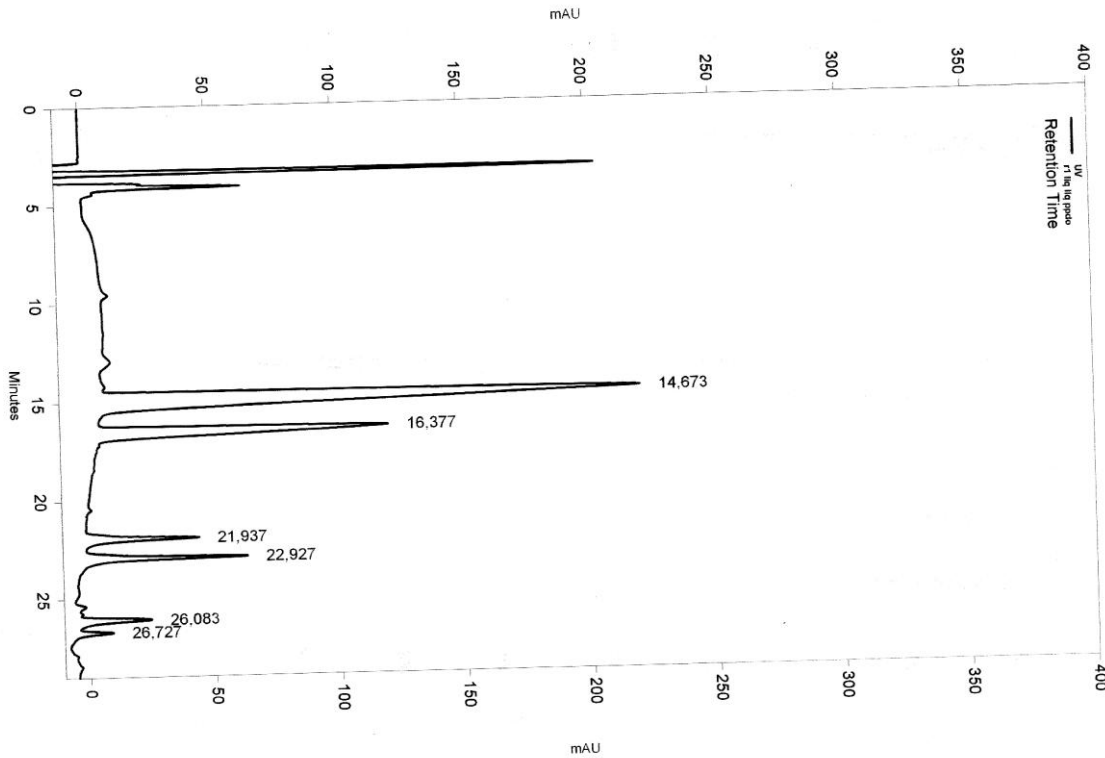
Data File: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\MARINA\Data\Júlia\r1 liq liq liq.dat
 Method: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\MARINA\Method\PROG1.met
 Acquired: 08/07/2014 10:14:36
 Printed: 08/07/2014 10:51:24
 Sample ID: **r1 liq liq liq**
 Vial: 192

cristallizacions



UV Results				
Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
10,993	2001284	1,81	74296	3,47
15,140	100721095	90,94	1480700	69,10
22,670	3986405	3,60	247297	11,54
25,917	3594548	3,25	297515	13,88
26,500	446473	0,40	43157	2,01
Totals	110749805	100,00	2142965	100,00

Data File: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\MARINA\Data\Júlia\r1 liq liq ppdo.dat
 Method: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\MARINA\Method\PROG1.met
 Acquired: 08/07/2014 10:57:51
 Printed: 08/07/2014 11:46:32
 Sample ID: r1 liq liq ppdo *Tura*
 Vial: 192

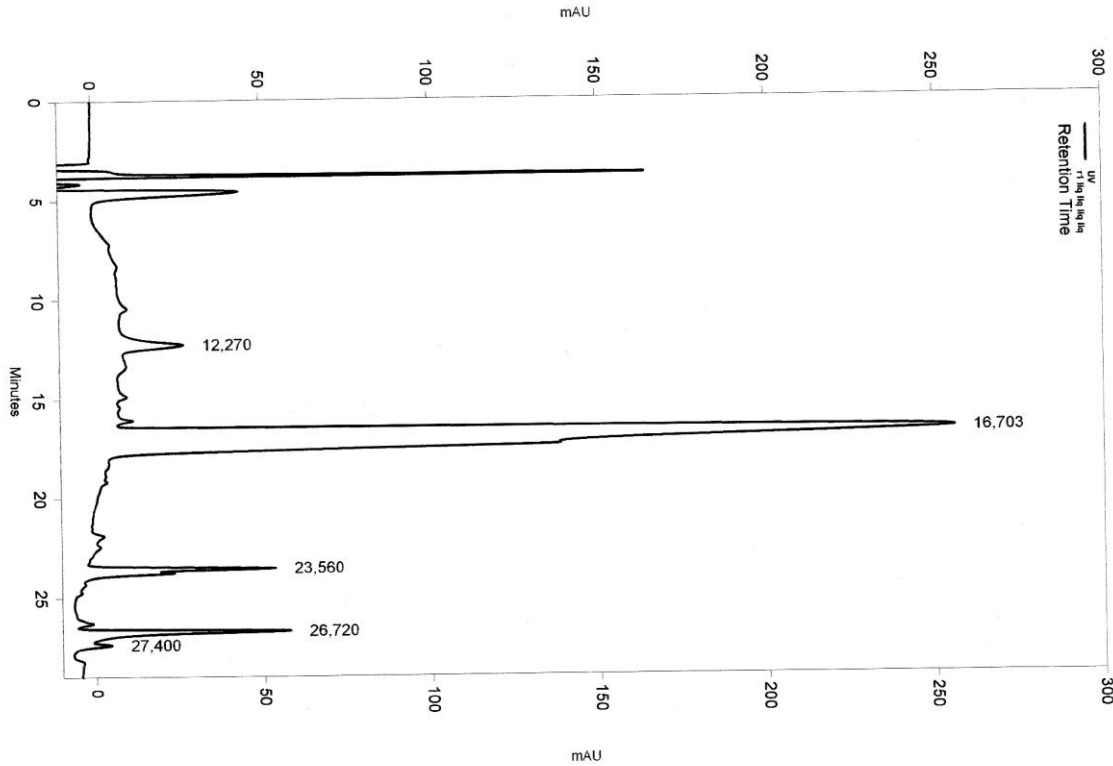


UV Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
14,673	27095378	58,58	851632	44,61
16,377	11093374	23,99	459664	24,08
21,937	2586642	5,59	179021	9,38
22,927	3237176	7,00	251774	13,19
26,083	1631439	3,53	111803	5,86
26,727	606477	1,31	55087	2,89
Totals	46250486	100,00	1908981	100,00

2^{on} CRISTALLIZACION TRACH / PCN

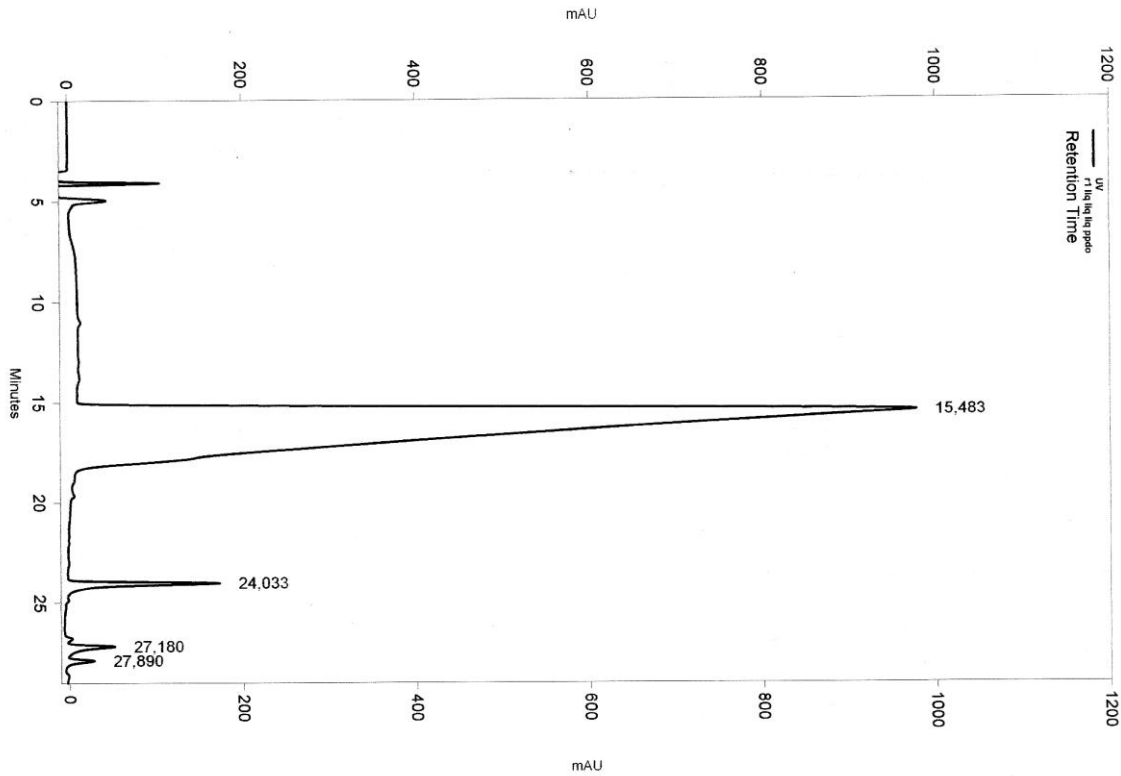
Data File: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\MARINA\Data\Júlia\r1 liq liq liq
 liq.dat
 Method: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\MARINA\Method\PROG1.met
 Acquired: 09/07/2014 10:02:55
 Printed: 09/07/2014 10:58:05
 Sample ID: r1 liq liq liq *reserchar*
 Vial: 192



UV Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
12,270	1802059	3,14	72572	4,63
16,703	48555158	84,48	996758	63,53
23,560	3697203	6,43	224141	14,29
26,720	3124276	5,44	246329	15,70
27,400	298386	0,52	29068	1,85
Totals	57477082	100,00	1568868	100,00

Data File: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\MARINA\Data\Júlia\r1 liq liq liq ppdo.dat
 Method: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\MARINA\Method\PROG1.met
 Acquired: 09/07/2014 11:02:17
 Printed: 09/07/2014 13:57:10
 Sample ID: r1 liq liq liq ppdo *Disolver en H₂O + UO₂ZAR*
 Vial: 192



UV Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
15,483	346788653	96,37	3868395	78,92
24,033	8945904	2,49	699871	14,28
27,180	2790311	0,78	213526	4,36
27,890	1324700	0,37	120101	2,45

Totals	359849568	100,00	4901893	100,00
--------	-----------	--------	---------	--------

2. ANNEX II: ESTUDI DE LA C.M.C. MITJANÇANT LA CONDUCTIVITAT

Inicialment, la meua estada a l'IQAC havia de ser dues setmanes, però finalment van ser-ne tres. Durant aquesta setmana de més vaig realitzar l'estudi de la Concentració Micel·lar Crítica (C.M.C.) del compost que havia sintetitzat. Com que aquest estudi no té una relació directa amb el tema del treball de recerca, l'incloc a l'annex.

2.1. Metodologia

Instrumentació: Elèctrode de conductivitat d'ORION model 11010A, mesurador de conductivitat THERMO ORION 550A, Bany termostàtic HETO CBN 8-30, Agitador magnètic IKA WERKE.

Una de les propietats dels tensioactius en solucions aquoses és que formen agregats moleculars. L'agregat més petit que poden formar s'anomena micel·la i la concentració a la qual comencen a aparèixer les micel·les es diu concentració micel·lar crítica (C.M.C.). La C.M.C. és un interval per sota del qual no existeixen micel·les i per sobre si. La C.M.C. d'un tensioactiu iònic es pot determinar mitjançant mesures de conductivitat. A concentracions premicel·lars, es produeix un augment de la conductivitat degut a que els monòmers de tensioactius es comporten com a electròlits forts. A partir de la C.M.C. es formen micel·les que es comporten com electròlits dèbils ja que tenen menor mobilitat. Degut això, si s'elabora un gràfic on es representa la conductivitat en front la concentració, al punt on es produeix un canvi de pendent correspon a la C.M.C.

2.2. Procés per a l'estudi de la C.M.C.

El que es pretén en aquest estudi és determinar quin és el valor per sobre del qual el LAM forma agregats micel·lars.

L'estudi el realitzem amb 9 dissolucions de diferents concentracions de LAM. En primer lloc, el que fem és preparar una dissolució mare (d_m). Aquesta conté 0,20354 g de LAM i 50 mL d'aigua. A partir d'ella, farem 9 dissolucions de 10 mL amb diferents concentracions. La dissolució més diluïda té 1 mL de d_m i 9 mL d'aigua, la segona més diluïda 2 mL de d_m i 8 mL d'aigua, i així fins la més concentrada que té 9 mL de d_m i 1 mL d'aigua

Un cop fetes totes les dissolucions, abans d'estudiar-ne la seva conductivitat, calibrem l'elèctrode i comprovem que la conductivitat de l'aigua no supera els 1 $\mu\text{S}/\text{cm}$ i anotem el valor obtingut (en aquest cas 0,43) per així restar-lo en les conductivitats que obtinguem. Després, posem 4 mL aproximadament en un flascó, on hi ha un agitador magnètic per fer que la dissolució estigui en constant rotació, i el subjectem amb una pinça. Submergim la sonda i esperem a què aparegui un valor estable al mesurador de conductivitat. Un cop aparegut, l'anotem i repetim el procés amb la resta de dissolucions. L'estudi el fem de la més diluïda a la més concentrada així no és necessari canviar la sonda.

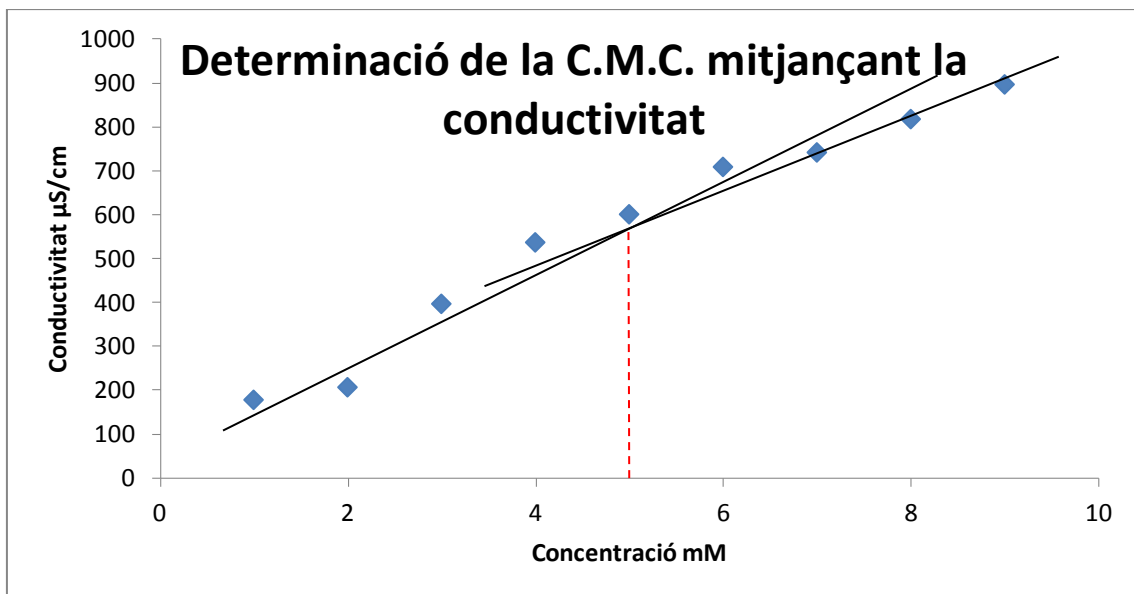
2.3. Resultats

Un cop obtinguts tots els resultats, els anotem a una taula i amb un full de càlcul creem una gràfica on es pugui veure el canvi de pendent i, per tant, el valor de la C.M.C.

Taula 3. Valors de conductivitat per diferents concentracions del tensioactiu LAM

Concentració LAM (mM)	Conductivitat absoluta $\mu\text{S}/\text{cm}$
--------------------------	---

1	177,37
2	206,07
3	396,17
4	536,27
5	600,27
6	708,27
7	741,27
8	817,27
9	896,27



Tal i com es pot observar en el gràfic, el valor de la C.M.C. equival a 5 mM. Això vol dir que quan la concentració de LAM en una dissolució sigui inferior a 5 mM el que tindrem seran monòmers de LAM en solució, en canvi, quan la concentració sigui igual o superior a 5 mM tindrem micel·les juntament amb monòmers.