



**PROPIETATS  
TERAPÈUTIQUES  
DEL RAÏM  
EL RESVERATROL**

# AGRAÏMENTS

A la tutora del meu treball pel seu suport i orientació al llarg de la realització del treball.

A la col·laboració desinteressada de Javier Méndez Viera i Josep Maria Fernández Novell des del Departament de Bioquímica (Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona) en la realització de la part experimental.

A les Caves Albet i Noya, concretament al Toni Albet, per cedir-me les mostres de raïm utilitzades en la part experimental.

A la Dra. Rosa María Lamuela Raventós del grup antioxidants naturals (Facultat de farmàcia, Universitat de Barcelona) per haver-me facilitat dades de les quals no disposava.

Al Cesc Gómez de les Bodegues Torres per assessorar-me en el tema de recerca.

A la meva família per la paciència, dedicació i predisposició en tot moment.

# ÍNDEX

INTRODUCCIÓ.....	5
PART TEÒRICA.....	8
1. EL RESVERATROL.....	9
1.1. Introducció .....	9
1.1.1. Els compostos fenòlics .....	9
1.1.1.1. Classificació dels compostos fenòlics .....	9
1.1.2. Conceptes generals del resveratrol .....	10
1.2. Fonts .....	12
1.2.1. Aliments.....	12
1.2.2. Suplements alimentaris.....	12
1.3. Metabolisme i biodisponibilitat .....	13
1.4. Biosíntesi del resveratrol en plantes .....	15
1.5. Tractament i prevenció de malalties humanes.....	16
1.5.1. Càncer.....	16
1.5.2. Malalties cardiovasculars .....	17
1.5.3. Envel·liment .....	19
1.5.4. Malalties neurodegeneratives.....	19
1.5.5. Malalties metabòliques.....	21
1.6. Perills i seguretat .....	22
1.6.1. Interaccions amb altres medicaments.....	23
1.6.2. Activitat estrogènica: disruptors hormonal.....	23
2. L'ENVELLIMENT BIOLÒGIC.....	24
2.1. Introducció .....	24
2.2. Teories biològiques de la senescència.....	25
2.2.1. Teories estocàstiques.....	25
2.2.2. Teories no estocàstiques .....	27
3. INFLUÈNCIA DEL RESVERATROL EN L'ENVELLIMENT BIOLÒGIC.....	28
3.1. Introducció .....	28
3.2. Propietats antioxidants.....	28
3.2.1. L'oxidació.....	28
3.2.2. Radicals lliures .....	29
3.2.3. Els antioxidants .....	32



3.3.	Estimulació de la producció de sirtuïnes .....	34
4.	ORGANISMES MODEL: SACCHAROMYCES CEREVISIAE.....	38
4.1.	Característiques generals.....	39
4.2.	Història .....	39
4.3.	Obtenció de matèria i energia .....	40
4.4.	Cicle cel·lular .....	42
4.4.1.	Fase lag .....	43
4.4.2.	Fase log.....	43
4.4.3.	Fase estacionària .....	44
4.4.4.	Fase de mort .....	45
	PART EXPERIMENTAL .....	46
1.	Objectius.....	47
2.	Hipòtesis .....	47
3.	Introducció teòrica .....	48
3.1.	Varietats de raïm .....	48
4.	Materials i mètodes .....	50
4.1.	Material.....	50
4.2.	Toxicitat i nivell de bioseguretat (BSL) .....	51
4.3.	Procediment.....	52
5.	Resultats i discussió .....	58
	CONCLUSIONS.....	71
	ANNEX .....	74
1.	Annex 1: Taules d'estadística del comptatge de llevats .....	75

# INTRODUCCIÓ

---

Propietats terapèutiques del raïm  
El resveratrol





Recentment l'alimentació ha esdevingut un dels temes d'interès en la recerca mèdica i científica. Se n'estudien els efectes, tan perjudicials com beneficiosos, que pot tenir el consum de certs aliments. Aquesta recerca evidencia clarament la relació estreta existent entre allò que consumim i la prevenció o el desenvolupament de moltes malalties. Paral·lelament, la societat cada cop mostra més interès per entendre aquesta relació entre l'alimentació i la seva repercussió en l'organisme, plantejant-se quina és la millor dieta a seguir.

En aquestes investigacions, un grup de molècules les quals han estat àmpliament estudiades són els compostos fenòlics. El seu interès és degut al fet que diversos estudis han atribuït relacions entre el consum de polifenols i la prevenció de malalties i processos relacionats amb l'oxidació; com són el càncer, les malalties cardiovasculars, l'envelliment, les malalties metabòliques, etc.

Dins el marc d'aquesta recerca biomèdica sobre els efectes beneficiosos dels polifenols, en aquest treball he escollit com a objecte d'estudi un producte de proximitat característic de la zona del Penedès que conté una gran quantitat d'aquests compostos, és el cas del raïm. Dins la varietat de polifenols que conté el raïm, he decidit centrar-me en una molècula en concret: el resveratrol, un tipus de compost fenòlic englobat dins el grup dels estilbens.

L'objectiu principal a assolir al llarg de la meva recerca és entendre i testar experimentalment la influència del resveratrol en l'envelliment biològic.

Per a fer-ho, he estructurat el treball en dues parts: la part teòrica, que servirà d'explicació per facilitar la comprensió de la part experimental, i la part experimental.

En relació en la part teòrica he explicat algunes de les característiques que té el resveratrol, com ara dins de quin grup de molècules està englobat, les fonts d'on es pot obtenir, com es metabolitza i les funcions que fa en els organismes que el produeixen; incidint sobretot en les propietats terapèutiques i els mecanismes d'acció que té aquest compost per a la prevenció o desenvolupament d'algunes malalties. Seguidament, he fet un recull d'algunes de les teories que intenten explicar les causes de l'envelliment. D'aquesta manera és possible entendre sobre quins factors actua el resveratrol que, en particular, són dos. En primer lloc, el fet de ser antioxidant ajuda a minimitzar el dany



ocasionat pels radicals lliures (Teoria dels radicals lliures). En segon lloc, estimula la producció de les sirtuïnes, proteïnes reguladores de l'expressió genètica mitjançant la compactació de l'ADN que ajuda a que, durant la replicació de l'ADN, no es perdin fragments dels telòmers, una de les causes de l'envelliment (Teoria genètica).

Pel que fa la part experimental, he volgut testar un d'aquests mecanisme terapèutics del resveratrol: el seu ús per alentir la senescència o envelliment biològic. Per a fer-ho s'ha emprat el llevat *Saccharomyces cerevisiae* com a microorganisme model. S'han preparat diversos cultius d'aquest llevat on s'hi ha afegit varietats diferents de raïm, Revidox (producte que conté resveratrol) en diferents concentracions o vitamina C també en diferents concentracions. Per altra banda, s'ha establert un grup control on no s'hi ha afegit res per tal de poder comparar els resultats. S'han realitzat controls periòdics per anar recollint les dades. S'ha comptabilitzat, utilitzant una cambra de comptatge de Thoma i el tint blau de metilè, les cèl·lules mortes (de color blau) i vives (incolores) en cada control.

Tots els experiments s'han dut a terme amb els recursos facilitats pel Departament de Bioquímica de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona.

A partir dels resultats obtinguts s'han extret unes conclusions molt discretes a partir de les quals es podria obrir un nou estudi en aquest àmbit. Però, sobretot, m'han servit per introduir-me en el camp de la recerca i per conèixer la metodologia que es segueix.

Per últim, comentar que la motivació personal que m'ha portat a escollir aquest tema és l'interès per la biomedicina així com per la nutrició, camps en els quals m'agradaria enfocar els meus estudis posteriors al batxillerat. Per altra banda, m'he centrat en el raïm com a objecte d'investigació pel fet que despertava el meu interès poder estudiar les propietats terapèutiques d'un producte de proximitat, característic de la zona del Penedès.

L'estudi ha estat molt enriquidor i gratificant tant a nivell acadèmic com personal.

# PART TEÒRICA

---

Propietats terapèutiques del raïm  
El resveratrol







## 1. EL RESVERATROL

### 1.1. Introducció

#### 1.1.1. Els compostos fenòlics

Les plantes vasculars sintetitzen una gran quantitat de molècules orgàniques com a conseqüència del seu metabolisme secundari, és a dir, aquell en el que les substàncies resultants de les reaccions químiques no estan directament relacionades amb el creixement i la reproducció de la planta sinó que exerceixen funcions complementàries a les vitals. Constitueixen el grup químic més nombrós i està àmpliament distribuït en el regne vegetal, amb més de 8000 estructures diferents conegudes. Els compostos fenòlics formen part del grup de substàncies anomenades metabòlits secundaris; que són molt comunes i abundants en el regne vegetal. Es troben distribuïdes a totes les parts de les plantes i la seva concentració és variable durant tot el seu cicle vegetatiu.

Els compostos fenòlics, pel fet de ser metabòlits secundaris, intervenen en diversos processos així com la formació de diferents estructures, la síntesi proteica, l'activitat enzimàtica, l'assimilació de nutrients, la fotosíntesi, la defensa contra els factors desfavorables de l'ambient i l'al·lelopatia (relacions de competència entre organismes vegetals per mitjà de substàncies químiques). A més aquestes substàncies també estan associades a les propietats antioxidants, les característiques nutritives, les característiques sensorials i el color dels vegetals.

En el camp de la nutrició i la medicina, l'interès per aquest compostos ve donat pels seus possibles efectes beneficiosos per la salut humana que se li han atribuït. Alguns estudis han suggerit associacions entre un alt consum de polifenols i la prevenció de malalties relacionades amb l'oxidació i les inflamacions. Així com el càncer, les malalties cardiovasculars, l'envelliment, les malalties neurodegeneratives, la diabetis i l'obesitat.

##### 1.1.1.1. Classificació dels compostos fenòlics

Els compostos fenòlics es poden classificar en dos grans grups segons la seva estructura: flavonoides i no flavonoides. Ambdós grups es subdivideixen en diferents tipus de



compostos fenòlics (Fig. 1.). Els compostos fenòlics del raïm són els que determinen el grau antioxidant.

Entre els pigments fenòlics destaquen les antocianines que donen als vegetals tonalitats blaves, vermelloses i liles típiques de moltes fruites, hortalisses i derivats d'aquestes. Alguns d'aquests compostos també són responsables dels aromes que caracteritzen algunes fruites.

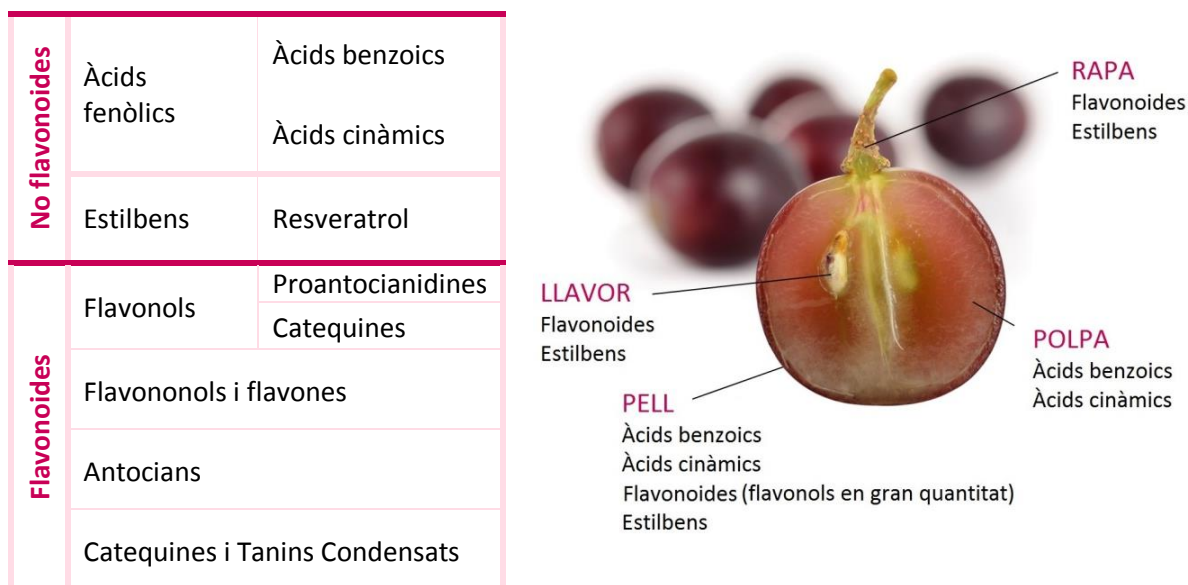


Fig. 1. Compostos fenòlics del raïm i localització en els gotims. Font: Elaboració pròpia.

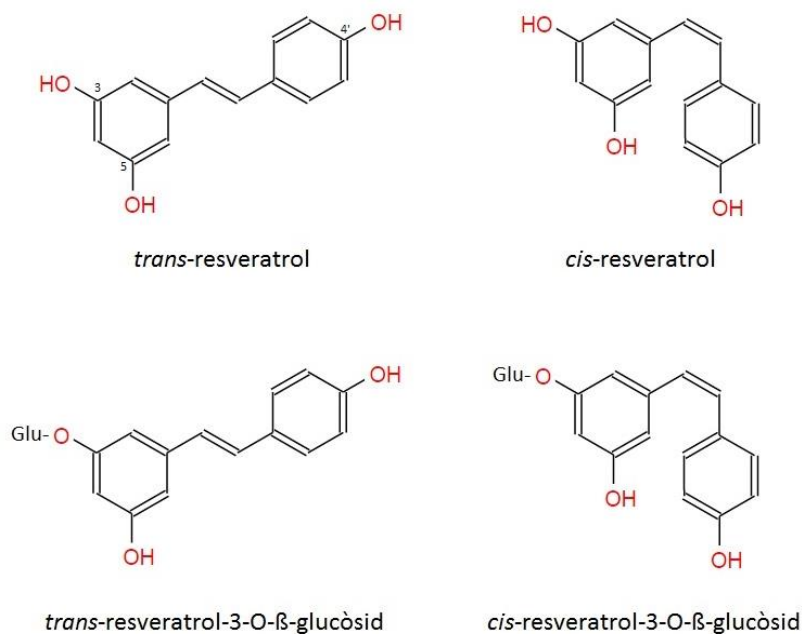
### 1.1.2. Conceptes generals del resveratrol

El resveratrol (3,5,4'-trihidroxitransstilbè) és un micronutrient que pertany al grup dels compostos fenòlics, concretament als estilbenoids. Aquesta molècula és produïda per les plantes com a resposta a l'estrès, ja sigui causat per l'atac de fongs, la sequera, la irradiació ultraviolada o inflamació, i funciona com un antibiòtic protector (fitoalexina). Aquesta molècula ajuda a que les plantes es defensin i mantinguin la salut frenant l'activitat patògena.

La molècula del resveratrol és un compost liposoluble que pot aparèixer en diferents estructures químiques. Es pot presentar en els dos estereoisòmers existents, cis- i trans-resveratrol. Aquestes mateixes també són produïdes com a glucòsids (enllaç amb una molècula de glucosa). Les formes *trans* es poden isomerar en les formes *cis* quan estan



exposades a radiació ultraviolada (Lamuela-Raventós et al., 1995). Un derivat major del resveratrol i abundant en el most és el resveratrol-3-O- $\beta$ -glucòsid, que és la forma glicosilada del resveratrol (Fig. 2.).



**Fig. 2.** Estructures químiques del resveratrol. Font: Elaboració pròpia (via JSmol – SMILES language).

La primera menció que es va fer del resveratrol va ser en un article en japonès publicat per Michio Takoaka al 1939. Aquest investigador juntament amb el seu equip van aïllar per primera vegada el resveratrol a partir de les arrels d'una planta de veladre (*Veratrum album*) (Fig. 3). Probablement li va donar aquest nom al compost pel fet que sigui un derivat del resorcinol i perquè es va aïllar de una de les espècies de *Veratrum*. Anys més tard, els científics moderns van començar a interessar-se pel resveratrol i pel seu valor medicinal a la dècada dels 70 després que es descobrís que les vinyes produeixen resveratrol i es determinés la presència de resveratrol en el vi negre. Tot i així no va ser fins als anys 90 quan es van començar a investigar els efectes del resveratrol en la salut humana i les aplicacions que podia tenir.



**Fig. 3.** *Veratrum album*



## 1.2. Fonts

### 1.2.1. Aliments

El resveratrol es troba en el raïm i els seus derivats, en els cacauets, en el cacau i en les baies d'espècies *Vaccinium* (Fig. 4). La quantitat de resveratrol present en el raïm varia segons com es conrea, el seu origen geogràfic i l'exposició a la infecció fúngica. La quantitat de temps de fermentació que un vi passa en contacte amb la pell del raïm és també un factor important que determina el contingut de resveratrol. A causa que les pells del raïm es retiren aviat durant el procés de producció dels vins blancs i rosats, aquests vins generalment contenen menys resveratrol que els vins negres.

La forma predominant de resveratrol en el raïm i en el most és *trans*-resveratrol-3-O- $\beta$ -glucòsid. Molts vins també contenen quantitats significatives de *cis*-resveratrol, que es produeix durant la fermentació o bé s'allibera a partir de polímers de resveratrol (Viniferina).

Aliment	Quantitat analitzada	Quantitat resveratrol
Raïm negre	146 g	0,01 – 0,26 g
Cacauets (crus)	180 g	0,32 – 1,20 g
Mantega de cacauet	160 g	0,24 – 1,25 g

Fig. 4. Total de contingut de resveratrol en diferents mostres de aliments seleccionats.

### 1.2.2. Suplements alimentaris

La major part dels complements alimentaris de resveratrol (Fig. 5) comercialitzats al nostre país contenen extractes de les arrels de la planta *Polygonum cuspidatum* també anomenada *Fallopia japonica*, la qual recentment s'ha començat a utilitzar com a tractament natural contra el càncer per les seves propietats medicinals beneficioses. Tot i així també podem trobar suplements alimentaris que han estat elaborats a partir de diverses varietats de raïm (*Vitis vinifera*) o bé que contenen una mescla de les dues espècies de plantes. Els suplements de resveratrol poden contenir des de menys d'1mg fins a 500 mg de resveratrol per comprimit o càpsula, però no se sap



Fig. 5. Suplement alimentari de resveratrol elaborat amb *Polygonum cuspidatum* i *Vitis vinifera*



si hi ha una dosi segura i eficaç per a la prevenció de malalties en els éssers humans. Avui en dia els científics tot just han començat a investigar sobre les seves propietats i els efectes adversos que pot tenir.

### 1.3. Metabolisme i biodisponibilitat

Actualment existeixen pocs estudis sobre la biodisponibilitat del resveratrol en humans. Per aquest motiu abans de començar a utilitzar el resveratrol com un producte funcional per prevenir o tractar malalties són imprescindibles els estudis *in vivo*, *ex vivo* i en animals experimentals per tal de poder aconseguir un major coneixement sobre el transport, el metabolisme i l'excreció del resveratrol en el cos humà.

Un cop consumim el resveratrol, ja sigui naturalment a través dels aliments o bé a partir de suplementos alimentaris, aquest és absorbit a l'intestí prim. La major part del compost s'absorbeix a la part de l'intestí denominada jejú ja que se sap que en l'ili únicament s'absorbeix un 38% de la quantitat que és capaç de travessar el fragment anterior. Diversos estudis han comprovat que a altes concentracions de resveratrol aproximadament un 70% d'aquest s'acumula en els enteròcits (cèl·lules absorbents dels budells) fet que comporta que sigui l'òrgan que més es beneficiï de les propietats avantatjoses d'aquest compost.

Una cop ja absorbit el resveratrol es transporta a través dels vasos sanguinis fins al fetge on és ràpidament metabolitzat en glucurònids (qualsevol substància produït enllaçant àcid glucurònic via un enllaç glucosídic) i sulfats per tal de facilitar l'excreció d'aquesta molècula a través de l'orina. Per altra banda, a part de ser eliminat a través de l'orina, alguns estudis han demostrat que el resveratrol pot arribar a ser excretat per la bilis, i ser reabsorbit a nivell intestinal. Això provoca un segon augment de la quantitat de resveratrol en el plasma sanguini a partir d'aproximadament les 6 hores posteriors a la ingesta d'aquesta molècula.

El resveratrol que no és excretat per cap de les dues vies passa del fetge al torrent sanguini a través del qual és transportat unit a cèl·lules sanguínies. El torrent sanguini s'encarrega de distribuir el resveratrol en els diferents teixits. Els principals òrgans on es destina el resveratrol són el tracte gastrointestinal, el fetge, els ronyons i els pulmons, i



en menor quantitat en la melsa, el cor, el cervell i els testicles. El resveratrol destaca per ser una de les molècules capaç de travessar la barrera hematoencefàlica, la qual separa la sang circulant del fluid extracel·lular cerebral en el sistema nerviós central, i actuar en el sistema nerviós.

El resveratrol que no ha pogut ser absorbit a l'intestí prim arriba al còlon on pot ser metabolitzat per la flora intestinal i absorbit per l'intestí gros i posteriorment transformat en els corresponents glucurònids i sulfats; o bé ser excretat. Aquesta quantitat correspondria a un percentatge que varia entre el 0,3% i el 38% del total de resveratrol ingerit.

Els valors màxims de resveratrol i dels seus metabòlits en sang s'assoleixen a les 30 – 60 minuts després de la ingesta. Tot i així el temps que aquestes molècules romanen en el plasma sanguini varia entre les 3 i les 12 hores depenent del tipus de compost i de la dosis ingerida.



## 1.4. Biosíntesi del resveratrol en plantes

El resveratrol és produït per algunes plantes mitjançant l'enzim estilben sintasa. Aquest fabrica la molècula de resveratrol a partir de la transformació d'una molècula de *p*-coumaroil-CoA i tres molècules de malonil-CoA. El resveratrol és sintetitzat per unes 72 plantes, sense tenir en compte les plantes transgèniques, però només quatre d'aquestes es troben habitualment en la nostra dieta (Fig. 6.).

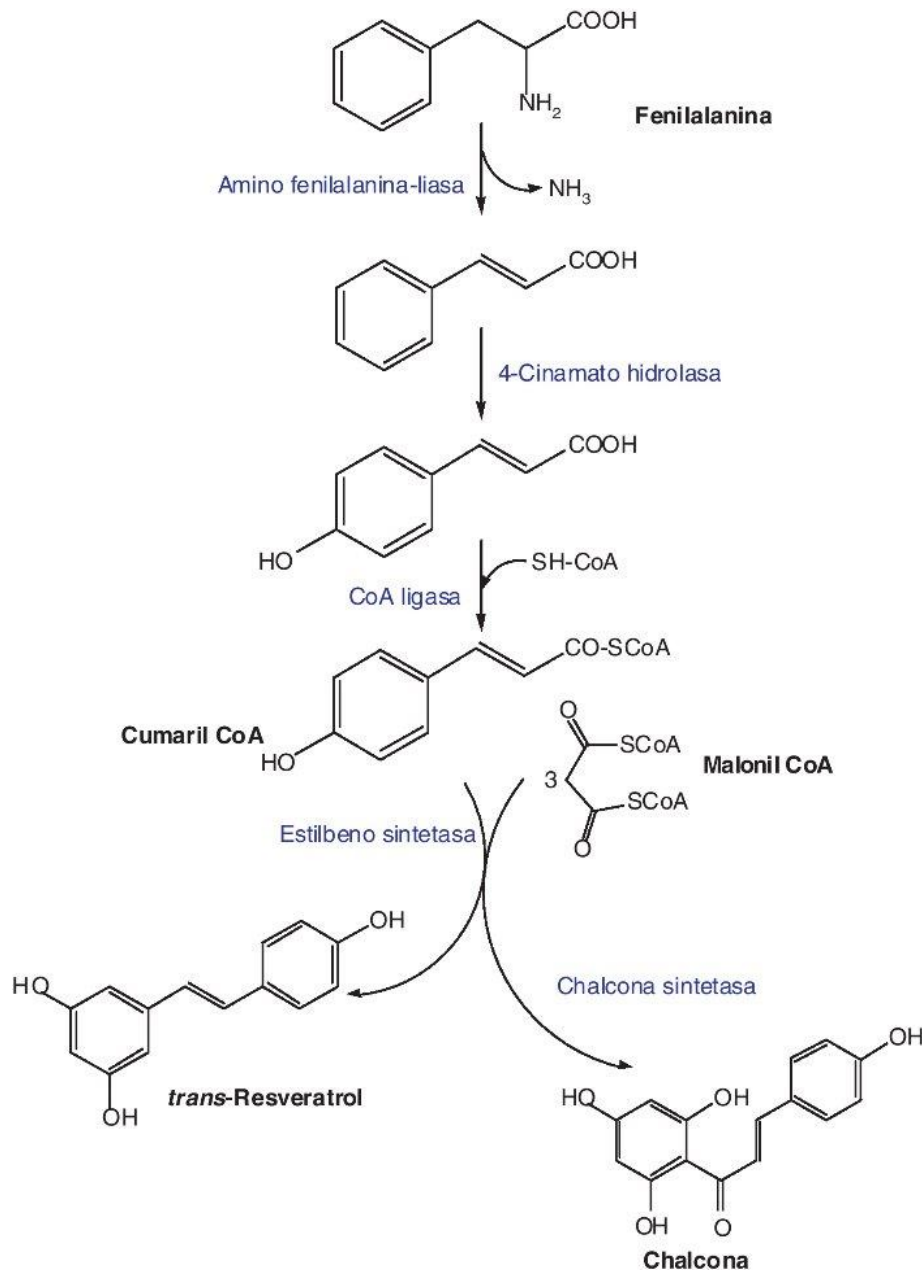


Fig. 6. Via metabòlica de la síntesi del resveratrol en les plantes. Font: Gambini et al., 2013

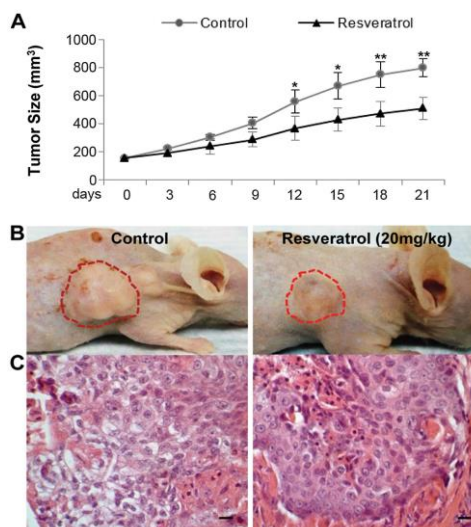


## 1.5. Tractament i prevenció de malalties humanes

### 1.5.1. Càncer

Actualment el càncer és la segona malaltia que causa més mortalitat en els països occidentals. Sota aquest nom s'agrupen un conjunt de poc més de 100 malalties que es caracteritzen per la reproducció incontrolada de les cèl·lules. Aquest fet és degut a una alteració de la informació genètica que contenen les cèl·lules.

Els primers en publicar un estudi sobre els efectes preventius i terapèutics beneficiosos del resveratrol (Fig. 7) en els tres estadis del càncer van ser Jang i el seu equip d'investigació al 1997.



**Fig. 7.** Diferència del desenvolupament d'un tumor entre dos ratolins: un alimentat amb resveratrol i l'altre no. Font: Meihong Zhang et al., 2013

#### Angiogènesi

Com totes les cèl·lules de l'organisme, les cèl·lules canceroses també necessiten una aportació de nutrients per tal de poder reproduir-se i desenvolupar-se. Per tant, la formació dels vasos sanguinis són una etapa important per la formació del tumor. Diversos assajos amb animals experimentals semblen indicar que una dosi regular d'entre 2,5 i 100 mg/kg de pes corporal de resveratrol té la capacitat d'inhibir la formació de nous vasos sanguinis induïda per tumors. Aquesta molècula té la capacitat de controlar diversos enzims i factors involucrats en l'angiogènesi.

#### Enzims i gens

Diversos estudis indiquen que el resveratrol és capaç d'inhibir la capacitat enzimàtica i bloquejar la transcripció dels enzims que oxiden, redueixen i hidrolitzen molècules estranyes per convertir-les en polars i d'aquesta manera facilitar la seva posterior excreció. Aquests enzims també estan relacionats amb l'activació d'alguns pro-cancerígens.





Per altra banda el resveratrol activa i augmenta l'activitat dels enzims antioxidants que tenen un efecte detoxificant sobre les molècules que poden provocar algun dany a l'organisme, incloent aquells productes tòxics que han estat fabricats pels enzims del grup anterior.

#### Alteració del cicle cel·lular i apoptosi

Un altre mecanisme pel qual el resveratrol podria lluitar contra la formació de tumors cancerígens és la inhibició del cicle cel·lular i inducció a l'apoptosi. Hi ha diversos estudis in vivo que documenten aquesta propietat del resveratrol basada en la inhibició del cicle cel·lular de proteïnes i l'augment de l'apoptosi de les cèl·lules tumorals.

#### Capacitat antioxidant

S'ha demostrat que les espècies reactives de l'oxigen tenen un paper importat en la iniciació i el desenvolupament del càncer ja que ocasionen un dany directe a l'ADN. El resveratrol aquest també funciona com a antioxidant. Tot i així és difícil valorar si aquesta capacitat antioxidant ve donada per la molècula en si o bé per la capacitat de controlar l'activitat d'alguns enzims antioxidants.

### **1.5.2. Malalties cardiovasculars**

Dins el nom de malalties cardiovasculars s'engloben totes aquelles malalties que afecten el cor o els vasos sanguinis (artèries i venes). Cada any causen més de 12.000.000 de morts a tot al món, sent d'aquesta manera la principal causa de mort a molts països del món. Les malalties més freqüents són la hipertensió arterial, l'arteriosclerosi, la cardiopatia isquèmica (angina de pit i infart de miocardi) i els accidents cerebrovascular o ictus.

L'arteriosclerosi és un engruiximent i enduriment de les parets de les artèries, així com una disminució de la seva elasticitat. És un procés natural que normalment apareix a les persones d'edat més avançada, encara que es pot accelerar amb la ingestió d'una quantitat excessiva d'àcids grassos saturats i/o colesterol.



La cardiopatia isquèmica és una malaltia del cor que consisteix en la falta d'oxigen al miocardi i la consegüent mort de part de les cèl·lules d'aquest teixit.

En gran part dels accidents cerebrovasculars o ictus es produeix una lesió irreversible en el cervell a causa del trencament d'un dels vasos sanguinis que d'aquest.

En estudis experimentals, s'ha observat que el resveratrol exerceix diversos d'efectes protectors sobre el sistema cardiovascular in vitro, incloent la inhibició de l'activació i agregació de plaquetes, l'afavoriment de la vasodilatació, i el control de la producció de substàncies inflamatòries. No obstant això, sovint les concentracions de resveratrol requerides per produir aquests efectes són superiors a les concentracions de resveratrol mesurats en el plasma humà després del consum oral de resveratrol.

Per altra banda, alguns estudis en animals suggereixen que altes dosis orals de resveratrol podria disminuir el risc de trombosi i l'aterosclerosi; encara que, contràriament, en un altre estudi va observar augment de l'aterosclerosi en els animals alimentats amb resveratrol. Altres efectes protectors de resveratrol in vivo inclouen la reducció de la hipertròfia cardíaca i la reducció de la pressió arterial en diversos models.

### La Paradoxa Francesa

El primer cop que es va plantejar que el resveratrol podia ser utilitzat com a fàrmac per prevenir les malalties cardiovasculars va ser publicat per Renaud i Lorgeril al 1992. En aquest estudi es va associar el vi com a un factor protector contra les malalties cardiovasculars en veure que a França, tot i l'elevat consum de greixos saturats, les persones tenien una esperança de vida més llarga que a països amb una dieta semblant en qüestió de greixos saturats però on consumien una quantitat significativament menor de vi que la que es consumia a França (Fig. 8). Aquest mateix any es va descobrir la presència del resveratrol en el vi i el raïm fet que va portar que s'atribuís al vi una propietat de prevenció de malalties gràcies a aquesta molècula. Posteriorment diversos estudis han confirmat que el resveratrol protegeix als organismes de les malalties cardiovasculars ja que disminueix l'agregació plaquetària, redueix la tensió dels vasos sanguinis i disminueix la quantitat de colesterol perjudicial.

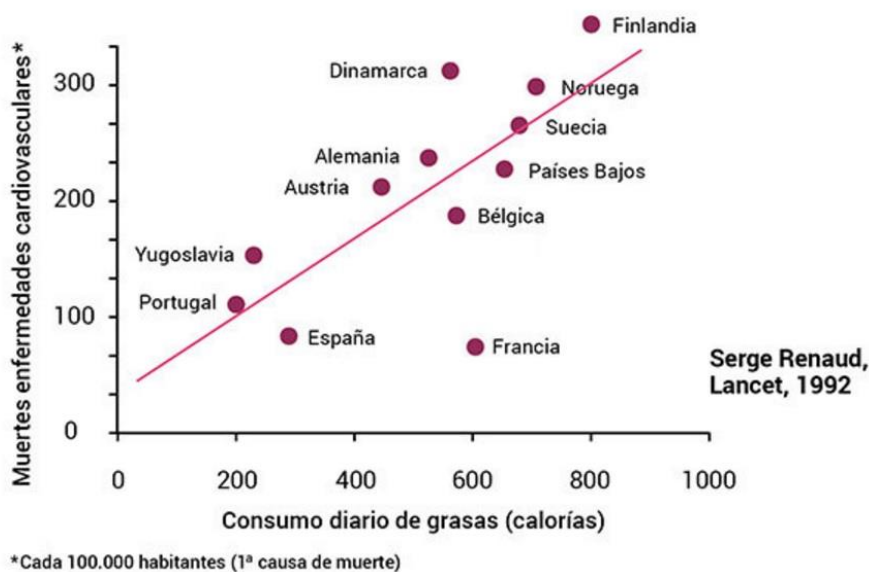


Fig. 8. Morts causades per accidents cardiovasculars segons el país i el consum de calories que li correspon.

### 1.5.3. Envel·liment

(\*Apartat explicat detalladament en el [punt 3](#))

### 1.5.4. Malalties neurodegeneratives

Les malalties neurodegeneratives són un conjunt de patologies que afecten les funcions cognitives de persones de qualsevol edat. Es caracteritzen per una alteració de l'estructura i la funció del sistema nerviós de curs lent, progressiu i irreversible, que s'agreuja amb el pas del temps. Les neurones es degraden progressivament o moren més de pressa del que és habitual. En són exemples la malaltia d'Alzheimer, la malaltia de Parkinson, l'esclerosi múltiple, l'esclerosi lateral amiotròfica (ELA), la demència amb cossos de Lewy o l'atròfia muscular espinal.

#### Estimulació de la neurogènesi i la formació de microvasos

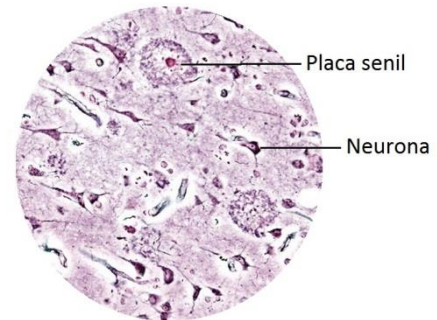
Les alteracions de l'estat d'ànim relacionades amb l'edat i els dèficits de memòria són el resultat d'una disminució en la funció de l'hipocamp. Diversos estudis han demostrat que el resveratrol estimula la neurogènesi i la formació de nous vasos sanguinis en l'hipocamp



de rates d'edat avançada sanes. Aquests canvis estructurals es van associar amb millores significatives en l'aprenentatge espacial, la memòria i l'estat d'ànim.

#### Estimulació de l'eliminació de les plaques o senils

Les plaques senils o amiloides (Fig. 9) són dipòsits extracel·lulars de beta-amiloide en la substància grisa del cervell i que s'associen amb la degeneració de les estructures neuronals. Un nombre elevat d'aquestes plaques amiloides són elements característics de la malaltia de l'Alzheimer. Les plaques senils són tòxiques per a les cèl·lules, el que resulta en la disfunció neuronal i una mort progressiva de les neurones. S'ha observat que en models animals el resveratrol promou l'eliminació de les plaques senils i una major supervivència de les neurones.



**Fig. 9.** Plaques senils en la matèria grassa del cervell. Font: Viquipèdia (edició pròpia)

#### Neuroinflamació

Alguns tipus de cèl·lules neuronals que funcionen de manera anormal al voltant de les plaques senils en el cervell dels malalts d'Alzheimer alliberen substàncies citotòxiques que incrementen els danys cerebrals i el desenvolupament més ràpid d'aquesta malaltia. Es va observar que el resveratrol és capaç d'inhibir la resposta inflamatòria que desencadenada a causa d'aquestes substàncies citotòxiques en models animals.

#### Reducció de l'estrès oxidatiu

La disfunció mitocondrial i l'estrès oxidatiu es creu que participen en la progressió de diversos trastorns neurodegeneratius. El resveratrol contraresta l'estrès oxidatiu i la toxicitat induïda pel pèptid  $\beta$ -amiloide en cultius de neuroblastoma i en models animals. A més, el resveratrol va ser capaç de corregir l'estrès oxidatiu induït experimentalment i la disfunció cognitiva (vulgarment anomenada pèrdua de memòria) en rates.



### 1.5.5. Malalties metabòliques

Una malaltia metabòlica és aquella que no permet el bon funcionament dels processos bioquímics de l'organisme que intervenen en el creixement, la conservació dels teixits de l'organisme, la producció d'energia per dur a terme les diverses funcions del cos i l'eliminació de productes de rebuig. Exemples d'aquestes malalties i que cada cop va en augment el nombre de persones a les que afecten són la diabetis (tipus II) i l'obesitat.

#### Diabetis

La diabetis tipus II, la més freqüent en la població, es caracteritza per la incapacitat de produir insulina o bé només en poca quantitat; per tant les cèl·lules no són capaces de utilitzar la glucosa aportada pels aliments. Normalment aquesta malaltia va associada a persones que presenten sobrepès. A més a més també s'hi relacionen altres patologies com ara malalties cardiovasculars i cerebrovasculars, problemes renals, ceguera, complicacions neurològiques o mort prematura.

Diversos estudis fets amb ratolins sans els quals van ser alimentats amb dietes hipercalòriques el resveratrol va protegir els animals contra la resistència a la insulina. Per altra banda, el mateix procediment però en rates diabètiques el resveratrol va tenir un efecte hipoglucemiant, és a dir, va ajudar a reduir significativament el nivell de glucosa a la sang.

Tot i que encara falta encara més estudis i proves, de moment, els experts expliquen que les investigacions fetes fins a data d'avui semblen indicar que el resveratrol és adient com a fàrmac per tractar la diabetis de tipus II.

#### Obesitat

L'obesitat és una malaltia crònica causada per factors diversos, tant genètics com ambientals, que es caracteritza per un increment de pes en funció de les característiques individuals (altura, corpulència, edat, sexe), produït per una acumulació excessiva de greix al cos. Es calcula que actualment aproximadament un 15 % de la població espanyola pateix obesitat, i més de la meitat de la població té excés de pes. La obesitat no és pas un



simple problema estètic, sinó que comporta un seguit de problemes per a la salut, tant física com psíquica.

En un estudi es van alimentar ratolins amb dietes hipercalòriques, complementades (grup 1) o no amb resveratrol (grup 2). Aquests van ser comparats amb ratolins alimentats amb una dieta equilibrada i normal en calories (grup 3) durant dos anys. Van observar que aquest últim grup de ratolins no va presentar canvis significatius el pes ni en la massa corporal.

Els ratolins alimentats amb dietes hipercalòriques sense complements alimentaris de resveratrol van incrementar molt el seu pes; en canvi els ratolins alimentats amb dietes hipercalòriques però complementades amb resveratrol van augmentar el seu pes però de manera significativament inferior als que no van ingerir complements. Tot i així, el resultat més sorprenent de l'estudi va ser que els ratolins complementats amb resveratrol van presentar la mateixa supervivència que els ratolins del grup 3. Això va ser degut a que el resveratrol va ser capaç de modificar diverses reaccions metabòliques i modular l'acció d'alguns enzims.

Aquest estudi mostra com el resveratrol pot reduir alguns efectes negatius que comporta l'obesitat, obrint una nova línia d'investigació per el tractament d'aquesta malaltia que cada cop augmenta en nombre de casos en tot el món.

## **1.6. Perills i seguretat**

Els efectes adversos que pot comportar un consum regular d'una dosi determinada de resveratrol encara no han estat establerts. La major part dels estudis que s'han fet han estat amb animals experimentals i els resultats obtinguts no permeten donar una conclusió concisa i decisiva que garanteixi la seguretat d'aquesta substància. Tampoc s'ha determinat les dosis màximes ni la freqüència en que es pot consumir.

En rates, l'administració oral diària de trans-resveratrol en dosis de fins a 700 mg / kg de pes corporal durant 90 dies va donar lloc a diversos efectes adversos aparents. Altres estudis de toxicitat realitzats en models animals estima que el nivell en el qual no s'observen efectes adversos del resveratrol era d'entre 200 i 600 mg/kg al dia en rates i gossos, respectivament. El resveratrol no és conegut per presentar cap tipus de toxicitat o



causar efectes adversos significatius en els éssers humans, però hi ha hagut pocs assaigs clínics controlats fins a l'actualitat. Un assaig que va avaluar la seguretat dels suplementes alimentaris orals de trans-resveratrol en 10 individus va trobar que una sola dosi de 5.000 mg va donar lloc a efectes adversos greus. En un estudi de seguiment realitzat en humans es va observar que els individus que consumien més de 1.000 mg/dia de resveratrol patien efectes secundaris gastrointestinals lleus (nàusees, dolor abdominal i diarrea).

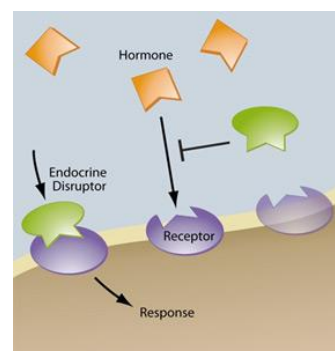
### 1.6.1. Interaccions amb altres medicaments

Les persones que consumeixen medicaments antiplaquetaris o anticoagulants, que impedeixen que les cèl·lules sanguínies anomenades plaquetes s'amunteguin i formin coàguls, han d'evitar els complements alimentaris de resveratrol ja que el resveratrol inhibeix l'agregació plaquetària i, per tant, poden augmentar el risc de sagnat.

Per altra banda, el resveratrol pot augmentar el risc de patir efectes secundaris i disminuir la dosi absorbida pel cos de les persones que prenen medicaments metabolitzats pels enzims CYP (citocroms P450).

### 1.6.2. Activitat estrogènica: disruptors hormonal

Els estrògens endògens són les hormones esteroides sintetitzades pels éssers humans i altres mamífers; aquestes hormones s'uneixen als receptors d'estrògens dins de les cèl·lules. El complex receptor d'estrògens interacciona amb seqüències úniques en l'ADN per regular l'expressió de gens que responen a l'estrogen. El fet de ser un estrogen vegetal suggereix que el resveratrol també podria funcionar com un agonista d'estrogen, és a dir, podria unir-se als receptors d'estrogen i provocar respostes similars als estrògens



**Fig. 10.** Esquema que mostra com actuen els disruptors hormonal. Font: PKD DIET

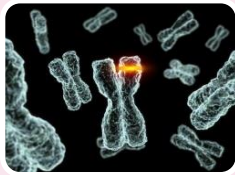
endògens (Fig. 10). Aquest fet pot ser perjudicial per a l'organisme ja que pot activar gens que condueixen a l'estimulació de la proliferació de cèl·lules de càncer. Per tant, els pacients amb càncers sensibles a les hormones (com el càncer de pit, d'ovaris o d'úter) han de tenir precaució i no prendre suplementes alimentaris de resveratrol.



## 2. L'ENVELLIMENT BIOLÒGIC

### 2.1. Introducció

All llarg de la història s'han proposat diverses teories que intenten explicar la envelliment. Tot i així el més probable és que aquest fet sigui causat per la influència dels diversos factors que explica cada teoria. Siguin quines siguin les causes és un fenomen que experimentem tots els éssers vius (amb excepcions comptades) al llarg de la vida i hi ha factors que l'acceleren i altres que fan que avanci més a poc a poc.



#### **Teories biològiques**

Són aquelles teories basades en l'explicació de l'envelliment dels òrgans, aparells i sistemes.



#### **Teories psicològiques**

Són aquelles teories centrades en aspectes cognitius i de personalitat.



#### **Teories socials**

Són aquelles teories que fan referència a les relacions socials que estableixen i l'estatus de vida que tenen les persones d'edat avançada.

En aquest treball ens centrarem en les teories biològiques ja que són les que es tindran en compte a l'hora de fer l'experiment i també les que són menys subjectives; les teories psicològiques i socials depenen de cada individu.

L'envelliment biològic podria ser definit com el conjunt de transformacions fisiològiques i anatòmiques que apareixen sobre els éssers vius com a conseqüència del pas del temps. Suposa una disminució de la capacitat d'adaptació en cada un dels òrgans, aparells i sistemes, així com de la capacitat de resposta als agents nocius que incideixen en l'organisme. És difícil determinar un inici d'aquest procés. Tot i així s'ha de tenir en compte que no és cap patologia sinó que és una etapa més de la vida (com ara la infantesa o l'adolescència).

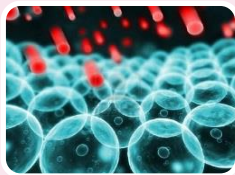




## 2.2. Teories biològiques de la senescència

Dins aquest grup hi trobem diverses teories proposades per científics diferents al llarg de la història. Tot i així, com ja s'ha dit anteriorment, és possible que l'envelliment sigui causat per una mescla dels factors que explica cada teoria.

Goldstein i col·laboradors les han revisat detingudament i finalment les han dividit en dues grans categories:



### Teories no estocàstiques

Són aquelles teories que suposen que l'envelliment estaria predeterminat.



### Teories estocàstiques

Són aquelles teories que afirmen que el procés d'envelliment seria el resultat de la suma d'alteracions que ocorren de forma aleatòria i s'acumulen al llarg del temps.

### 2.2.1. Teories estocàstiques

#### Teoria de l'error catastròfic

Va ser proposada per Orgel al 1963, tot i així, actualment una bona part de la comunitat científica no l'accepta.

Aquesta teoria explica l'envelliment biològic com una acumulació d'errors en la síntesi proteica que al final acabaria danyant la funció cel·lular.

Se sap que es produeixen errors en els processos de transcripció i transducció durant la síntesi de proteïnes, però no hi ha evidències científiques que aquests errors s'acumulin en el temps. Contràriament a aquesta teoria hi ha l'observació que no canvia la seqüència d'aminoàcids en les proteïnes d'animals vells respecte dels joves i que, per tant, la quantitat de RNA<sub>t</sub> defectuós no augmenta amb l'edat.



### Teoria de l'entrecreuament

Aquesta teoria postula que tindrien lloc enllaços o entrecreuaments entre les proteïnes i altres macromolècules cel·lulars, el que determinaria l'envelliment i el desenvolupament de malalties lligades a l'edat.

La problemàtica d'aquesta teoria és que no explica tots els fenòmens relacionats amb l'envelliment, sinó que només n'engloba algun. Per exemple, se sap que el desenvolupament de cataractes és degut a que les proteïnes del cristal·lí pateixen glicosilació i es comencen a creuar entre elles.

### Teoria del desgast

La teoria del desgast proposa que cada organisme està format per parts que no poden ser substituïdes; l'acumulació de lesions en aquestes parts vitals causarien la mort de les cèl·lules, teixits, òrgans i finalment de l'organisme (Fig. 11). La capacitat de reparació de l'ADN es relaciona amb la longevitat de les diverses espècies.



**Fig. 11.** Procés d'envelliment tal i com el planteja la teoria del desgast. Font: Instituto Médico Laser.

### Teoria dels radicals lliures

(\*aquesta teoria està explicada detalladament en l'apartat de "La influència del resveratrol en l'envelliment biològic", concretament en el punt 2)

La teoria en qüestió va ser proposada al 1956 per Denham Harman. En l'actualitat és una de les teories més conegudes entre a societat. La teoria dels radicals lliures proposa que l'envelliment seria el resultat d'una inadequada protecció contra el dany produït al teixits pels radicals lliures. Es creu que aquests podrien malmetre els cromosomes i a diverses molècules com per exemple el col·lagen, l'elastina, alguns glúcids o els lípids. A més a



més, un fet que està comprovat científicament, és que els radicals lliures tenen un paper important en el desenvolupament de malalties cardiovasculars, càncer, cataractes i Alzheimer, entre altres.

### **2.2.2. Teories no estocàstiques**

Les teories englobades en aquest grup proposen que l'envelliment seria una continuació del procés de desenvolupament que experimenta un organisme, i correspondria a la última etapa dins una seqüència d'esdeveniments codificats al genoma.

Tot i que actualment no hi ha evidència que en els éssers humans existeixi un gen únic que determini l'envelliment, sí que hi ha evidències científiques que demostren el control genètic de la longevitat.

#### Teoria del marcapassos

Proposada per Burnet al 1970, aquesta teoria exposa que el sistema immunitari i el sistema neuroendocrí serien marcadors essencials de l'envelliment. La seva involució estaria genèticament determinada per tenir lloc en moments específics de la vida.

#### Teoria genètica

És clar que el factor genètic té un paper important en el procés de l'envelliment, tanmateix, encara no es coneixen tots els gens i els mecanismes que hi intervenen. En els últims anys s'ha aconseguit identificar utilitzant els organismes model diversos gens intervenen en l'envelliment d'aquestes espècies, alguns similars als dels humans. Un d'aquests gens, testat en l'organisme model *S. cerevisiae* és el SIRT, a partir del qual es sintetitzen les proteïnes sirtuïnes. Aquestes regulen l'expressió genètica mitjançant el silenciament de diversos gens (Explicat en detall en l'apartat 3 del bloc "La influència del resveratrol en l'envelliment").



### 3. INFLUÈNCIA DEL RESVERATROL EN L'ENVELLIMENT BIOLÒGIC

#### 3.1. Introducció

Ja en les antigues civilitzacions egípcies, gregues i romanes hi trobem referències sobre un ús medicinal del raïm i, concretament, del vi. Destaca Hipòcrates, un grec que va realitzar una investigació exhaustiva sobre les aplicacions que podia tenir el vi per curar febres, la convalescència i com a antisèptic. També va estudiar el seu efecte sobre els excrements dels seus pacients. Els metges grecs prescrivien diversos tipus de vins per usar-los com analgèsics, diürètics, tònic i digestius. Tot i així, els grecs també eren conscients dels efectes adversos del vi per a la salut, especialment si es consumia sense moderació. Fins i tot hi van haver intel·lectuals que van determinar quina dosi era òptima per utilitzar el vi com un remei.

#### 3.2. Propietats antioxidants

##### 3.2.1. L'oxidació

L'oxidació es defineix com la interacció entre les molècules d'oxigen i totes les diferents substàncies que poden posar-se en contacte, des de metalls a teixits d'éssers vius. Tot i així, després del descobriment dels electrons, l'oxidació va poder ser definida amb més precisió com la pèrdua d'almenys un electró quan dos o més substàncies interactuen. Aquestes substàncies poden o no incloure oxigen.

Quan s'oxida un àtom o compost les seves propietats canvien. Per exemple, quan un objecte de ferro pateix una oxidació es transforma perquè ha perdut electrons; el ferro és un metall fort, estructuralment ferm, mentre que el ferro rovellat és una pols vermellosa fràgil.

Quan es tracta de l'oxigen, el procés de l'oxidació depèn de la quantitat d'oxigen present en l'aire i la naturalesa del material amb el qual està en contacte. La veritable oxidació té lloc a un nivell molecular, és a dir, nosaltres només podem veure els efectes a gran escala.

En la major part dels casos, l'oxidació es produeix simultàniament amb un procés anomenat reducció. La reducció, que és el procés contrari a l'oxidació, consisteix en



l'obtenció d'almenys un electró. En una reacció d'oxidació-reducció o redox, dos molècules intercanvien electrons (Fig. 12).

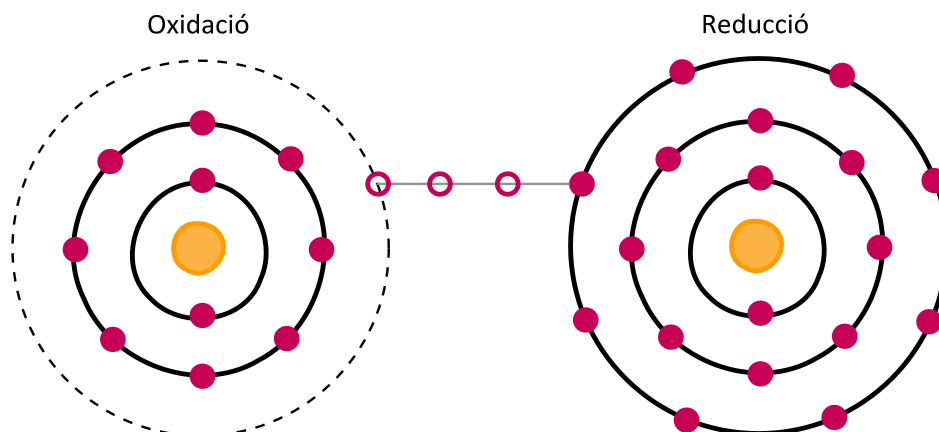


Fig. 12. Esquema d'una reacció redox. Font: Elaboració pròpia.

### 3.2.2. Radicals lliures

S'anomenen radicals lliures a aquelles molècules que han estat oxidades i, per tant, són molt inestables i altament reactives. Són substàncies que exerceixen una activitat citotòxica ja que, a causa d'aquesta reactivitat, poden danyar les cèl·lules saludables.

El comportament químic d'un àtom es determina pel nombre d'electrons en la seva capa més externa. Quan la capa més externa està plena, l'àtom és estable i tendeix a no participar en les reaccions químiques. Tanmateix, quan la capa més externa no està plena, l'àtom és inestable. Aquest tractarà d'estabilitzar-se, ja sigui guanyant o perdent un electró per tal omplir o buidar la seva capa més externa. Per tal de completar la seva capa de valència també pot compartir els seus electrons amb un altre àtom inestable mitjançant un enllaç covalent.

Els radicals lliures es formen quan un d'aquests enllaços entre els electrons és trencat i en un d'aquests àtoms romanen un nombre imparell d'electrons. Això vol dir que l'electró desaparellat és químicament reactiu que tractarà de robar un electró d'una molècula propera per tal d'assolir la seva estabilitat electroquímica.

Una vegada es forma un radical lliure i té èxit en l'obtenció d'un altre electró d'una molècula propera, deixant-la sense un electró i, per tant, convertint-la en un radical lliure que, al seu torn, també tractarà de robar un electró. El resultat és el que s'anomena una



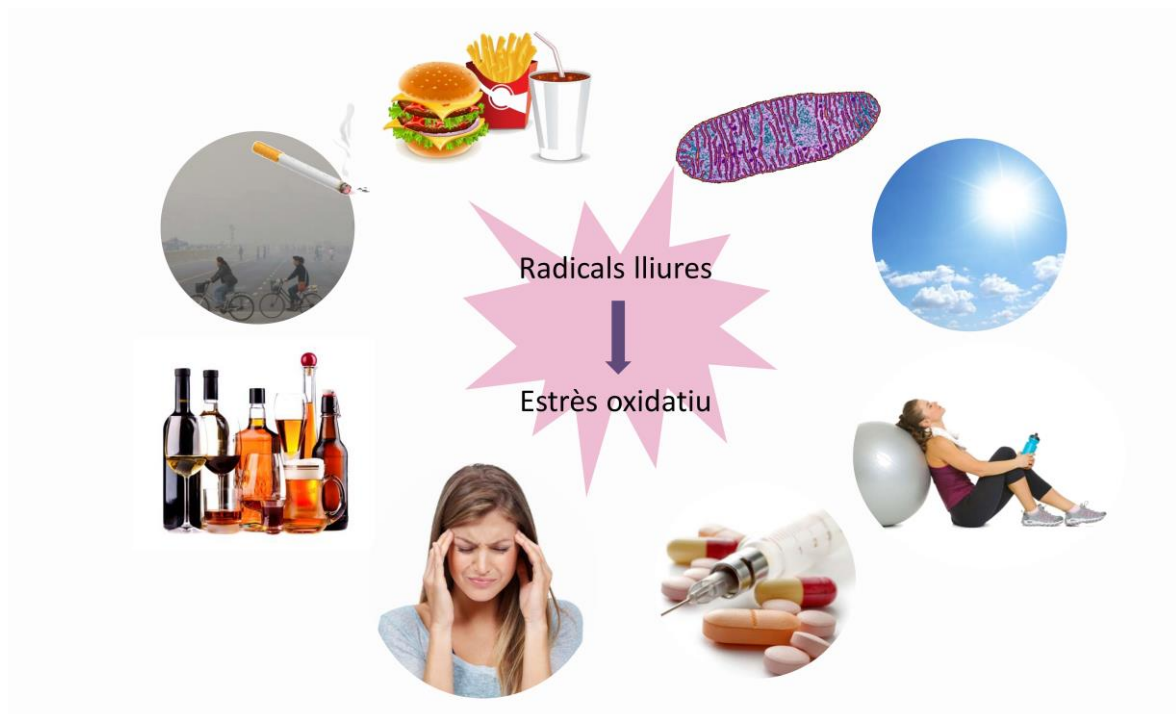
cascada de radicals lliures, una reacció en cadena en que els radicals lliures malmeten el teixit viu així com el material genètic.

### Formació i danys dels radicals lliures a les cèl·lules

Els radicals lliures poden formar-se a través de processos fisiològics humans naturals, així com de manera espontània en el medi ambient.

Pel que fa els factors externs, la generació de radicals riures pot ser el resultat d'una mala dieta, l'estrès, el tabaquisme, l'alcohol, l'exercici, la inflamació, les drogues o l'exposició a la llum solar i aire contaminants. Mentre que hi ha molts tipus de radicals lliures que es poden formar, el més comú en aeròbic (respiració d'oxigen) dels organismes són radicals lliures d'oxigen, sovint anomenats espècies d'oxigen com a reactiu (ROS), que inclouen superòxids, anions hidroxil, peròxid d'hidrogen i oxigen singlet (estat excitat de l'oxigen).

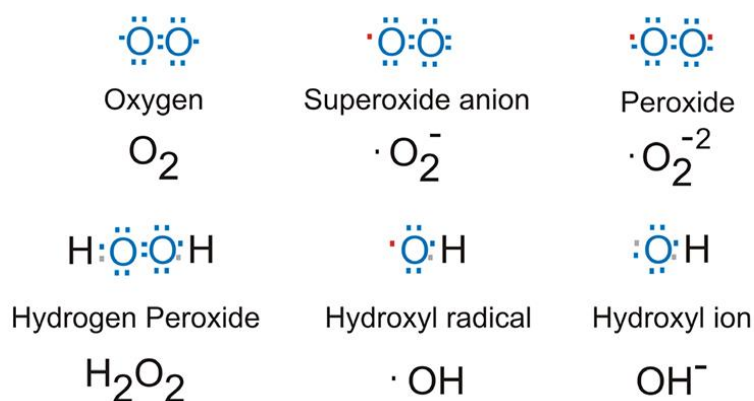
Tenint en compte els factors interns es produeixen en el metabolisme dels aliments, la respiració, l'exercici físic. A més, a vegades, el sistema immunològic del cos els crea amb el propòsit de neutralitzar els virus i bacteris (Fig. 13).



**Fig. 13.** Causes externes que indueixen a la formació de radicals lliures i al consegüent estrès oxidatiu. Font: Elaboració pròpia.



En el cas dels radicals lliures que es formen a causa del metabolisme dels organismes aeròbics, tot i que es poden formar molts tipus de radicals lliures, són radicals lliures d'oxigen, sovint anomenats espècies reactives de l'oxigen (ROS), que inclouen superòxids, anions hidroxil, peròxid d'hidrogen i singlet oxigen; així com altres de menys importants com ara les espècies reactives del nitrogen (RNS) i les espècies reactives del clor (RCS) (Fig. 14). La generació endògena de ROS és una part normal del metabolisme dels ésser humans. En efecte, sota condicions fisiològiques, la major part dels teixits d'un organisme humà genera quantitats significatives de ROS. Entre les ROS més generades, destaca el radical lliure anió superòxid; que, a nivell cel·lular, es genera principalment a través de la cadena de transport d'electrons, a la membrana interna dels mitocondris.



**Fig. 14.** Espècies reactives de l'oxigen (ROS – Reactive oxygen species, en anglès). Font: BioTek.

En el cos humà, tenim una gran varietat de molècules que són més susceptibles als atacs dels radicals lliures que altres. Aquestes inclouen greixos, ADN, ARN, les membranes cel·lulars, proteïnes, vitamines i carbohidrats.

Desafortunadament, l'oxigen és molt susceptible a la formació de radicals lliures, i en els organismes aerobis, això pot ser letal. Els radicals lliures d'oxigen estan implicats en el procés de l'envelliment general i són responsables de la dermatoheliosi (fotoenvelliment) (Fig. 15), el càncer i la inflamació a la pell. Els radicals lliures d'oxigen causen la peroxidació lipídica, que resulta en danys a les membranes cel·lulars; pot causar l'envelliment prematur, càncer de pell i la mort cel·lular.





**Fig. 15.** Aquesta font mostra una imatge publicada al *The New England Journal of Medicine*. Mostra un home amb dos aspectes sorprenentment diferenciats a banda i banda. La història que hi ha darrere aquesta foto és senzilla. Es tracta d'un camioner que durant aproximadament 30 anys va conduir amb la finestra baixada. Per tant estava exposat directament a la llum del sol únicament pel costat esquerre. En aquesta imatge es pot apreciar l'efecte que té el sol sobre la pell. Els UVA del sol, a part de causar mutacions a l'ADN, generen radicals lliures. Per tal d'eliminar-los i neutralitzar el dany que ocasionen el cos posa en marxa diversos mecanismes. Un d'aquests és la degradació de les fibres de col·lagen, que són les encarregades de mantenir la pell tensa i estirada.

### 3.2.3. Els antioxidants

Un antioxidant, en el sentit més general de la paraula, pot ser definit com qualsevol molècula capaç de prevenir o retardar l'oxidació (pèrdua d'un o més electrons) d'altres molècules, generalment substrats biològics com ara lípids, proteïnes o àcids nucleics. Contraresten l'acció dels radicals lliures o de les espècies reactives de l'oxigen (ROS).

Tot i que existeixin diverses formes per classificar els antioxidants, la classificació més habitual és segons si són antioxidants bio-sintetitzats per l'organisme, i aquells que s'ingereixen a través de la dieta.

Entre el primer grup es diferencia entre:

- Els antioxidants enzimàtics, com ara l'enzim superòxid dismutasa. Aquest enzim s'encarrega d'atenuar l'efecte dels radicals superòxids generats als mitocondris. El superòxid dismutasa permet la transformació dels radicals superòxid, a oxigen i peròxid d'hidrogen. Donat que l'acumulació de peròxid d'hidrogen podria ser perjudicial per la cèl·lula, gran part d'aquest compost és ràpidament reduït a aigua a l'interior dels mitocondris.
- Els antioxidants no enzimàtics com ara el glutatió, l'àcid úric, la metal·lotioneïna, l'ubiquinol o coenzim Q i la melatonina.

Si bé els aquests grups són principalment bio-sintetitzats per l'organisme humà, la dieta pot contenir també aquests antioxidants. Tot i així, cal destacar que aportació





que suposa per a l'organisme la ingesta d'aquests antioxidants a través dels aliments, no és molt significativa; doncs, experimenten una degradació o biotransformació notable en el tracte gastrointestinal.

Respecte als antioxidants ingerits a través de la dieta, principalment a través de la fruita, es classifiquen en:

- Vitamines antioxidants, com per exemple l'àcid ascòrbic o vitamina C i el beta carotè o pro-vitamina A.
- Carotenoides (com la luteïna, la zeaxantina i el licopè).
- Els polifenols, que és el grup en el qual s'inclouria el resveratol, molècula estudiada en aquest treball.
- Altres compostos que no formen part de les categories anteriors.

Tots les antioxidants són capaços de prevenir o retardar l'oxidació d'un substrat biològic i, en alguns casos revertir el dany oxidatiu de les molècules afectades; tanmateix tenen maneres d'actuar diferents.

En primer lloc tenim els antioxidants que actuen directament amb espècies reactives. Aquest mecanisme és el més conegut, encara que no necessàriament és el més eficient en dur a terme la seva funció. Consisteix en la capacitat que tenen molts antioxidants per actuar com a estabilitzadors o eliminadors de l'activitat de diverses espècies reactives. Aquesta funció es pot desenvolupar de dues maneres diferents. El primer cas consisteix en que l'antioxidant cedeix un electró a l'espècie reactiva, com a conseqüència l'antioxidant es converteix en un radical lliure que té la capacitat d'oxidar-se fins que s'obté una forma que té una baixa o nul·la reactivitat vers el seu entorn (mecanisme SET = *single electron transfer*). Juntament a aquest mecanisme molts antioxidants poden estabilitzar els radicals lliures a través d'un mecanisme que implica la transferència directa d'un àtom d'hidrogen (electró amb el protó corresponent). En aquest cas el radical lliure també queda estabilitzat electrònicament (mecanisme HAT = *hydrogen atom transfer*). Usualment aquests mecanismes són emprats per antioxidants no-enzimàtics, siguin bio-sintetitzats o bé ingerits a través dels aliments.

Per altra banda es troben els antioxidants que prevenen la formació enzimàtica d'espècies reactives. Alguns antioxidants poden actuar prevenint la formació de ROS i



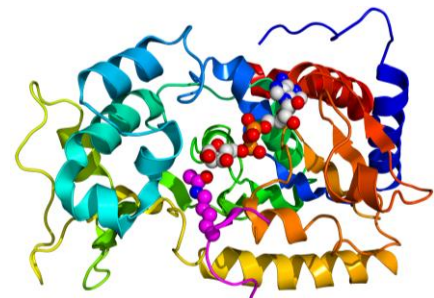
RNS. Ho duen a terme inhibint, ja sigui l'expressió, la síntesis i l'activitat dels enzims pro-oxidants involucrats en la generació d'espècies reactives.

Per últim hi ha la prevenció de la formació d'espècies reactives dependent de metalls, un segon mecanisme que també implica la inhibició de la formació d'espècies reactives relacionada amb invertir la reacció de Fenton. Aquesta reacció es produeix quan es catalitza el peròxid d'hidrogen amb metalls de transició, generalment ferro, donant com a resultat la generació de radicals altament reactius de l'hidroxil.

El resveratol és capaç de dur a terme el primer i el segon mecanisme explicats anteriorment, és a dir, pot actuar directament sobre els radicals lliures o, en alguns casos, pot prevenir la formació enzimàtica dels radicals lliures inhibint l'oxidació de diversos compostos. Per aquest motiu és considerat un dels antioxidants més potent.

### 3.3. Estimulació de la producció de sirtuïnes

La primera vegada que es va parlar sobre els enzims sirtuïnes (Fig. 16) va ser l'any 1991 quan Leonard Guarente va aconseguir demostrar en llevats i mosques que un enzim anomenat sirtuïna era necessària per allargar la vida mitjançant la restricció calòrica.



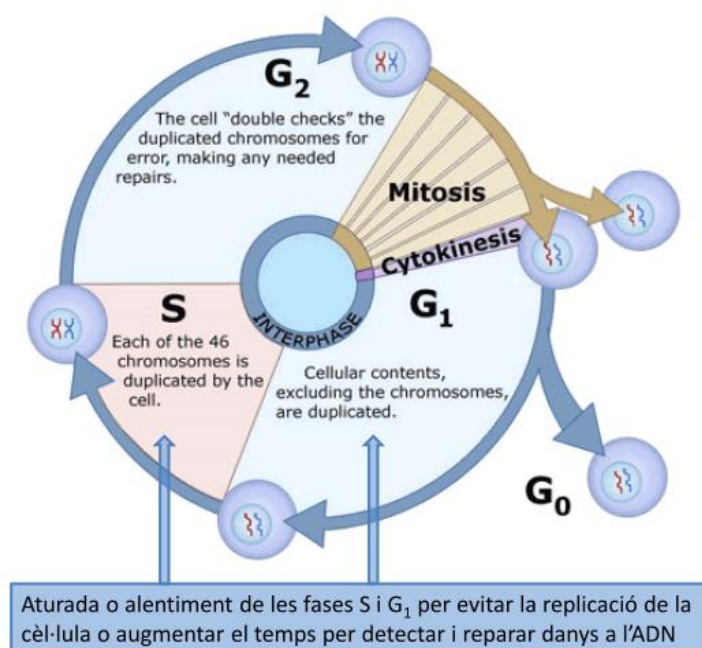
**Fig. 16.** Estructura tridimensional d'un enzim sirtuïna. Font: Viquipèdia.

Tant en les cèl·lules procariotes com en les eucariotes hi ha un grup de gens denominats SIRT (Reguladors de la Informació de Silenciament) que inactiven l'ADN o part d'ell. Les sirtuïnes són enzims que es sintetitzen a partir d'aquests gens (SIRT); tenen funció enzimàtica i es troben tant en organismes procariotes com en eucariotes. Estan regulats pel coenzim  $\text{NAD}^+$  Actualment es coneixen 7 tipus d'aquests gens (SIRT1-SIRT7).

Aquestes molècules estan implicades en una àmplia varietat de processos cel·lulars com l'envelliment, la transcripció de l'ADN, l'apoptosi, la inflamació, la resistència a l'estrès oxidatiu, la prevenció i retardament del càncer, de les malalties neurodegeneratives, de l'obesitat i la diabetis, del fotoenvelliment i de l'arteriosclerosi; també estableixen un control sobre la biogènesi mitocondrial, és a dir, la formació de nous mitocondris.



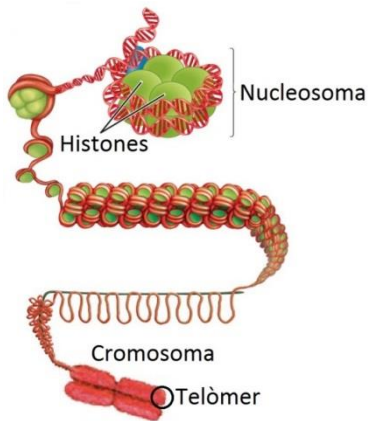
Per altra banda les sirtuïnes actuen modulant l'acció del gen p53, denominat també com a "el guardià del genoma", que està situat al cromosoma 17. Aquest gen és essencial per induir una resposta a la cèl·lula davant el dany de l'ADN. Entre les funcions d'aquest gen destaca l'activació de les proteïnes de reparació de l'ADN quan reconeix el seu dany o mutació; la supressió tumoral, per tant, indueix l'apoptosi de la cèl·lula si el dany de l'ADN és irreparable, evitant d'aquesta manera la proliferació de les cèl·lules que contenen l'ADN mutat; i l'aturada del cicle cel·lular en el punt de control o la fase G<sub>1</sub> i S si reconeix el dany de l'ADN per evitar la replicació de la cèl·lula (Fig. 17). També està involucrat en processos com la senescència i l'angiogènesi.



**Fig. 17.** Fases d'acció de la reparació del dany a l'ADN per part del gen p53.

L'ADN de totes les cèl·lules o part d'ell pot estar en silenci o bé expressar-se activament. Els gens SIRT sintetitzen les sirtuïnes que fan la funció de regular la informació genètica que s'expressa activament o que queda silenciada.

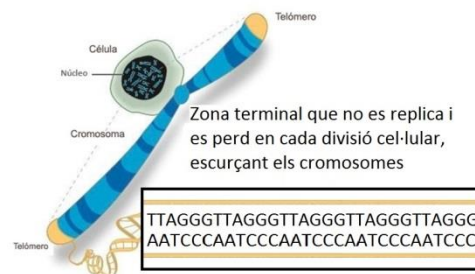
Les sirtuïnes són desacetilases d'histona; les histones són proteïnes al voltant de les quals l'ADN s'enrotlla per mantenir-se compacte, formant unes estructures denominades nucleosomes (Fig. 18). Aquestes cadenes de nucleosomes formen la cromatina, subestructura dels cromosomes.



**Fig. 18.** Estructures que adquireix l'ADN per empaquetar-se i que estan molt relacionades amb l'acció dels enzims sirtuïnes. Font: Pearson Education, 2011.

Quan en una histona hi ha grups acetil afegits, l'ADN es troba dèbilment unit a aquestes i, per tant, és transcrit amb més facilitat. Contràriament si una histona té menys grups acetil, l'ADN s'hi trobarà fortament unit i, en conseqüència, s'inhibirà la seva transcripció ja que els enzims involucrats en aquest procés no poden accedir a l'ADN. Les sirtuïnes eliminen els grups acetil de les histones, fet que comporta que aquests fragments d'ADN quedin silenciats i que no es transcrivin. Podem dir, doncs, que les sirtuïnes regulen l'expressió gènica. Aquestes modificacions sobre l'empaquetament de l'ADN poden ser heretades tot i haver estat produïdes per factors ambientals (epigenètica).

En els telòmers és on les histones estan més acetilades, per tant, més vulnerables i exposades a la transcripció; és per això que a mesura que les cèl·lules es divideixen els telòmers es van escurçant progressivament, i conseqüentment també s'escurcen els cromosomes (Fig. 19).



**Fig. 19.** Telòmer i la zona del qual no es replica. Font: edició pròpia

Se sap que en cada divisió es perden entre 50 i 70 nucleòtids. Podem dir, doncs, que la llargada dels telòmers determina l'edat biològica de les cèl·lules. Arriba un moment en que la llargada dels telòmers és tant curta que no poden dur a terme la seva funció de protecció i reparació de l'ADN correctament.

Les sirtuïnes, que són enzims desacetiladors, confereixen una protecció important als telòmers ja que eliminen els grups acetil de les histones fent que d'aquesta manera l'ADN adquireixi una estructura més compactada i que, per tant, s'eviti la transcripció dels telòmers.



Hi ha diverses molècules capaces d'actuar com activadores de les sirtuïnes, sent el resveratrol un exemple d'aquest tipus de molècules i, actualment, el més estudiat per a fer aquesta funció.

L'any 2003 David Sinclair va descobrir que les sirtuïnes podien ser activades no només per una dieta baixa en calories sinó també per uns compostos naturals anomenats polifenols, dels quals el més eficaç descobert fins a data d'avui és el resveratrol.

Tot i així, recentment, s'ha qüestionat la positivitat del fet que el resveratrol activi les sirtuïnes (desacetilases d'histona) ja que s'ha observat que el fenomen descrit està relacionat amb diversos tipus de càncer si hi ha una activitat anormal d'aquestes molècules.



#### 4. ORGANISMES MODEL: SACCHAROMYCES CEREVISIAE

Un organisme model és una espècie no humana sobre el qual es fan estudis per tal d'entendre determinats fenòmens biològics, amb l'expectativa que els descobriments realitzats en el model d'organisme proporcionarà informació sobre el funcionament d'altres organismes. Els organismes model són models *in vivo* i són principalment utilitzat per dur a terme experimentació biomèdica quan l'experimentació humana seria inviable o poc ètica.

Alguns dels organismes model més comuns i àmpliament utilitzats en la comunitat són, per ordre de complexitat són; *Escherichia coli*, *S. cerevisiae*, fongs mucilaginosos, *Caenorhabditis elegans* (Cuc), *Arabidopsis thaliana*, *Drosophila melanogaster*, *Danio rerio* (peix zebra), *Xenopus laevis* (Granota amb ungles africana), *Gallus gallus* (Gall), *Mus musculus* (ratolí), gats, gossos i diferents espècies de micos (Fig. 20).

En aquest treball ens centrarem en l'organisme *S. cerevisiae*. La seva elecció ve determinada per diferents fets, entre els quals destaca: la semblança del seu genoma amb el dels humans, el fet de ser un organisme eucariota, el ràpid creixement en el medi de cultiu YPD, el fàcil comptatge (totes les cèl·lules presenten una mateixa morfologia i no s'observa presència de bacteris) i la bona resistència a l'alcohol; quan s'inocula aquest llevat en cada un del tubs experimentals comença a créixer, a produir alcohol, factors que comporten que els possibles llevats i bacteris presents al raïm siguin ràpidament desplaçats per el llevat *S. cerevisiae*.

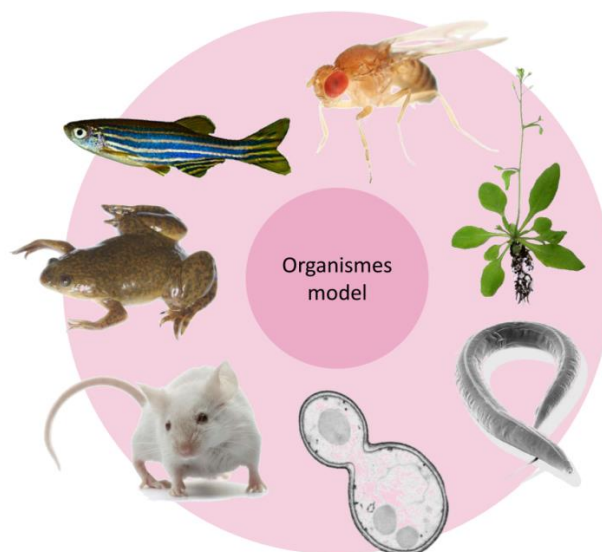


Fig. 20. Organismes model més utilitzats. Font: elaboració pròpia.





#### 4.1. Característiques generals

L'organisme *S. cerevisiae* és una espècie de llevat, és a dir, un fong unicel·lular eucariota (en grec, *eu-* vertader; *carion-* nucli) que es reproduïx per gemmació o per fissió. Les cèl·lules es caracteritzen per ser globuloses, ovalades o allargades, i solen estar aïllades o bé en petits grups. Generalment mesuren de 5 a 10 µm de diàmetre llarg i de 3 a 8 µm de diàmetre curt; que és al voltant de cinc vegades la mida de la major part de bacteris (Fig. 21). Es troba de manera espontània a la natura allà on hi ha substrats rics en sucres o als exsudats i sabses dolces d'algunes plantes.

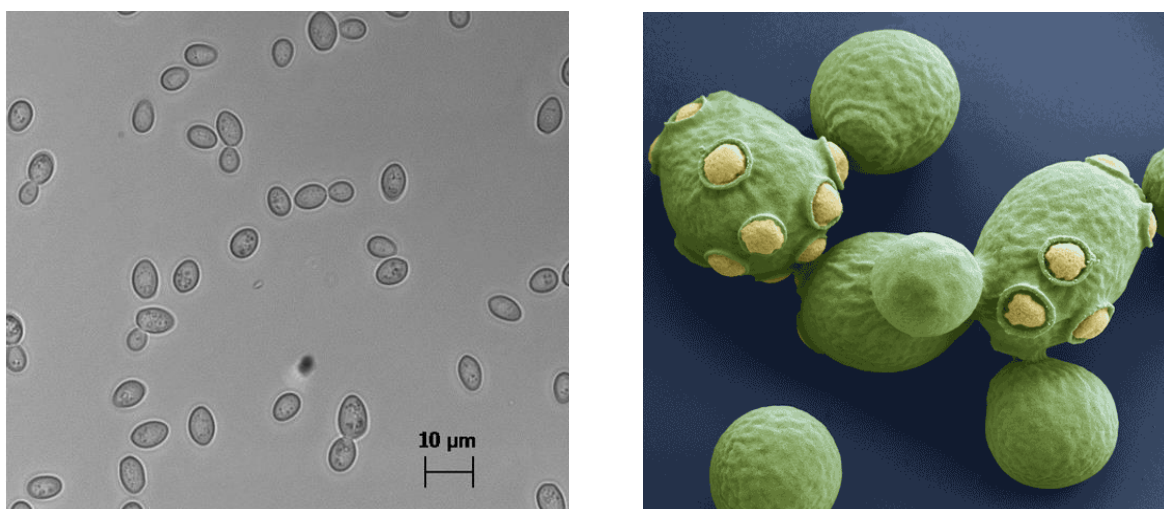


Fig. 21. *S. cerevisiae* vist des d'un microscopi òptic i des d'un microscopi electrònic.

#### 4.2. Història

*S. cerevisiae* té darrere seu una llarga història en l'ús en l'àrea de processament d'aliments. També conegut com a llevat del pa o llevat de la cervesa, aquest organisme ha estat utilitzat durant segles com a llevat per elaborar el pa i com fermentador de begudes alcohòliques.

El 1897, els germans Hans i Eduard Buchner van obtenir extractes lliures de cèl·lules molent llevat per pa amb grans de sorra, als quals van afegir-hi grans quantitats de sucre de canya per evitar la seva possible contaminació. Per a la seva sorpresa, van trobar que el sucre es fermentava ràpidament: per primera vegada s'havia descobert un organisme model per a l'estudi de la fermentació alcohòlica. Aquest descobriment va atreure l'atenció dels bioquímics, que van decidir analitzar cada un dels passos que conduïen a la



producció d'etanol i diòxid de carboni a partir de la glucosa. La via metabòlica que permet la utilització de glucosa va ser la primera ruta metabòlica descrita, i la metodologia emprada per aconseguir-ho es va utilitzar per a l'estudi posterior d'altres vies que constitueixen el metabolisme cel·lular.

A partir del segle XX, s'han anat descrivint una sèrie de característiques que fan de l'espècie *S. cerevisiae* un organisme òptim per a la investigació científica. Algunes d'aquestes característiques són la fàcil obtenció d'aquest organisme, l'excel·lent genètica, la fàcil clonació dels seus gens, possessió dels orgànuls bàsics de les cèl·lules eucariotes i la similitud del control del cicle cel·lular amb els animals, entre moltes altres.

Actualment, *S. cerevisiae* és probablement l'organisme model més utilitzat pels científics per tal d'entendre l'anatomia molecular i la fisiologia de les cèl·lules, així com els receptors de membrana i transmembrana, el control del cicle cel·lular, els enzims i les proteïnes implicades / involucrades en la transducció de senyals de la membrana cel·lular al nucli (procés de transferència de senyals i informació a través dels receptors de membrana).

### 4.3. Obtenció de matèria i energia

Per norma general, els llevats mantenen dos tipus de metabolisme ben diferenciats. En presència d'oxigen duen a terme un metabolisme aeròbic en el qual a través de la glucòlisi, el cicle de Krebs i la cadena de transport d'electrons, obtenen una gran quantitat d'energia (36 ATP per molècula de glucosa). En aquest tipus de metabolisme l'acceptor final d'electrons és l'oxigen. Per tant, en el medi no hi hagi presència d'oxigen hauran de buscar una via metabòlica diferent per metabolitzar la glucosa i obtenir energia. En aquest cas es continuarà efectuant la glucòlisi però després utilitzaran un metabolisme fermentatiu alcohòlic, en el qual s'obtindrà una menor quantitat d'energia ( 2 ATP per cada molècula de glucosa).

Al procés de la glucòlisi, que té lloc al citosol, una molècula de glucosa de (6C) es transforma en dues molècules de piruvat (3C cadascuna). Aquesta conversió requereix una seqüència de nou reaccions enzimàtiques dividides en dues fases: la primera en la qual es gasten ATPs i la segona en la qual se'n formen.





L'àcid pirúvic procedent del procés de la glucòlisi passa des del citosol a la matriu mitocondrial amb l'ajut de transportadors específics de les membranes mitocondrials. Una vegada a l'interior de la matriu mitocondrial l'àcid pirúvic sofrirà una descarboxilació oxidativa que consisteix en la pèrdua del grup carboxil ( $-\text{COOH}$ ) que s'allibera en forma de  $\text{CO}_2$ . El producte final de la reacció serà l'acetil CoA, producte intermediari que entrarà en el cicle de Krebs. Aquesta reacció ve catalitzada per un complex enzimàtic, el piruvat deshidrogenasa.

Els grups acetil, produïts a partir del pirúvic, s'oxiden en reaccions oxidatives catalitzades enzimàticament a l'interior de la matriu mitocondrial a través de l'anomenat cicle de Krebs. Es tracta d'un conjunt cíclic de reaccions en les quals a cada volta els dos carbonis que hi entren procedents de l'acetil CoA seran transformats en  $\text{CO}_2$ , mentre que els electrons implicats en aquesta reacció oxidativa són transferits a les molècules transportadores de  $\text{NAD}^+$  i  $\text{FADH}_2$ . A més, el cicle de Krebs produeix una molècula d'ATP en forma d'GTP mitjançant un procés de fosforilació a nivell de substrat.

Està formada per una sèrie de proteïnes transportadores d'electrons situades en la cara interna de les crestes mitocondrials i que transfereixen electrons procedents de l'oxidació del substrat fins a l' $\text{O}_2$ , el qual serà reduït i formarà posteriorment aigua.

La fosforilació oxidativa és el darrer pas del catabolisme i suposa el procés en què s'allibera la major part de l'energia metabòlica de les molècules orgàniques; en aquest procés, les molècules de  $\text{NADH}$  i  $\text{FADH}_2$  transfereixen cap a l'oxigen molecular ( $\text{O}_2$ ) els electrons que han obtingut de l'oxidació dels combustibles biològics (glucosa i àcids grassos). Aquesta reacció allibera una gran quantitat d'energia que és utilitzada per produir ATP; la resta s'allibera en forma de calor.

La fermentació alcohòlica consisteix en la transformació de la glucosa en etanol i  $\text{CO}_2$ . L'àcid pirúvic produït a la glucòlisi es descarboxila i es transforma en acetaldehid (etanal) que és posteriorment reduït pel  $\text{NADH}$  a etanol. La finalitat principal d'aquest procés és oxidar els  $\text{NADH}$  per tal que es puguin tornar a utilitzar de nou en la glucòlisi (Fig. 22).

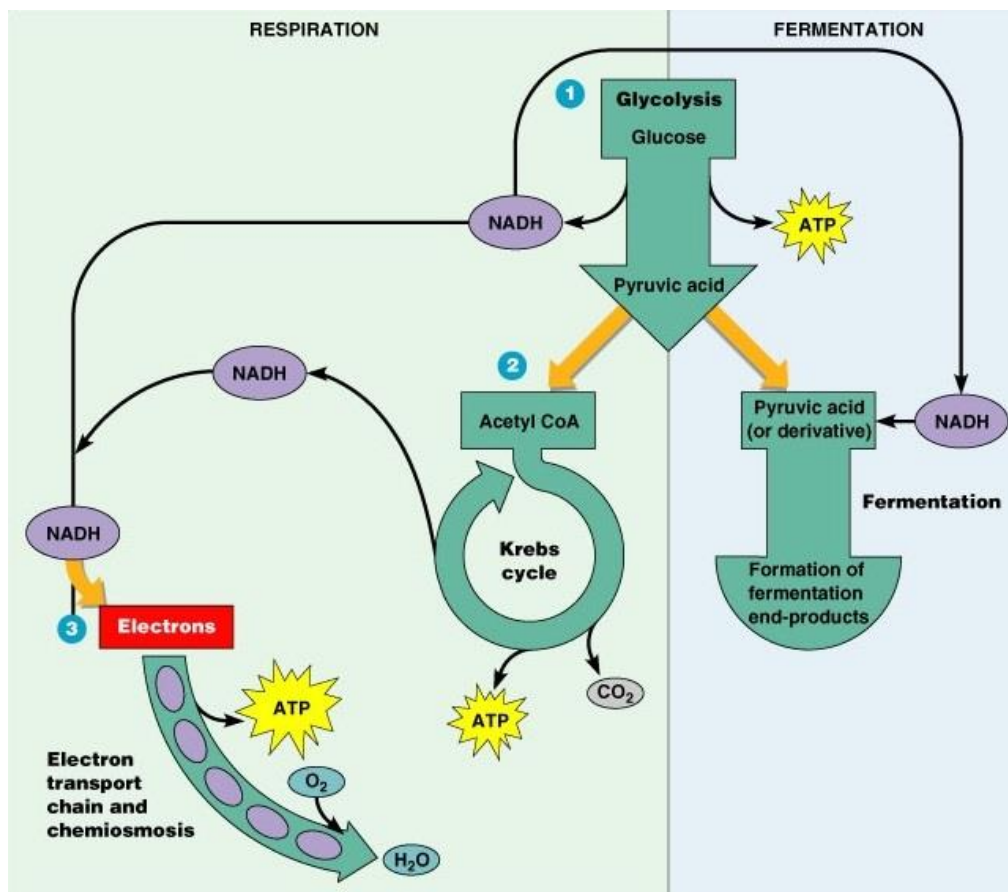


Fig. 22. Metabolisme dels llevats (*S. cerevisiae*). Font: Pearson Education.

#### 4.4. Cicle cel·lular

El cicle de vida dels llevats generalment es pot dividir en quatre fases ben diferenciades, determinades principalment per la quantitat d'oxigen en el medi (Fig. 23).

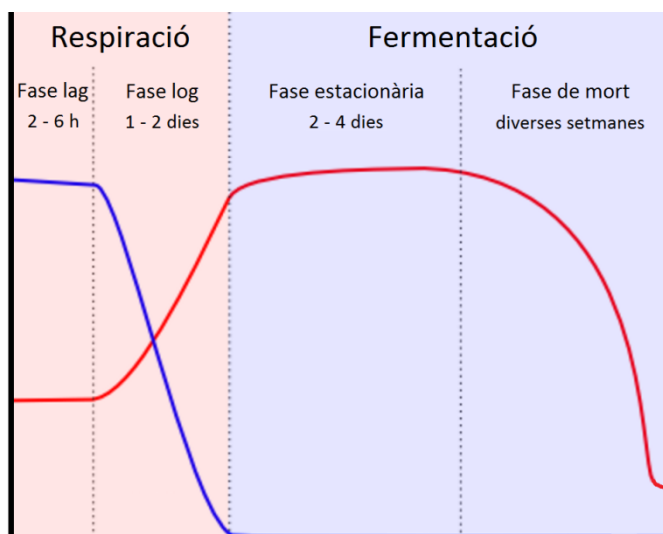


Fig. 23. Fases del creixement d'un llevat.



#### 4.4.1. Fase lag

La fase lag és el temps durant el qual el llevat s'aclimata al brou i prepara el seu metabolisme per a la reproducció i l'alt consum de sucres que hi va lligat.

En aquesta fase, l'oxigen és extremadament important. L'oxigen és utilitzat pel llevat per sintetitzar els esterols i els àcids grassos insaturats, que són factors essencials pel creixement del llevat. Sense oxigen aquests lípids no poden ser sintetitzats i el creixement serà molt limitat. Els esterols i els àcids grassos produïts són també molt importants en l'estructura de la membrana cel·lular i la capacitat que tindrà el llevat per respondre a les tensions internes o externes. Una quantitat adequada d'oxigen en el medi durant questa primera fase és essencial per a una fermentació òptima i per la salut, a llarg termini, de la colònia.

Durant la fase lag, el llevat també consumeix aminoàcids, pèptids, proteïnes, i altres nutrients que obté de les reserves d'energia internes de la cèl·lula (glicogen) fins que la membrana es torna permeable als sucres del medi.

#### 4.4.2. Fase log

La fase log és l'etapa de creixement exponencial del cultiu de llevat. La preparació del llevat feta en la fase lag permet la ràpida multiplicació de les cèl·lules i, per tant, el consum de sucre. El nitrogen, aminoàcids, nutrients, i el sucre es consumeixen mentre les cèl·lules es reproduïxen.

Podem començar a explicar l'etapa en qüestió de partint d'una colònia diploide, que en condicions de falta de nutrients, esporula i dona quatre espores haploides (dues "a" i dues "α"). Cada una d'aquestes quatre espores pot germinar i donar lloc a una colònia haploide "a" o "α", a partir del procés denominat gemmació, que consisteix en formació d'una cèl·lula filla idèntica genèticament a la cèl·lula mare a partir d'una protuberància que va creixent i, un cop es desenganxa, acaba donant lloc la cèl·lula filla, més petita (al principi) que la cèl·lula inicial. Aquest tipus de reproducció, en condicions òptimes, dura unes dues hores.



Si en un moment donat una cèl·lula "a" es troba amb una cèl·lula "α" aquestes actuen com a gàmetes, es fusionen i donen un zigot diploide sumant les seves dotacions cromosòmiques respectives. Aquesta nova cèl·lula diploide també pot reproduir-se per gemmació i formar una colònia diploide que, en falta de nutrients, esporularà i, d'aquesta manera s'iniciarà de nou el cicle.

Tanmateix aquest cicle presenta una complicació més, l'homotal·leisme, que consisteix en que les formes "a" i "α" es poden convertir l'una amb l'altra indiferenciadament. En conseqüència una a les soques homotal·liques, una mateixa espóra donarà lloc a un mescla de cèl·lules "a" i "α" i, com que les cèl·lules diploides presenten un creixement més ràpidament que les haploides, s'originarà sempre més colònies diploides (Fig. 24).

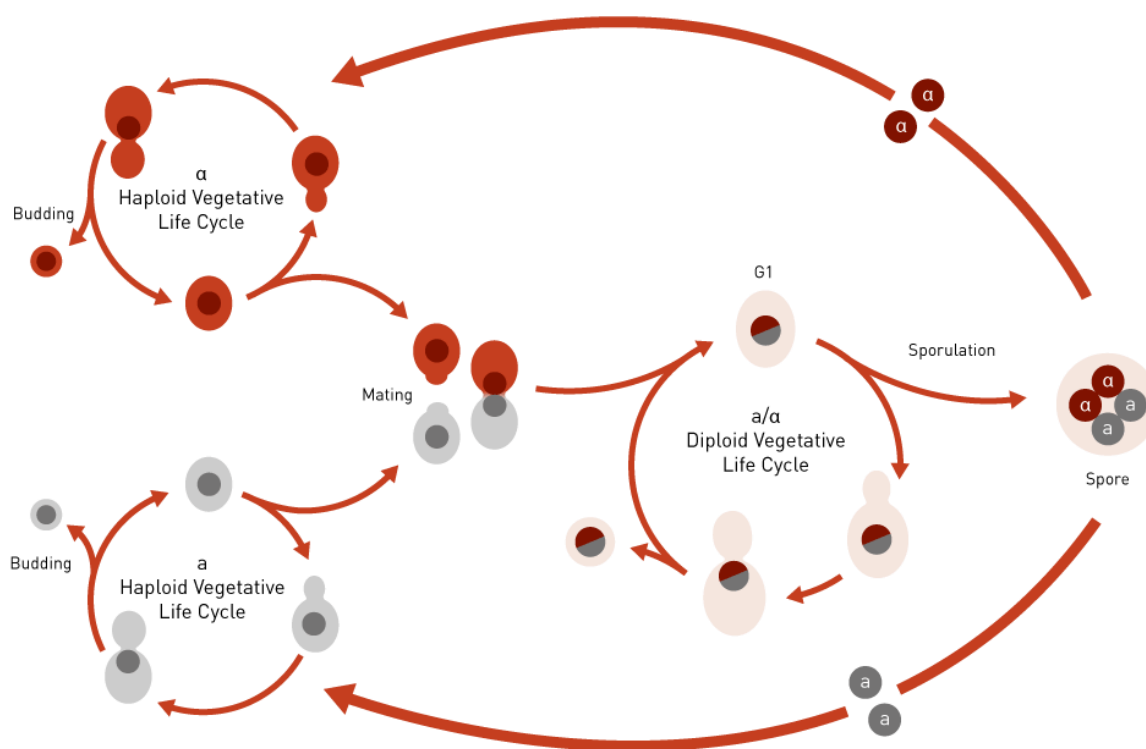


Fig. 24. Esquema del cicle de vida d'un llevat. Font: Singer Instruments.

#### 4.4.3. Fase estacionària

La fase estacionària és l'última etapa en què la població de llevat aconsegueix la màxima densitat i els sucres restants es consumeixen. A mesura que el sucre i nitrogen disminueix disponibles, els llevats comencen a preparar-se per un període on hi ha una manca d'aliments.



Quan el llevat han consumit tot el sucre, la floculació (fenomen que consisteix en l'aglomeració de diferents substàncies en coàguls o flocs) comença. En aquest moment també es comencen a convertir o a reduir alguns compostos menys desitjables, especialment diacetil, a compostos més acceptables.

#### **4.4.4. Fase de mort**

Des del punt de vista microbiològic, un microorganisme mor quan perd de manera irreversible la capacitat de dividir-se o bé si ja no presenta activitat metabòlica. El fonament d'aquesta definició és que si un microorganisme ha perdut la capacitat de dividir-se no podrà formar una colònia sobre un medi de cultiu i no serà possible detectar la seva presència pels mètodes microbiològics tradicionals. És a dir, quan no es produeix augment en el nombre de microorganismes no hi ha creixement. No obstant això, un microorganisme pot estar mort des del punt de vista microbiològic i continuar desenvolupant una activitat metabòlica que es tradueixi, per exemple, en alliberament de toxines.

Tot i així, considerem que la mort del llevat correspon a la mort cel·lular, és a dir, quan el llevat ja no desenvolupa cap tipus d'activitat metabòlica. Aquest fet es pot donar per dues raons: davant la falta de nutrients o d'acumulació de toxines en el medi una resposta del llevat és l'apoptosi, la mort programada de les cèl·lules. Per altra banda si el llevat és en un medi ric en nutrients les cèl·lules poden morir de velles, és a dir, les que ja han donat moltes cèl·lules filles (de 15 a 30 o 40, segons la soca) entren espontàniament en apoptosi sigui quina sigui la disponibilitat de nutrients.

# PART EXPERIMENTAL

---

Propietats terapèutiques del raïm  
El resveratrol





## 1. Objectius

1. Comprovar si el resveratrol augmenta la longevitat del llevat *S. cerevisiae* en un medi determinat.
2. Comprovar si hi ha alguna relació entre la supervivència dels llevats amb la varietat de raïm que conté més resveratrol i polifenols.
3. Observar si hi ha diferències entre la dinàmica de creixement i la supervivència dels llevats en els medis on s'ha afegit només pells de raïm amb els que només s'hi ha afegit la polpa.
4. Comparar l'efecte del resveratrol amb el d'un altre antioxidant per excel·lència, la vitamina C.
5. Observar com augmenta la viabilitat en el medi dels llevats segons les concentracions de resveratrol i vitamina C en aquest.

## 2. Hipòtesis

1. Gràcies a les propietats del resveratrol explicades anteriorment el medi que conté resveratrol s'espera que presenti una mortalitat més baixa que els altres medis i que, per tant, allargui la supervivència de les cèl·lules.
2. Potser les varietats de raïm que contenen més resveratrol i polifenols ajuden a que la mortalitat de cèl·lules en el medi sigui més baixa.
3. Com que les pells, a diferència de la polpa, contenen més resveratrol potser el medi on s'hi ha afegit pells hi haurà major supervivència.
4. La dinàmica de les poblacions dels medis on s'hi ha afegit resveratrol o vitamina C s'espera que sigui semblant ja que els dos exerceixen un paper antioxidant. A més a més, els valors de mortalitat es pensa que seran baixos gràcies a aquesta propietat.
5. Potser, a més concentració de resveratrol o de vitamina C en el medi, menys mortalitat hi haurà ja que a més concentració, més augmenta l'efecte protector contra els radicals lliures d'aquests compostos.



### 3. Introducció teòrica

Abans de començar a explicar el procediment i els materials utilitzats en la part experimental cal tenir en compte alguns conceptes teòrics.

#### 3.1. Varietats de raïm

Per tal de dur a terme l'experiment es van seleccionar quatre varietats de raïm que es cultiven al Penedès segons la quantitat de resveratrol que contenen d'acord amb les dades proporcionades per Rosa María Lamuela Raventós (Grup antioxidants naturals, Facultat de farmàcia, UB) (Fig. 25).

grape variety	°Brix	µg/g of dry skin			total amount
		<i>trans</i> -resveratrol	<i>trans</i> -piceid <sup>a</sup>	<i>cis</i> -piceid <sup>b</sup>	
white					
Parellada	16	12.54	9.92	37.80	60.26
Parellada	15	11.04	8.08	43.27	62.39
Parellada	19	16.59	nq <sup>c</sup>	5.50	22.09
Macabeo	19	47.60	5.04	11.82	64.46
Chardonnay	18	26.25	12.13	39.68	78.22
Xarel·lo	18	18.13	64.31	307.18	389.61
red					
Cariñena	19	18.32	24.03	11.14	53.49
Cariñena	21	21.35	38.43	20.89	80.66
Cariñena	17	17.28	20.89	12.39	50.55
Cabernet Sauvignon	20	26.65	11.12	51.31	89.09
Cabernet Sauvignon	17	19.35	5.49	9.80	34.64
Cabernet Sauvignon	21	39.38	6.44	4.00	49.83
Merlot	16	38.26	342.66	645.47	1026.39

<sup>a</sup> Quantified as *trans*-resveratrol. <sup>b</sup> Quantified as *cis*-resveratrol.  
<sup>c</sup> nq, not quantified; *cis*-resveratrol was not detected.

**Fig. 25.** Contingut de resveratrol i de piceid en diferents varietats de raïm. En aquesta taula tres de les quatre varietats utilitzades. Font: Romero-Pérez et al. 2001

Les varietats de raïm utilitzades van ser, el merlot (varietats negres), el pinot noir i el xarel·lo (varietat blanca), com a varietats amb un alt contingut de resveratrol, i el parellada (varietat blanca), com a varietat amb un baix contingut de resveratrol (Fig. 23). El xarel·lo, tot i ser una varietat blanca, té un alt contingut de resveratrol; és una excepció en aquest grup.

- El xarel·lo és una varietat de raïm blanca pròpia del Penedès i del Camp de Tarragona, emprada per a l'elaboració del cava. Es tracta d'una varietat de cep blanca, equilibrada, sedosa i saborosa. Els gotims, de color groc ambarí, són de mida mitjana,





poc compacte, de forma esfèrica, dolç i de pell gruixuda. És caracteritzat pel seu gust dolç i aroma fresc i afruitat, recordant a la poma i a la llimona. La planta és molt sensible a les gelades i plagues. L'època de brotada és al març (primerenca) i l'època de maduració és a finals d'agost-setembre.

- El parellada, també anomenat montòneg o martorella, és una varietat de raïm blanca, característica del Penedès. El raïm és gros i compacte i el gra, irregular, gros i de pell gruixuda. S'adapta bé als terrenys situats entre 300 i 600 m d'altitud, ha estat conreada tradicionalment a la part alta del Penedès i en llocs poc fèrtils i pedregosos.
- El merlot és una varietat de cep negra originària de la regió de Bordeus però que s'ha adaptat perfectament al clima mediterrani, en zones sense gelades de primavera. Els gotims, de mida petita, són rodons i de color negre blavós. És de maduració primerenca. Aquesta varietat, originària de Bordeus, s'ha estès per diferents zones vitícoles del món i s'ha adaptat molt bé al Penedès.
- El pinot noir és una varietat de cep negra originària de la Borgonya i introduïda a moltes regions vinícoles, com ara el Penedès, en el qual ha demostrat una gran capacitat d'adaptació. El gotim és petit, de color negre morat, la pellofa és gruixuda i la polpa és suau. El sabor depèn molt del clima i del terreny on és cultivat; es caracteritza pel seu aroma que recorda a la maduixa i la cirera. Aquesta varietat és de floració i maduració primerenca (Fig. 26).



**Fig. 26.** Varietats de raïm utilitzades. Per ordre: merlot, pinot noir, xarel·lo i parellada.



## 4. Materials i mètodes

### 4.1. Material

- Alcohol etílic.
- Morter.
- Paper de filtre.
- Cotó fluix.
- Balança.
- Centrifugadora.
- Llevat: *S. cerevisiae* (Saflager S-23).
- Medi YPD És el medi més complet en el qual es pot fer créixer llevats i el que se sol usar per créixer *S. cerevisiae*. Aproximadament un litre del brou de YPD conté 10g d'extracte de llevat, 20g de peptona i 20 grams de glucosa (font d'energia). El medi líquid és aigua destil·lada.
- Incubadora.
- Mostres de raïm.
- Cambra de recompte de Thoma.
- Pipetes automàtiques.
- Microscopi òptic.
- Tubs d'assaig cònics graduats (15 mL).
- Tubs de centrífuga.



## 4.2. Toxicitat i nivell de bioseguretat (BSL)

Una tasca prèvia a realitzar abans de començar l'experiment és analitzar la toxicitat dels reactius o substàncies que utilitzarem així com el nivell de bioseguretat de l'organisme model emprat (*S. cerevisiae*) (Fig. 27).

Table 5. Relation of risk groups to biosafety levels, practices and equipment

Risk Group	Biosafety Level	Laboratory type	Laboratory practices	Safety equipment
1	Basic - Biosafety Level 1	Basic teaching, research	GMT	None; open bench work
2	Containment - Biosafety Level 2	Primary health services; diagnostic, research	GMT plus protective clothing, biohazard sign	Open bench plus BSC for potential aerosols
3	High Containment - Biosafety Level 3	Special diagnostic, research	As Level 2 plus special clothing, controlled access, directional air flow	BSC and/or other primary devices for all activities
4	Maximum containment - Biosafety Level 4	Dangerous pathogen units	As Level 3 plus airlock entry, shower exit, special waste disposal	Class III BSC, or positive pressure suits in conjunction with Class II BSCs, double ended autoclave (through the wall), filtered air

GMT: Good Microbiological Techniques (Chapter 5)  
BSC: Biological Safety Cabinet

Fig. 27. Nivells de bioseguretat. Font: University of Iowa.

El llevat *S. cerevisiae* està inclòs dins el nivell de bioseguretat I. A aquest grup pertanyen organismes que presenten poca probabilitat de causar una malaltia als humans. Per als organismes dins al nivell de bioseguretat I no és necessari l'ús de cap tipus de protecció especial. Els residus generats en l'experiment (cultius, puntes de pipetes automàtiques, tubs de centrífuga, etc.) van ser gestionats per la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona.

Pel que fa els productes químics l'únic pel qual hem de prendre precaucions és l'alcohol etílic. És un líquid incolor i molt inflamable, per tant, cal mantenir-lo allunyat de qualsevol flama o espurna, punt de calor i de qualsevol altra font d'ignició. S'ha d'evitar el contacte amb els ulls, les mucoses i les zones sensibles o malaltes de la pell (Fig. 28).



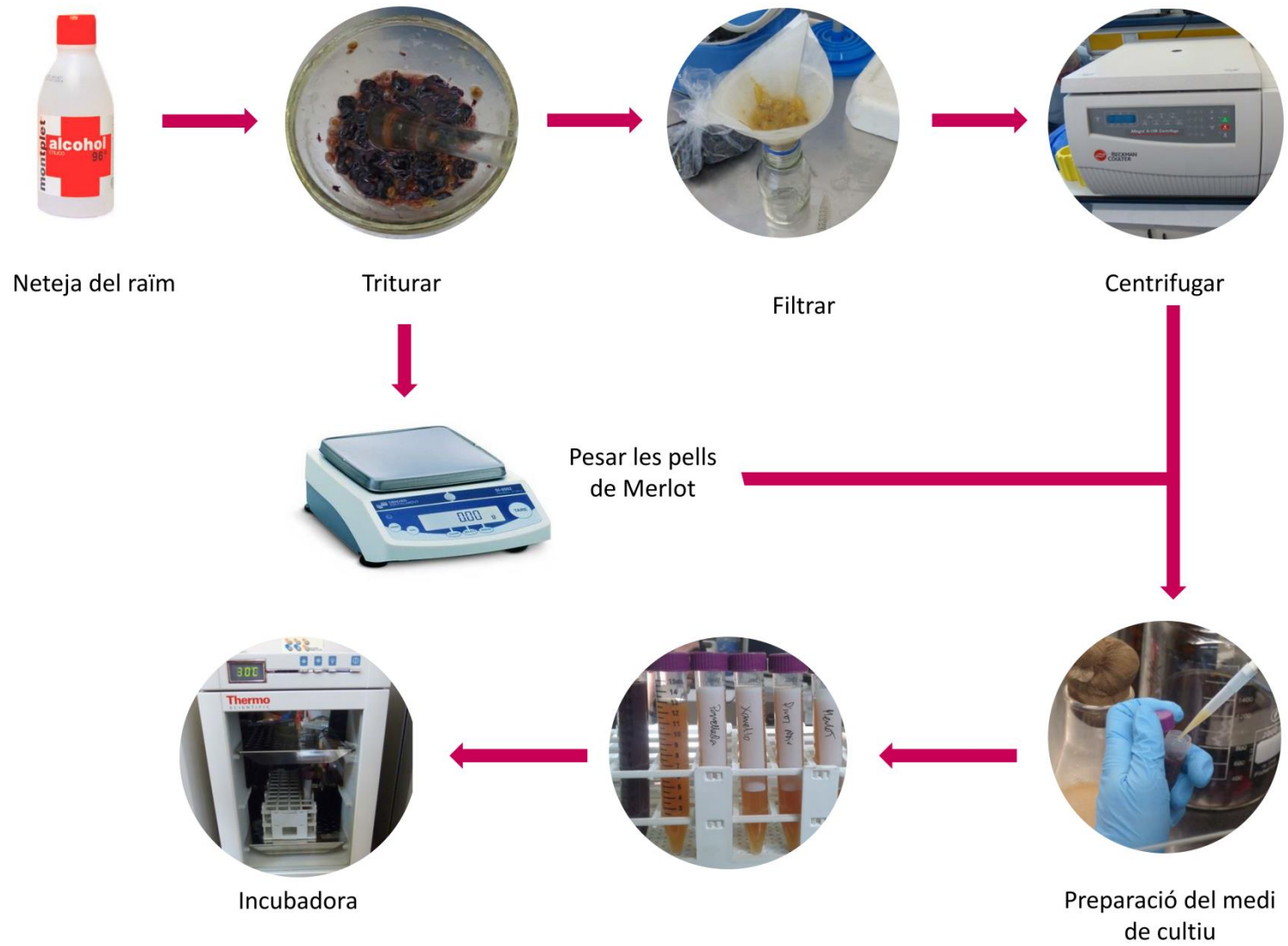
Fig. 28. Precaucions alcohol etílic.



### 4.3. Procediment

#### Experiments 1 i 2: Preparació dels cultius

1. Netejar les mostres de raïm amb etanol per tal d'eliminar totes les impureses i els llevats propis del raïm. D'aquesta manera s'evitarà que aquest factors influeixin en els resultats de l'experiment.
2. Triturar en un morter les mostres de cada varietat de raïm per separat. Dividint-ho en els següents grups:
  - Parellada (gotims sencers) → Varietat blanca.
  - Xarel·lo (gotims sencers) → Varietat blanca.
  - Pinot noir (gotims sencers / pells / polpa) → Varietat negra.
  - Merlot (gotims sencers / pells) → Varietat negra.
3. Filtrar les mostres obtingudes amb cotó fluix. Exceptuant les mostres de pells de raïm que posteriorment s'explicarà el procediment seguit amb aquestes.
4. Centrifugar el producte obtingut del filtratge a 3000 rpm durant 2 minuts per tal de separar les partícules més grans en suspensió.
5. Per separat, es va pesar una mostra d'1 g de pells triturades, que equival a la quantitat que se seleccionada de les altres mostres que s'utilitzarà per la preparació del cultiu.
6. Els cultius es van preparar seguint procediments diferents segons els diferents grups: (Nota: Aquest pas es va seguir sota una cabina de flux laminar i utilitzant guants de làtex per tal d'evitar la contaminació dels cultius).
  - Grup control → Preparació d'una mescla pipetejant 1 mL de la soca de llevat (*S. cerevisiae*) i 14 mL de cultiu YPD.
  - Grups amb mostres de gotims sencers de raïm → Preparació d'una mescla de 2 mL del producte obtingut de les mostres de raïm, 1 mL de llevat (*S. cerevisiae*) i 12 mL de medi de cultiu YPD.
  - Grup de pells de merlot → Preparació d'una mescla d'1 g de pells pesat anteriorment, 1 mL de llevat i 13 mL de medi de cultiu YPD.
7. Deixar-ho incubar a 30°C.





### Experiment 3: Preparació dels cultius

1. Es van fer 6 cultius amb concentracions diferents de resveratrol i de vitamina C. Com que no es va trobar resveratrol pur es va utilitzar un suplement alimentari en format de pastilles (Revidox) que, a part de resveratrol, inclouen extractes de magrana i de raïm. Preparació dels següents cultius:
  - Resveratrol ½ → Mitja càpsula de resveratrol (150 g).
  - Resveratrol 1 → Una càpsula de resveratrol (300 g).
  - Resveratrol 2 → Dues càpsules de resveratrol (600 g).
  - Vitamina C ½ → 150 g de vitamina C.
  - Vitamina C 1 → 300 g de vitamina C.
  - Vitamina C 2 → 600 g de vitamina C.
2. Preparació dels cultius a mesclant les quantitats determinades de resveratrol o vitamina C, esmentades anteriorment, amb 13 mL del medi de cultiu YPD.
3. Comprovar el pH de cada mescla. El pH òptim pel llevat és entre 5,5 i 7,5.
  - Totes les mostres de resveratrol es trobaven entre aquests dos valors de pH, per tant, es va afegir 2 mL de medi de cultiu YPD que quedava per omplir 14 mL del tub d'assaig.
  - Les mostres de vitamina C es trobaven entre valors de pH de 3 i 4. Per tal d'equilibrar el pH es va afegir X fins que els valors es van trobar entre 5,5 i 7,5. Per acabar es va omplir el que quedava per omplir 14 mL del tub d'assaig amb medi de cultiu YPD.
4. Per últim, es afegir a cada cultiu 1 mL de llevat. (Nota: Aquest pas es va seguir sota una cabina de flux laminar i utilitzant guants de làtex per tal d'evitar la contaminació dels cultius).
5. Deixar-ho incubar a 30°C.





Resveratrol  
(Revidox)



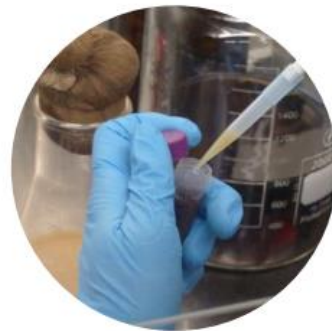
Vitamina C



Medi YPD



Incubadora



Addició llevat

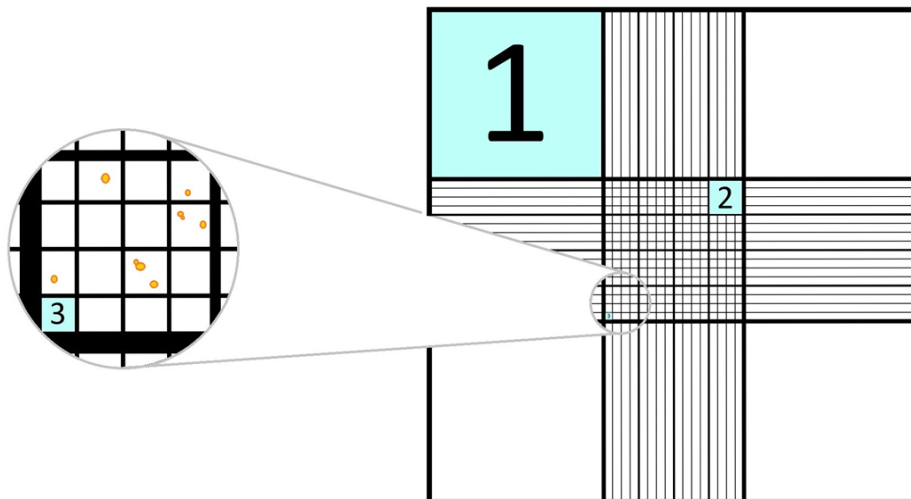


Comprovació pH



### Experiments 1, 2 i 3: Recompte de cèl·lules vives i mortes

1. Al cap de 48 hores, que és el punt en el qual la població de llevats haurà assolit el seu màxim, es comença a fer el recompte de cèl·lules mortes i vives.
2. Agitar la mostra amb l'ajuda d'un vòrtex.
3. Diluir cada mostra a  $10^{-1}$ . Barrejant 900  $\mu\text{l}$  d'aigua destil·lada amb 100  $\mu\text{l}$  de la mostra corresponent.
4. Afegir a la dissolució 200  $\mu\text{l}$  de blau de metilè i esperar deixant-ho reposar 5 minuts per tal que el blau del metilè actui.
5. Amb una pipeta automàtica carregar 15  $\mu\text{l}$  de la dissolució tenyida amb blau de metilè a la cambra de Thoma (Fig. 29).

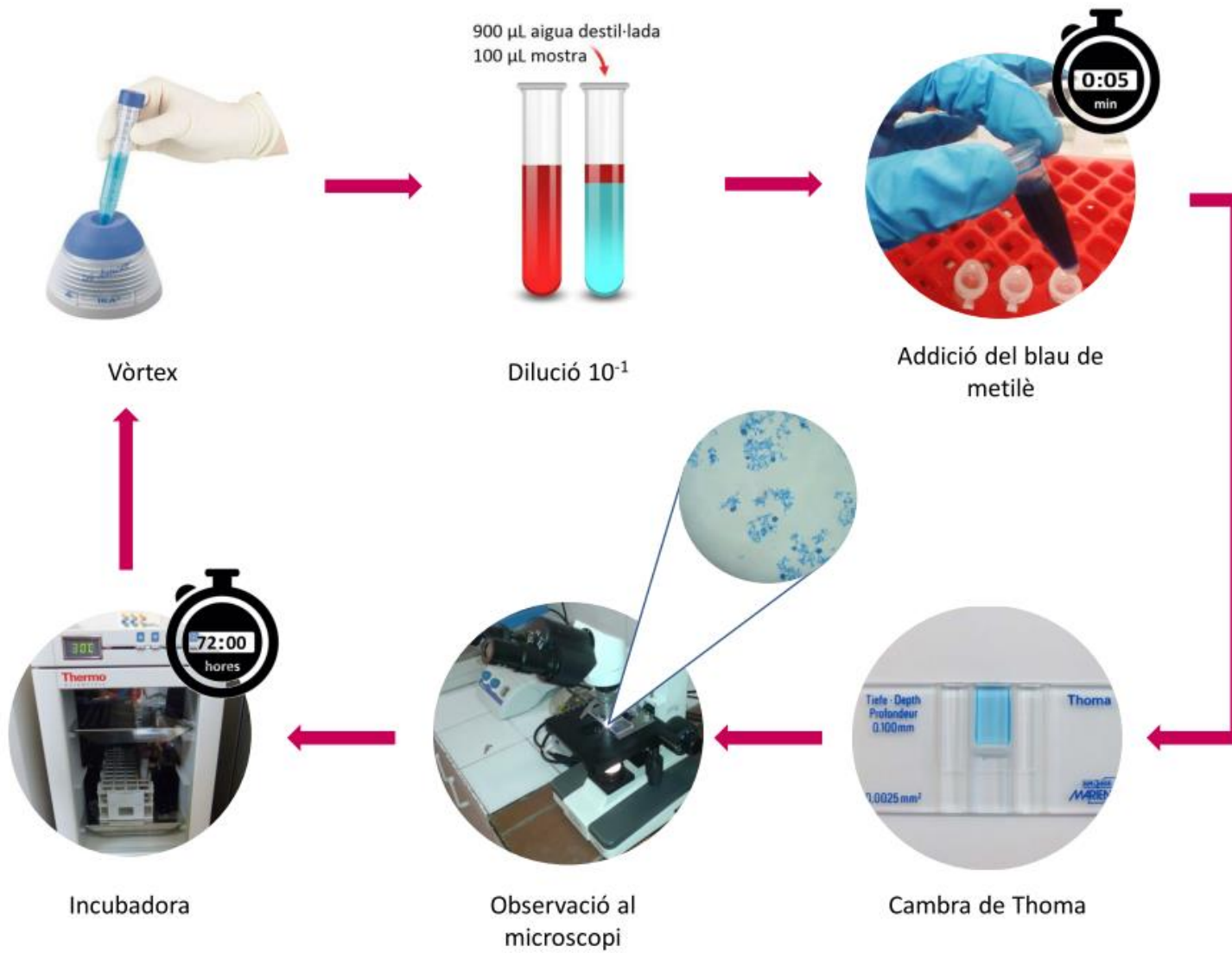


**Fig. 29.** Cambra de Thoma

6. Observar la mostra sota un microscopi òptic de 400 augments.
7. En acabar cada recompte retornar els cultius a la incubadora a 30°C fins al següent recompte.
8. Seguir en mateix procediment a les hores: 72, 144, 192 i 240, en el cas de l'experiment 1; 72, 120, 144, 192 i 240, en el cas de l'experiment 2; i 72, 120, 192 i 312, en el cas de l'experiment 3; per tal d'observar l'evolució de la supervivència dels llevats.

Nota: Aquest procediment es va seguir sota una cabina de flux laminar i utilitzant guants de làtex per tal d'evitar la contaminació dels cultius.





## 5. Resultats i discussió

### Experiments 1, 2 i 3

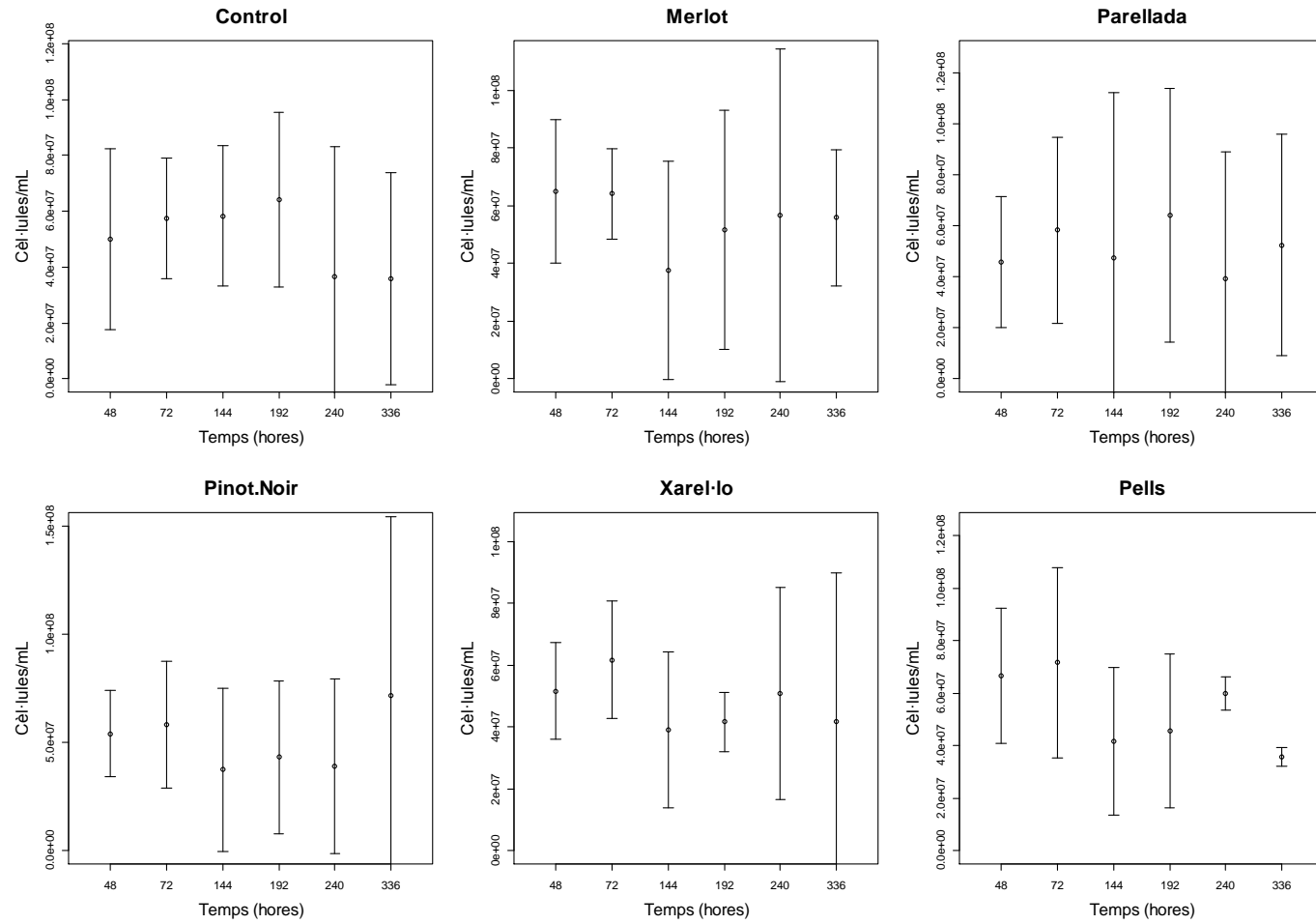
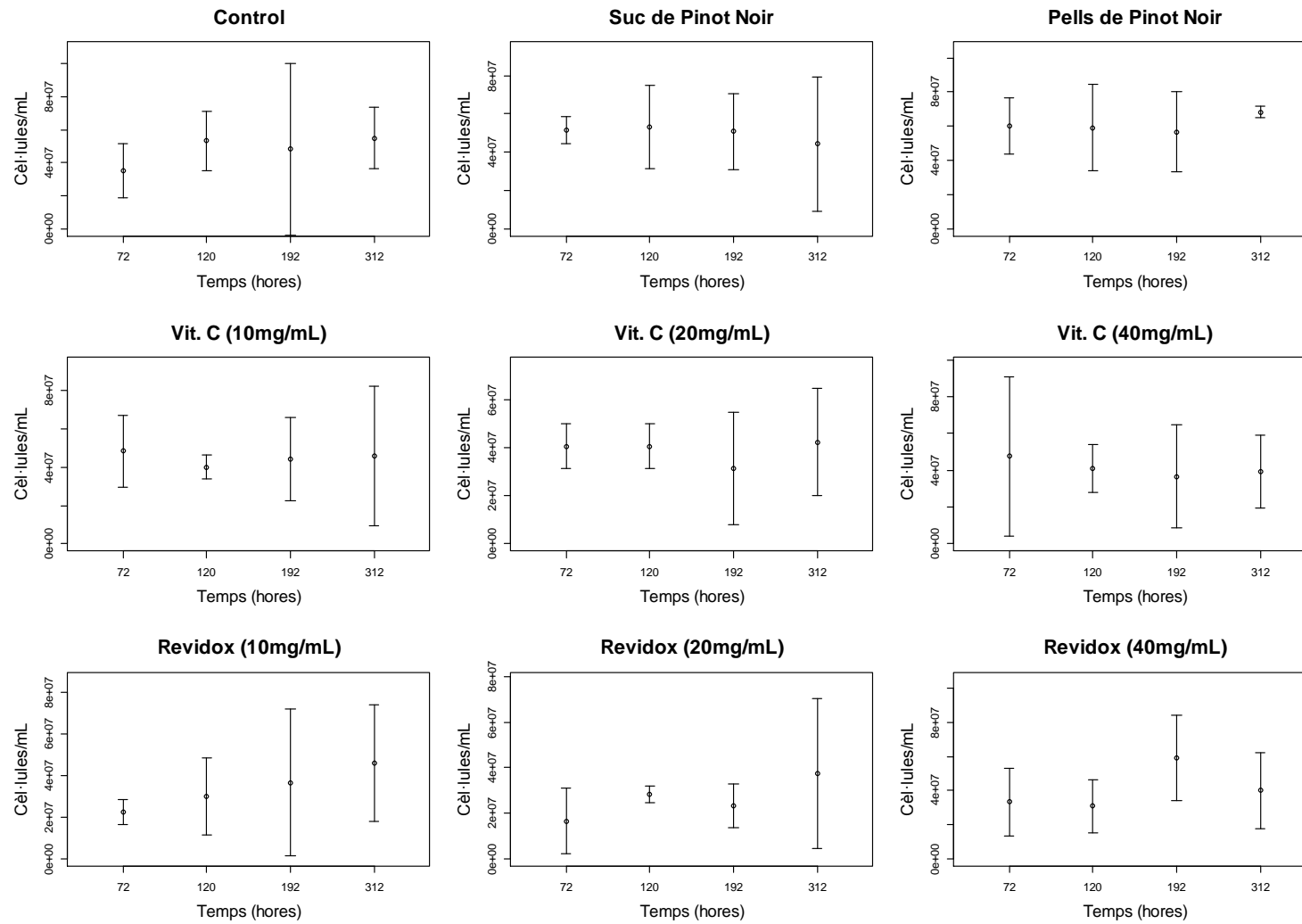


Fig. 31. Avaluació de l'estabilitat cel·lular al llarg del període experimental



**Fig. 32.** Avaluació de l'estabilitat cel·lular al llarg del període experimental



Aquestes gràfiques (Fig. 31 i 32) ens permeten saber si la mitjana de la quantitat de cèl·lules totals (vives i mortes) considerades en tots els controls ha estat aproximadament la mateixa al llarg del procés experimental. En el punt central es representa la mitjana, mentre que la línia vertical representa l'interval de confiança per al valor d'aquesta mitjana.

Cada interval de confiança ens permet saber amb una seguretat del 95% que el valor corresponent a la quantitat de cèl·lules del cultiu està comprès entre els dos punts que marquen l'interval.

L'amplada del interval de confiança depèn del nombre de mesures realitzades (a més mesures major serà la confiança i per tant més petit l'interval) i de la variabilitat de les mesures o desviació estadística (a major variabilitat major serà l'interval).

D'aquesta manera, quan els intervals de diferents mitjanes es solapen el que ens indica és que no hi ha diferències estadísticament significatives entre les diferents mitjanes calculades en cada control.

Per últim, si comparem els diversos intervals que apareixen en cada gràfica observem que majoritàriament se solapen tots exceptuant dos valors de recomptes cel·lulars en les pells (240 i 336 hores) que difereixen entre sí, però no amb la resta de valors, no s'aprecia cap diferència estadísticament significativa entre la resta dels valors dins d'un mateix grup (control, merlot, etc.).

Aquest fet indica que no hi ha una davallada o augment significatiu en el nombre total de cèl·lules presents, és a dir, les cèl·lules mortes no s'han trencat, ni tampoc s'ha produït un recreixement de cèl·lules noves. Per consegüent, la mesura de la mortalitat basada en el recompte diferencial entre cèl·lules vives i mortes és fiable.

## Experiment 1

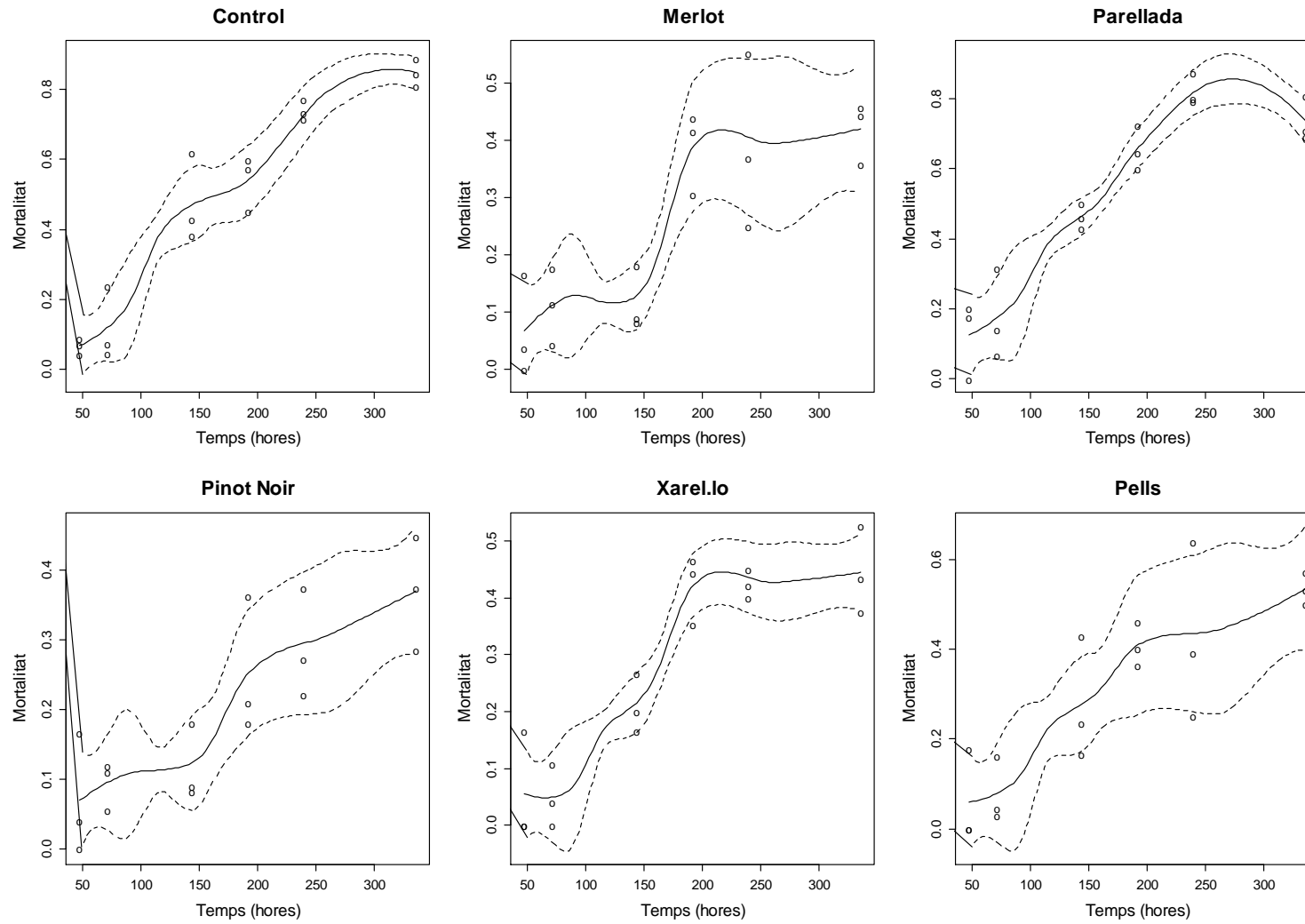
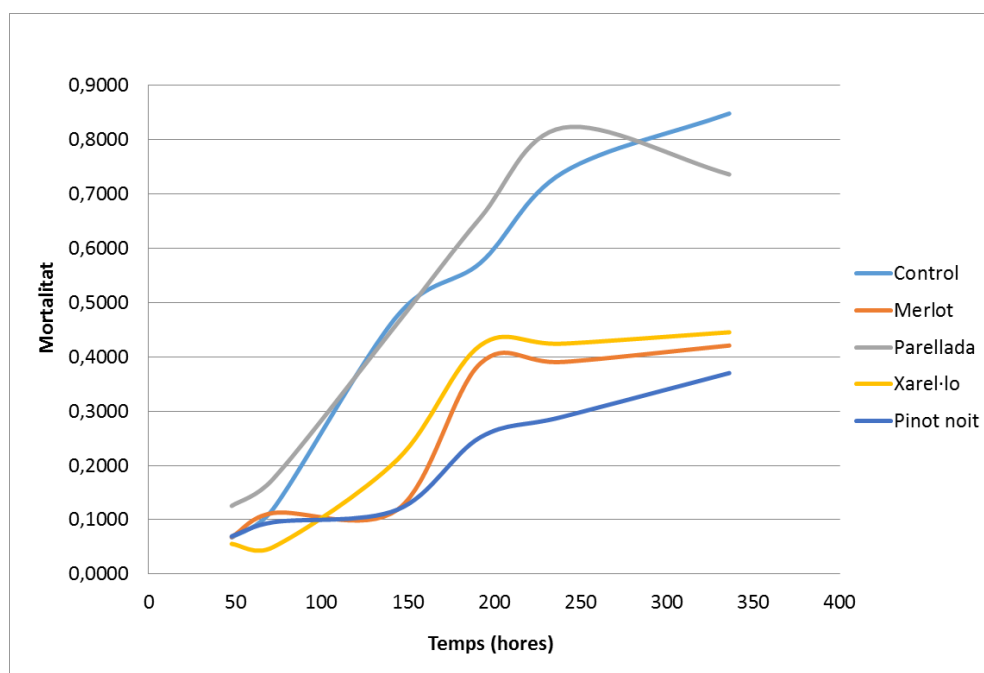


Fig. 33. Regressió local i interval de confiança al 95%



**Fig. 34.** Comparació regressions locals.

Els gràfics anteriors (fig. 33 i 34) ens mostren la quantitat de cèl·lules de llevat mortes respecte el temps (hores). Per establir el tipus de cinètica de la decaiguda de la viabilitat al llarg del temps s'ha optat per utilitzar una regressió local. Tal i com s'aprecia, les varietats merlot, pinot noir, i xarel·lo mostren una cinètica de tipus sigmoïdal (bastant apreciable en els varietats de merlot i xarel·lo), mentre que la resta tenen un tipus de cinètica de caire lineal.

En un primer moment es pot destacar la semblança de la dinàmica que segueixen les gràfiques dels grup control i dels medis que incorporen la varietat de raïm parellada. Si ho analitzem podem explicar aquest fet ja que la varietat parellada és la que, segons les dades proporcionades per la Dra. (Fig. 23) és la varietat que menor quantitat de resveratrol conté, així com de polifenols, ja que és una varietat blanca; i, per tant, d'antioxidants que augmentarien la supervivència dels llevats en el medi. Podem concloure, doncs que el medi del grup control i el que s'hi ha afegit la varietat de raïm parellada, són molt semblants i, per aquesta raó, la dinàmica de mortalitat que segueix la població de llevats és també molt semblant.

En les gràfiques de les poblacions de llevats esmentades anteriorment la població decreix amb una velocitat moderada fins que arriba al 80% de població morta, punt en el qual s'estabilitza. Observem també que a partir de les 300 hores després de la inoculació del



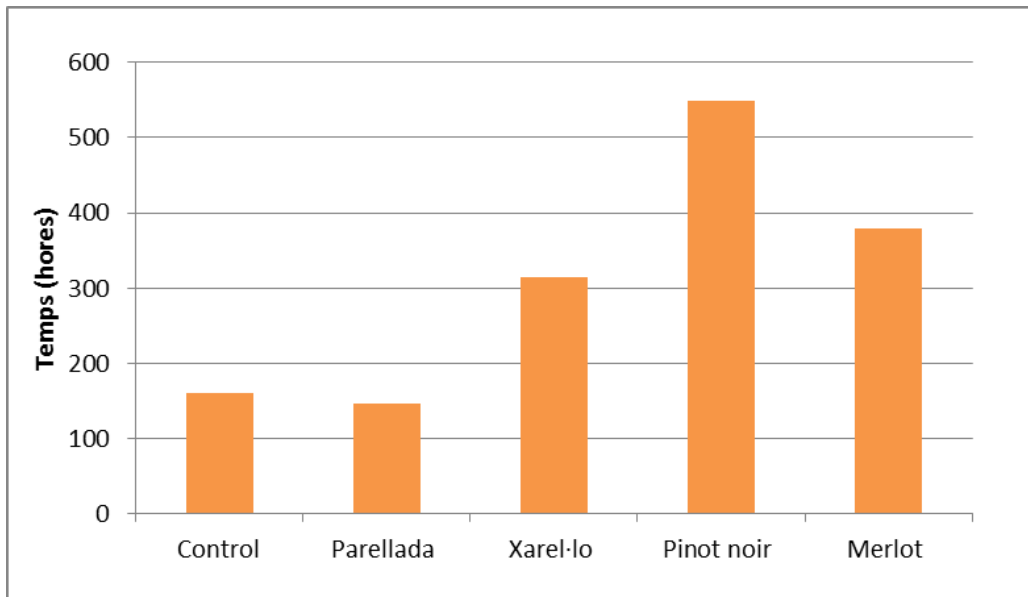
llevat la població comença a créixer de nou, sobretot en el medi on també hi ha parellada. El fenomen anterior es pot explicar pel fet que algunes cèl·lules quan moren, es trenquen i alliberen al medi els nutrients continguts en el seu organisme, per tant, les cèl·lules que queden vives poden aprofitar aquestes substàncies per a créixer i reproduir-se.

Observem que les poblacions de llevat en els medis també segueixen una dinàmica semblat. La població disminueix ràpidament durant les primeres 200 hores després de la inoculació del llevat fins que assoleix uns valors de mortalitat aproximadament compresos entre el 25% i el 45% de mortalitat depenent de la població de llevat (25% la població del medi que incorpora pinot noir; 45% la població del medi que incorpora merlot; i 45% la població del medi que incorpora xarel·lo). En aquest punt les varietats segueixen una dinàmica diferent; les poblacions que en el seu medi incorporen xarel·lo i merlot, s'estabilitzen totalment; en canvi, les que incorporen pinot noir continuen disminuint poc a poc fins a un valor en el qual s'estabilitzaran, aproximadament un 50% per a les pells de merlot i un 40% per al pinot noir.

Tot i així la població de llevat que presenta menys mortalitat és la que es troba en un medi amb pinot noir, que correspon a la varietat que conté més resveratol segons les dades proporcionades per la Dra. Lamuela.

En segon lloc hi ha les poblacions que viuen en un medi que incorpora merlot o les seves pells. Aquestes dades també s'ajusten amb les dades de les varietats que contenen més Resveratrol i, a part que contenen més polifenols pel fet de ser una varietat negra.

Per últim a aquestes poblacions les segueix la població que en el seu medi s'hi ha afegit xarel·lo. Com en els casos anteriors aquestes dades també es poden relacionar amb les que ens va proporcionar la Dra. Lamuela; doncs el xarel·lo, tot i ser la varietat blanca que té més resveratol, és, de les varietats escollides per fer l'experiment, la que conté menys resveratol. A part, pel fet de ser una veritat blanca conté pocs polifenols i, per tant, antioxidants.



**Fig. 35.** Temps que el cultiu tardaria a assolir un 50% de mortalitat.

El gràfic anterior (Fig. 35) ens mostra el temps (hores) que tardaria el cultiu a assolir el 50% de mortalitat. De nou observem que la varietat de raïm que més tardaria a assolir aquest 50% i, per tant la que més afavoreix la supervivència del llevat en el medi, és el pinot noit, seguida del merlot, el xarel·lo i, per últim, el parellada.



## Experiment 2

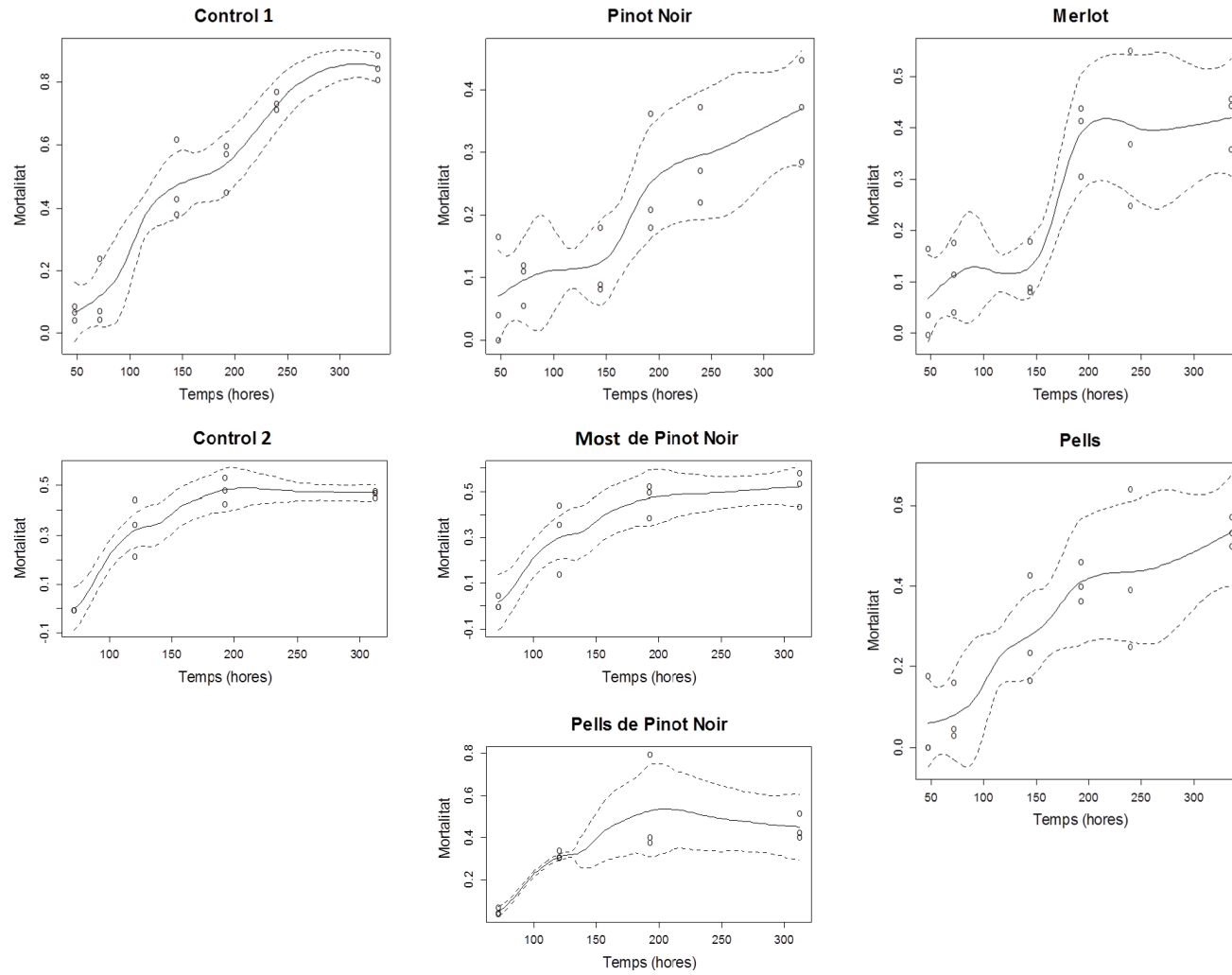
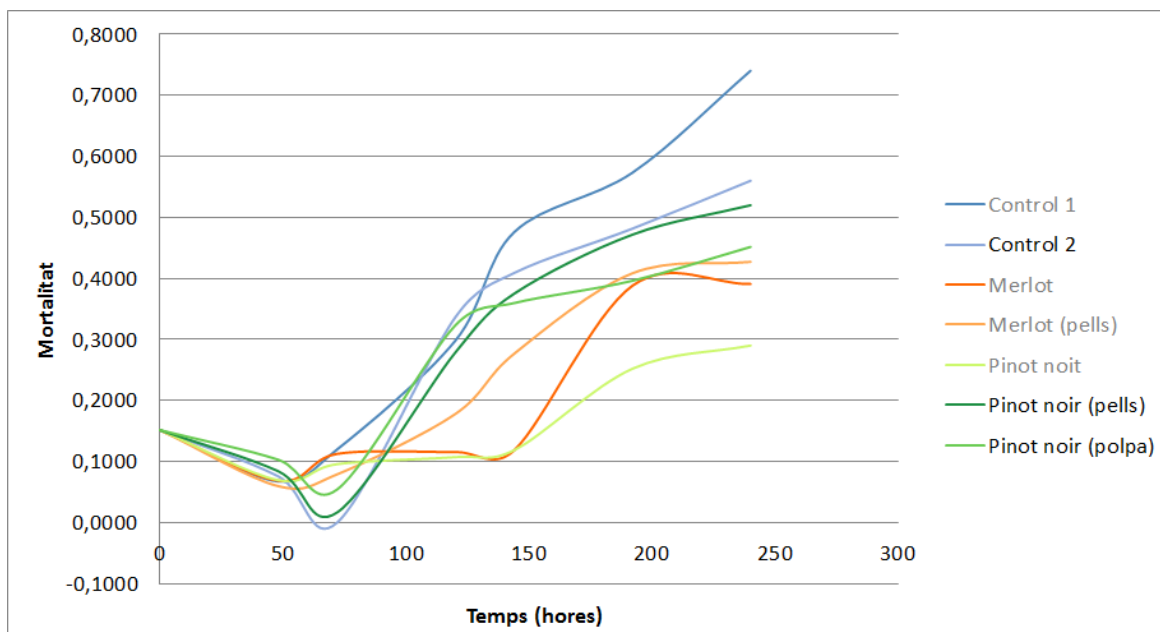


Fig. 36. Regressió local i interval de confiança al 95%



**Fig. 37.** Comparació regressions locals. En colors ataronjats es mostren els cultius amb merlot i amb colors verds les que tenien pinot noir. En la llegenda els noms dels diferents cultius en gris són aquells que es van realitzar els controls durant el període de temps que es va dur a terme l'experiment 1; les que estan en negre són aquells que es van dur a terme els controls juntament amb l'experiment 3.

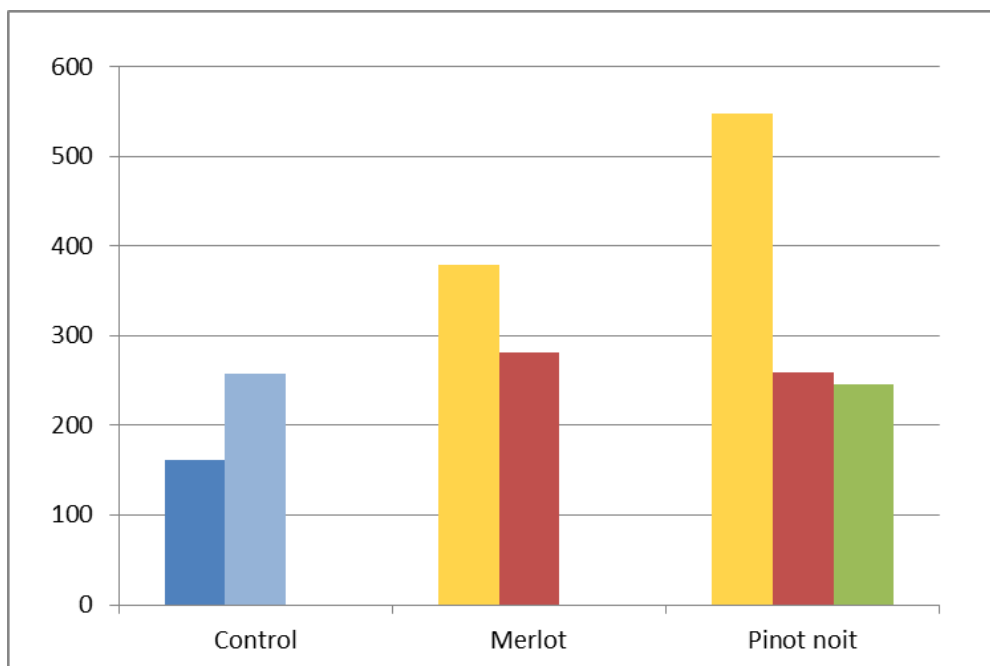
Els gràfics anteriors (fig. 36 i 37 ens mostren la quantitat de cèl·lules de llevat mortes respecte el temps (hores). Per establir el tipus de cinètica de l'augment de la mortalitat al llarg del temps s'ha optat per utilitzar una regressió local. Tal i com es pot observar, les varietats merlot (gotims sencers) i pinot noir (gotims sencers) segueixen una cinètica de tipus sigmoïdal, mentre que en les altres és més lineal.

Es pot dir que no s'aprecien gaires diferències significatives entre la dinàmica que segeueixen els diferents cultius. Observem que el cultiu que en el seu medi hi havia pinot noir (gotims sencers) és en el que hi ha més supervivència de les cèl·lules del llevat. Altrament, els medis en els quals la mortalitat és més alta és en els dos controls. Aquest fet ens indica que haver-hi o no en el medi raïm (ja sigui gotims sencers, pells o polpa) influeix en la supervivència de cèl·lules en el medi; la presència de raïm en el medi afavoreix positivament la supervivència dels llevats en el medi.

Per altra banda, la mortalitat de les cèl·lules no és més baixa en els medis que contenen les pells de raïm, que és on hi ha el major contingut de polifenols i resveratrol, en contrast amb les que només contenen la polpa, tal i com s'havia plantejat inicialment. Aquest fet pot ser degut a dos factors. En primer lloc pot ser causat pel fet que les dades van ser recollides en



períodes de temps diferents (juntament amb l'experiment 1 o juntament amb l'experiment 3). Aquest fet comporta que, tot i que es volguessin imitar les condicions del primer període de recollida de dades durant el segon període, hi ha moltes variables que hi influeixen i que van ser impossibles de controlar a causa del l'equipament i els mitjans que es disposaven per dur a terme l'experiment. En segon lloc es troba la dificultat del comptatge de cèl·lules a causa dels residus sòlids en les mostres, on es quedaven embolicades i amagades les cèl·lules dels llevats.



**Fig. 38.** Temps que el cultiu tardaria a assolir un 50% de mortalitat. Controls (blaus) Gotims sencers (groc), vermell (pells), verd (most).

El gràfic anterior (Fig. 38) ha estat elaborat a partir del càlcul del temps que tardaria el cultiu a assolir un 50% de mortalitat. Pel que fa aquest gràfic ens trobem amb la matieixa problemàtica que en els gràfics corresponents a les figures 34 i 35, ja explicada anteriorment.

En conclusió, no podem donar aquests resultats com a vàlids ja que hi va haver diversos factors que van poder influenciar en el procés experimental. Per tant, caldria tornar a fer l'experiment utilitzant mètodes diferents per tal de poder treure conclusions vàlides.

### Experiment 3

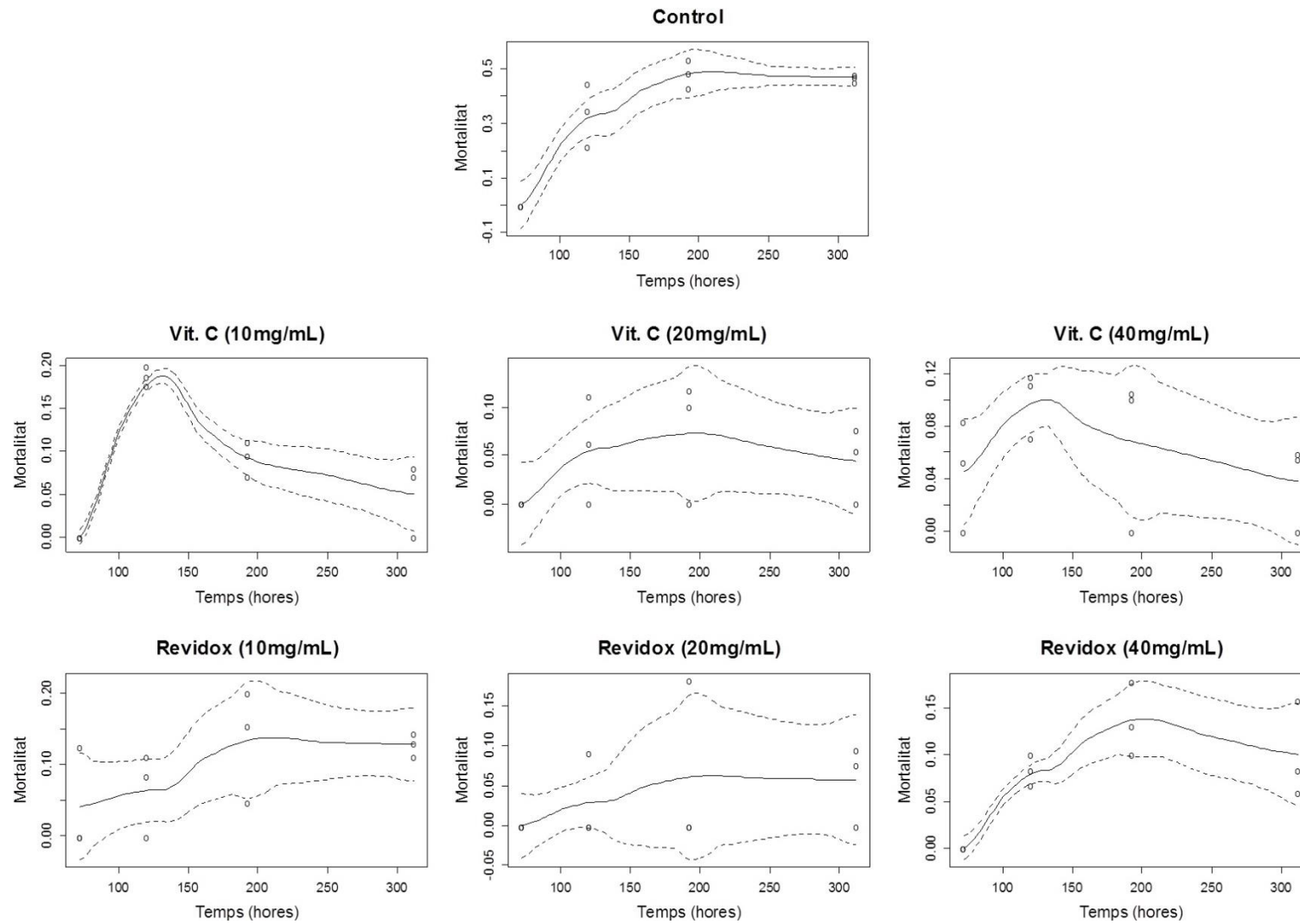
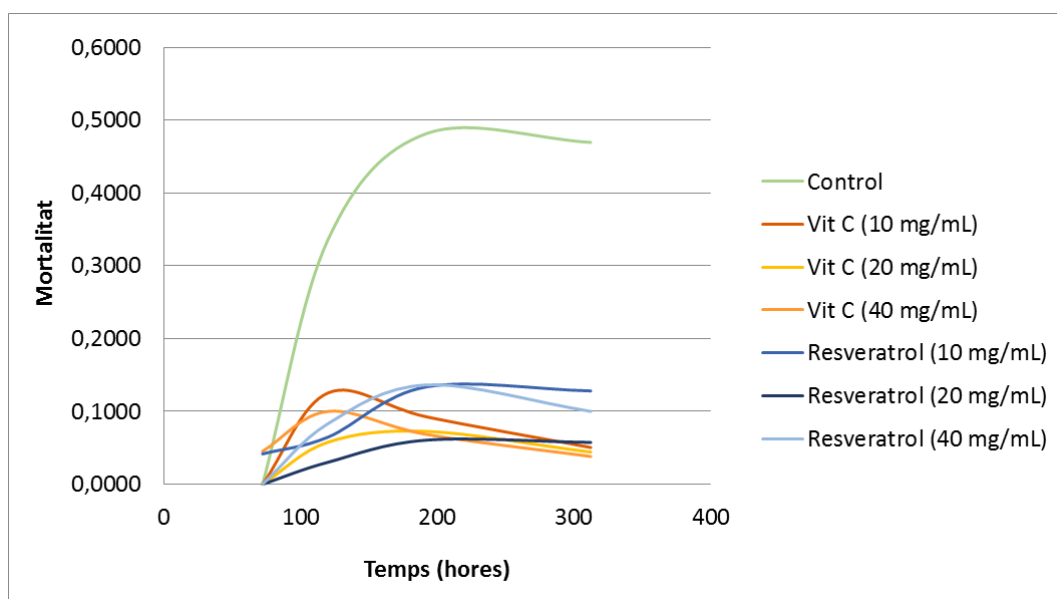


Fig. 39. Regressió local i interval de confiança al 95%



**Fig. 40.** Comparació regressions locals.

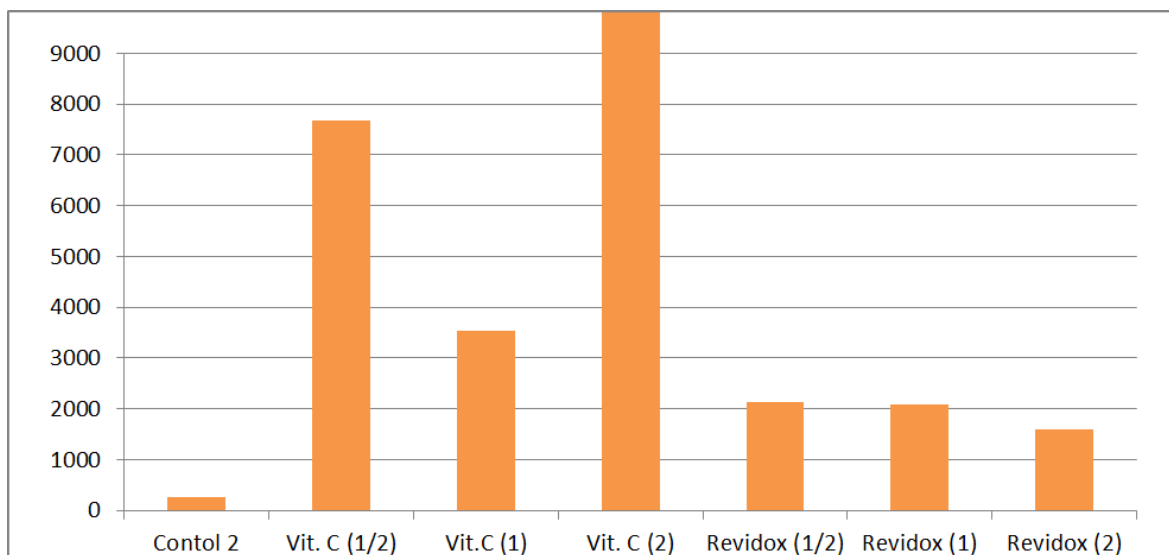
Els gràfics anteriors (Fig. 39 i 40) ens mostren la quantitat de cèl·lules de llevat mortes respecte el temps (hores). Per establir el tipus de cinètica de la decaiguda de la viabilitat al llarg del temps s'ha optat per utilitzar una regressió local.

Observem que en el grup control primer la mortalitat augmenta ràpidament en les primeres 200 hores, aproximadament, després de la inoculació del llevat en el medi. A partir del moment en que el cultiu arriba al 50% de mortalitat, la quantitat de cèl·lules mortes i vives es comença a estabilitzar, disminuint la mortalitat poc a poc.

Entre els cultius en els quals s'hi va afegir vitamina C o resveratrol, no es pot descriure una tendència concreta ja que els valors de mortalitat es mouen entre valors molt petits, fet que indica una certa estabilitat de la mortalitat des de l'inici.

Podem destacar en el punt A de la gràfica de la menor concentració de vitamina C, on la mortalitat augmenta de cop al cap de, aproximadament, 100 hores després de la inoculació del llevat fins a un 20% de mortalitat. Podem explicar aquest fet com un error en la mesura al laboratori, per tant, el podem discriminar ja que la tendència de la gràfica en els següents punts és de mantenir-se més o menys estable.

Hi ha una tendència en que com més concentració de resveratrol o de vitamina C, menys mortalitat de les cèl·lules. Tot i així, com que es mou entre uns valors molt petits és gairebé inapreciable i no es pot afirmar ja que depèn molt de com hem comptat les cèl·lules, per tant, no és significatiu.



**Fig. 41.** Temps que el cultiu tardaria a assolir un 50% de mortalitat. En el cas del grup de la vitamina C (2) el valor és incalculable.

Els gràfic anterior (Fig. 41) ha estat elaborat a partir del càlcul del temps que tardaria el cultiu a assolir el 50% de mortalitat, utilitzant les dades recollides en l'experiment. Com que la variació de la mortalitat al llarg de l'experiment ha estat mínima, en aquest cas, es fa difícil establir un valor exacte ja que pot variar molt segons les condicions del medi, és a dir, no es disposa de les dades suficients per calcular un valor significatiu. Per aquest motiu no podem afirmar que aquest gràfic sigui molt significatiu.

# CONCLUSIONS

---

Propietats terapèutiques del raïm  
El resveratrol





L'objectiu principal plantejat en el principi del treball era estudiar la influència del resveratrol en l'envelliment cel·lular, així com altres objectius secundaris especificats en la part experimental.

A partir de l'anàlisi dels resultats obtinguts a la part experimental s'han pogut extreure diverses conclusions, amb les quals es validen algunes de les hipòtesis plantejades:

1. En primer lloc, podem dir que el resveratrol ha augmentat significativament la viabilitat de les cèl·lules del llevat en el medi, ja que la mortalitat en aquests cultius ha estat més baixa. Tanmateix, tal i com es va proposar en una principi, no es pot dir que augmenti la longevitat del llevat ja que no ha seguit tot el seu cicle cel·lular i, per tant, no ho podem valorar, no sabem si la cèl·lula ha sofert algun dany que impedeixi la seva reproducció o la realització del seu cicle cel·lular. Aquest fet seria més difícil valorar-lo ja que el cicle cel·lular dels llevats es complicat; poden entrar en una fase estacionària, es a dir, de vida latent, no continuar seguint el seu cicle considerat "normal".
2. Per altra banda, també s'ha comprovat que la supervivència de les cèl·lules del llevat ha variat segon la varietat de raïm afegida als diversos cultius. El cultiu que ha presentat més supervivència és en el que s'hi havia afegit pinot noir, seguida del merlot, el xarel·lo i, per últim el parellada. Aquest fet confirma la hipòtesi plantejada ja que a més resveratrol i polifenols, més supervivència dels llevats.
3. Tot i així, no s'ha pogut observar massa diferència entre els medis on s'hi va afegir només pells (on teòricament hi ha la major concentració de resveratrol i de polifenols) o només polpa.
4. També s'ha observat que la dinàmica de mortalitat en els medis amb resveratrol o vitamina C és bastant semblant.
5. Quan a la variació segons la concentració, no s'han apreciat diferències significatives entre la dinàmica de la mortalitat en diferents concentracions de resveratrol o de vitamina C.

D'aquest experiment es poden proposar diverses aplicacions a curt i a llarg termini.

A curt termini es podria aprofitar el resveratrol com a substància que ajudi a que la mortalitat no sigui tan elevada quan un cultiu ha de ser transportat per analitzar-lo en un laboratori o centre de recerca diferent.





Per acabar, caldria fer diversos estudis complets repetint l'experiment d'aquest treball però fent més rèpliques de cada cultiu, després amb teixits animals, seguidament amb petits vertebrats, etc.; seguint tot el procés que ha de seguir qualsevol fàrmac abans de poder-se comercialitzar, per tal de comprovar la seva efectivitat i els efectes secundaris que pot produir aquesta molècula. Per altra banda, caldria observar quins efectes té el resveratrol quan l'organisme en el qual el testem segueix tot el seu cicle cel·lular.

Finalment, valoro la realització d'aquest treball molt positivament, en tots els àmbits. Elaborar el treball de recerca ha estat molt enriquidor; m'ha fet créixer tant com a persona, com per tots els coneixements que he adquirit.

Una part molt important és que he tingut l'oportunitat de treballar en un laboratori força ben equipat, vivint la realitat del dia a dia en un laboratori i sota la supervisió d'investigadors que m'han transmès els seus coneixements en el tema i m'han ajudat en el disseny i la realització dels experiments.

Introduir-me en el mètode científic m'ha donat una visió àmplia del món de la investigació i la recerca proporcionant-me vivències que ben segur em seran d'utilitat en un futur.

# ANNEX

---

Propietats terapèutiques del raïm  
El resveratrol



## 1. Annex 1: Taules d'estadística del comptatge de llevats

- Grup 1: 0, 48, 72, 144, 192, 240 i 366 hores
- Grup 2: 0, 72, 120, 192 i 312 hores

Recompte	Inòcul		
	Total	Vives	Mortes
	30	28	2
	26	22	4
	30	23	7

Estadístic	Total	Vives	Mortes
Mitjana	28,67	24,33	4,33
Desviació estàndard	2,31	3,21	2,52
Nombre	3,00	3,00	3,00
95% IC	5,74	7,99	6,25
Límit inferior	22,93	16,35	-1,92
Límit superior	34,40	32,32	10,58

Dilució 1: 100 100 100

### Resultats

% Vives 84,87%  
% Mortes 15,13%

Cèl·lules/mL	Inòcul			Control			Merlot			Parellada			Pinot Noir			Xarel·lo		
	Límit inferior	Mitjana	Límit superior	Límit inferior	Mitjana	Límit superior	Límit inferior	Mitjana	Límit superior	Límit inferior	Mitjana	Límit superior	Límit inferior	Mitjana	Límit superior	Límit inferior	Mitjana	Límit superior
Llevats totals	5,73E+08	7,17E+08	8,60E+08	3,82E+07	4,78E+07	5,73E+07	3,82E+07	4,78E+07	5,73E+07	3,82E+07	4,78E+07	5,73E+07	3,82E+07	4,78E+07	5,73E+07	3,82E+07	4,78E+07	5,73E+07
Llevats vius	4,09E+08	6,08E+08	8,08E+08	2,72E+07	4,06E+07	5,39E+07	2,72E+07	4,06E+07	5,39E+07	2,72E+07	4,06E+07	5,39E+07	2,72E+07	4,06E+07	5,39E+07	2,72E+07	4,06E+07	5,39E+07
Llevats morts	-4,80E+07	1,08E+08	2,65E+08	-3,20E+06	7,22E+06	1,76E+07	-3,20E+06	7,22E+06	1,76E+07	-3,20E+06	7,22E+06	1,76E+07	-3,20E+06	7,22E+06	1,76E+07	-3,20E+06	7,22E+06	1,76E+07

Recompte	Control			Merlot			Parellada			Pinot Noir			Xarel-lo			Pells		
	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes
	23	22	1	26	25	1	17	15	3	24	23	1	23	23	0	30	30	0
	23	21	2	22	22	0	15	13	3	18	15	3	18	15	3	22	22	0
	14	13	1	30	25	5	23	23	0	23	23	0	21	21	0	28	23	5

Estadístic	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes
Mitjana	20,00	18,67	1,33	26,00	24,00	2,00	18,33	17,00	2,00	21,67	20,33	1,33	20,67	19,67	1,00	26,67	25,00	1,67
Desviació estàndard	5,20	4,93	0,58	4,00	1,73	2,65	4,16	5,29	1,73	3,21	4,62	1,53	2,52	4,16	1,73	4,16	4,36	2,89
Nombre	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
95% IC	12,91	12,25	1,43	9,94	4,30	6,57	10,34	13,14	4,30	7,99	11,47	3,79	6,25	10,34	4,30	10,34	10,83	7,17
Límit inferior	7,09	6,41	-0,10	16,06	19,70	-4,57	7,99	3,86	-2,30	13,68	8,86	-2,46	14,42	9,32	-3,30	16,32	14,17	-5,50
Límit superior	32,91	30,92	2,77	35,94	28,30	8,57	28,68	30,14	6,30	29,65	31,81	5,13	26,92	30,01	5,30	37,01	35,83	8,84

Dilució 1:	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
------------	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----

## Resultats

% Vives	93,27%		93,16%		91,63%		93,06%		94,44%		94,05%
% Mortes	6,73%		6,84%		12,55%		6,94%		5,56%		5,95%

Cèl·lules/mL	Control			Merlot			Parellada			Pinot Noir			Xarel-lo			Pells		
	Límit inferior	Mitjana	Límit superior	Límit inferior	Mitjana	Límit superior	Límit inferior	Mitjana	Límit superior	Límit inferior	Mitjana	Límit superior	Límit inferior	Mitjana	Límit superior	Límit inferior	Mitjana	Límit superior
Llevats totals	1,77E+07	5,00E+07	8,23E+07	4,02E+07	6,50E+07	8,98E+07	2,00E+07	4,58E+07	7,17E+07	3,42E+07	5,42E+07	7,41E+07	3,60E+07	5,17E+07	6,73E+07	4,08E+07	6,67E+07	9,25E+07
Llevats vius	1,60E+07	4,67E+07	7,73E+07	4,92E+07	6,00E+07	7,08E+07	9,64E+06	4,25E+07	7,54E+07	2,21E+07	5,08E+07	7,95E+07	2,33E+07	4,92E+07	7,50E+07	3,54E+07	6,25E+07	8,96E+07
Llevats morts	-2,52E+05	3,33E+06	6,92E+06	-1,14E+07	5,00E+06	2,14E+07	-5,76E+06	5,00E+06	1,58E+07	-6,15E+06	3,33E+06	1,28E+07	-8,26E+06	2,50E+06	1,33E+07	-1,38E+07	4,17E+06	2,21E+07

Recompte	Control			Merlot			Parellada			Pinot Noir			Xarel-lo			Pells		
	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes
	21	20	1	26	23	3	30	28	2	27	24	3	22	22	0	33	32	1
	21	16	5	23	22	1	19	13	6	18	17	1	28	25	3	22	21	1
	27	25	2	28	23	5	21	18	3	25	22	3	24	23	1	31	26	5

Estadístic	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes
Mitjana	23,00	20,33	2,67	25,67	22,67	3,00	23,33	19,67	3,67	23,33	21,00	2,33	24,67	23,33	1,33	28,67	26,33	2,33
Desviació estàndard	3,46	4,51	2,08	2,52	0,58	2,00	5,86	7,64	2,08	4,73	3,61	1,15	3,06	1,53	1,53	5,86	5,51	2,31
Nombre	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
95% IC	8,61	11,20	5,17	6,25	1,43	4,97	14,56	18,97	5,17	11,74	8,96	2,87	7,59	3,79	3,79	14,56	13,68	5,74
Límit inferior	14,39	9,13	-2,50	19,42	21,23	-1,97	8,78	0,69	-1,50	11,59	12,04	-0,54	17,08	19,54	-2,46	14,11	12,65	-3,40
Límit superior	31,61	31,53	7,84	31,92	24,10	7,97	37,89	38,64	8,84	35,07	29,96	5,20	32,26	27,13	5,13	43,22	40,01	8,07

Dilució 1:	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
------------	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----

## Resultats

% Vives	88,01%		88,75%		82,49%		90,44%		95,04%		92,10%
% Mortes	11,99%		11,25%		17,51%		9,56%		4,96%		7,90%

Cèl·lules/mL	Control			Merlot			Parellada			Pinot Noir			Xarel-lo			Pells		
	Límit inferior	Mitjana	Límit superior	Límit inferior	Mitjana	Límit superior	Límit inferior	Mitjana	Límit superior	Límit inferior	Mitjana	Límit superior	Límit inferior	Mitjana	Límit superior	Límit inferior	Mitjana	Límit superior
Llevats totals	3,60E+07	5,75E+07	7,90E+07	4,85E+07	6,42E+07	7,98E+07	2,19E+07	5,83E+07	9,47E+07	2,90E+07	5,83E+07	8,77E+07	4,27E+07	6,17E+07	8,06E+07	3,53E+07	7,17E+07	1,08E+08
Llevats vius	2,28E+07	5,08E+07	7,88E+07	5,31E+07	5,67E+07	6,03E+07	1,73E+06	4,92E+07	9,66E+07	3,01E+07	5,25E+07	7,49E+07	4,88E+07	5,83E+07	6,78E+07	3,16E+07	6,58E+07	1,00E+08
Llevats morts	-6,26E+06	6,67E+06	1,96E+07	-4,92E+06	7,50E+06	1,99E+07	-3,76E+06	9,17E+06	2,21E+07	-1,34E+06	5,83E+06	1,30E+07	-6,15E+06	3,33E+06	1,28E+07	-8,51E+06	5,83E+06	2,02E+07

Recompte	Control			Merlot			Parellada			Pinot Noir			Xarel-lo			Pells		
	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes
	21	13	8	11	10	1	24	13	11	11	10	1	12	10	2	21	12	9
	21	8	13	12	11	1	26	13	13	12	11	1	20	16	4	12	10	2
	28	16	12	22	18	4	7	4	3	22	18	4	15	11	4	17	13	4

Estadístic	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes
Mitjana	23,33	12,33	11,00	15,00	13,00	2,00	19,00	10,00	9,00	15,00	13,00	2,00	15,67	12,33	3,33	16,67	11,67	5,00
Desviació estàndard	4,04	4,04	2,65	6,08	4,36	1,73	10,44	5,20	5,29	6,08	4,36	1,73	4,04	3,21	1,15	4,51	1,53	3,61
Nombre	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
95% IC	10,04	10,04	6,57	15,11	10,83	4,30	25,94	12,91	13,14	15,11	10,83	4,30	10,04	7,99	2,87	11,20	3,79	8,96
Límit inferior	13,29	2,29	4,43	-0,11	2,17	-2,30	-6,94	-2,91	-4,14	-0,11	2,17	-2,30	5,63	4,35	0,46	5,47	7,87	-3,96
Límit superior	33,37	22,37	17,57	30,11	23,83	6,30	44,94	22,91	22,14	30,11	23,83	6,30	25,71	20,32	6,20	27,87	15,46	13,96

Dilució 1:	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
------------	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----

## Resultats

% Vives	52,38%		88,13%		53,77%		88,13%		78,89%		72,32%
% Mortes	47,62%		11,87%		46,23%		11,87%		21,11%		27,68%

Cél·lules/mL	Control			Merlot			Parellada			Pinot Noir			Xarel-lo			Pells		
	Límit inferior	Mitjana	Límit superior	Límit inferior	Mitjana	Límit superior	Límit inferior	Mitjana	Límit superior	Límit inferior	Mitjana	Límit superior	Límit inferior	Mitjana	Límit superior	Límit inferior	Mitjana	Límit superior
Llevats totals	3,32E+07	5,83E+07	8,34E+07	-2,76E+05	3,75E+07	7,53E+07	-1,73E+07	4,75E+07	1,12E+08	-2,76E+05	3,75E+07	7,53E+07	1,41E+07	3,92E+07	6,43E+07	1,37E+07	4,17E+07	6,97E+07
Llevats vius	5,73E+06	3,08E+07	5,59E+07	5,43E+06	3,25E+07	5,96E+07	-7,27E+06	2,50E+07	5,73E+07	5,43E+06	3,25E+07	5,96E+07	1,09E+07	3,08E+07	5,08E+07	1,97E+07	2,92E+07	3,87E+07
Llevats morts	1,11E+07	2,75E+07	4,39E+07	-5,76E+06	5,00E+06	1,58E+07	-1,04E+07	2,25E+07	5,54E+07	-5,76E+06	5,00E+06	1,58E+07	1,16E+06	8,33E+06	1,55E+07	-9,89E+06	1,25E+07	3,49E+07

Recompte	Control			Merlot			Parellada			Pinot Noir			Xarel-lo			Pells		
	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes
	25	10	15	13	9	4	34	12	22	22	14	8	17	11	6	13	7	6
	21	9	12	24	14	10	25	10	15	19	15	4	18	10	8	22	14	8
	31	14	17	25	14	11	18	5	13	11	9	2	15	8	7	20	12	8

Estadístic	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes
Mitjana	25,67	11,00	14,67	20,67	12,33	8,33	25,67	9,00	16,67	17,33	12,67	4,67	16,67	9,67	7,00	18,33	11,00	7,33
Desviació estàndard	5,03	2,65	2,52	6,66	2,89	3,79	8,02	3,61	4,73	5,69	3,21	3,06	1,53	1,53	1,00	4,73	3,61	1,15
Nombre	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
95% IC	12,50	6,57	6,25	16,54	7,17	9,40	19,92	8,96	11,74	14,13	7,99	7,59	3,79	3,79	2,48	11,74	8,96	2,87
Límit inferior	13,16	4,43	8,42	4,13	5,16	-1,07	5,74	0,04	4,93	3,21	4,68	-2,92	12,87	5,87	4,52	6,59	2,04	4,46
Límit superior	38,17	17,57	20,92	37,21	19,50	17,74	45,59	17,96	28,41	31,46	20,65	12,26	20,46	13,46	9,48	30,07	19,96	10,20

Dilució 1:	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
------------	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----

## Resultats

% Vives	42,67%		61,19%		34,36%		74,80%		57,86%		59,16%
% Mortes	57,33%		38,81%		65,64%		25,20%		42,14%		40,84%

Cél·lules/mL	Control			Merlot			Parellada			Pinot Noir			Xarel-lo			Pells		
	Límit inferior	Mitjana	Límit superior	Límit inferior	Mitjana	Límit superior	Límit inferior	Mitjana	Límit superior	Límit inferior	Mitjana	Límit superior	Límit inferior	Mitjana	Límit superior	Límit inferior	Mitjana	Límit superior
Llevats totals	3,29E+07	6,42E+07	9,54E+07	1,03E+07	5,17E+07	9,30E+07	1,44E+07	6,42E+07	1,14E+08	8,02E+06	4,33E+07	7,86E+07	3,22E+07	4,17E+07	5,12E+07	1,65E+07	4,58E+07	7,52E+07
Llevats vius	1,11E+07	2,75E+07	4,39E+07	1,29E+07	3,08E+07	4,88E+07	1,08E+05	2,25E+07	4,49E+07	1,17E+07	3,17E+07	5,16E+07	1,47E+07	2,42E+07	3,37E+07	5,11E+06	2,75E+07	4,99E+07
Llevats morts	2,10E+07	3,67E+07	5,23E+07	-2,68E+06	2,08E+07	4,43E+07	1,23E+07	4,17E+07	7,10E+07	-7,31E+06	1,17E+07	3,06E+07	1,13E+07	1,75E+07	2,37E+07	1,12E+07	1,83E+07	2,55E+07

Recompte	Control			Merlot			Parellada			Pinot Noir			Xarel-lo			Pells		
	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes
	15	4	11	27	17	10	15	3	12	16	10	6	15	9	6	23	14	9
7	2	5	29	13	16	24	5	19	9	7	2	26	15	11	24	18	6	
22	5	17	12	9	3	8	1	7	22	16	6	20	11	9	25	9	16	

Estadístic	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes
Mitjana	14,67	3,67	11,00	22,67	13,00	9,67	15,67	3,00	12,67	15,67	11,00	4,67	20,33	11,67	8,67	24,00	13,67	10,33
Desviació estàndard	7,51	1,53	6,00	9,29	4,00	6,51	8,02	2,00	6,03	6,51	4,58	2,31	5,51	3,06	2,52	1,00	4,51	5,13
Nombre	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
95% IC	18,64	3,79	14,90	23,08	9,94	16,16	19,92	4,97	14,97	16,16	11,38	5,74	13,68	7,59	6,25	2,48	11,20	12,75
Límit inferior	-3,98	-0,13	-3,90	-0,41	3,06	-6,50	-4,26	-1,97	-2,31	-0,50	-0,38	-1,07	6,65	4,08	2,42	21,52	2,47	-2,41
Límit superior	33,31	7,46	25,90	45,75	22,94	25,83	35,59	7,97	27,64	31,83	22,38	10,40	34,01	19,26	14,92	26,48	24,87	23,08

Dilució 1:	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
------------	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----

## Resultats

% Vives	25,99%	60,93%	17,78%	71,00%	57,56%	57,29%
% Mortes	74,01%	39,07%	82,22%	29,00%	42,44%	42,71%

Cél·lules/mL	Control			Merlot			Parellada			Pinot Noir			Xarel-lo			Pells		
	Límit inferior	Mitjana	Límit superior	Límit inferior	Mitjana	Límit superior	Límit inferior	Mitjana	Límit superior	Límit inferior	Mitjana	Límit superior	Límit inferior	Mitjana	Límit superior	Límit inferior	Mitjana	Límit superior
Llevats totals	-9,95E+06	3,67E+07	8,33E+07	-1,04E+06	5,67E+07	1,14E+08	-1,06E+07	3,92E+07	8,90E+07	-1,24E+06	3,92E+07	7,96E+07	1,66E+07	5,08E+07	8,50E+07	5,38E+07	6,00E+07	6,62E+07
Llevats vius	-3,20E+05	9,17E+06	1,87E+07	7,66E+06	3,25E+07	5,73E+07	-4,92E+06	7,50E+06	1,99E+07	-9,59E+05	2,75E+07	5,60E+07	1,02E+07	2,92E+07	4,81E+07	6,16E+06	3,42E+07	6,22E+07
Llevats morts	-9,76E+06	2,75E+07	6,48E+07	-1,62E+07	2,42E+07	6,46E+07	-5,77E+06	3,17E+07	6,91E+07	-2,68E+06	1,17E+07	2,60E+07	6,04E+06	2,17E+07	3,73E+07	-6,04E+06	2,58E+07	5,77E+07

Recompte	Control			Merlot			Parellada			Pinot Noir			Xarel-lo			Pells		
	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes
	9	1	8	18	10	8	26	5	21	14	10	4	8	5	3	14	6	8
13	2	11	24	13	11	13	4	9	32	20	12	23	13	10	15	7	8	
21	4	17	25	16	9	24	7	17	40	22	18	19	9	10	14	7	7	

Estadístic	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes
Mitjana	14,33	2,33	12,00	22,33	13,00	9,33	21,00	5,33	15,67	28,67	17,33	11,33	16,67	9,00	7,67	14,33	6,67	7,67
Desviació estàndard	6,11	1,53	4,58	3,79	3,00	1,53	7,00	1,53	6,11	13,32	6,43	7,02	7,77	4,00	4,04	0,58	0,58	0,58
Nombre	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
95% IC	15,18	3,79	11,38	9,40	7,45	3,79	17,39	3,79	15,18	33,08	15,97	17,45	19,30	9,94	10,04	1,43	1,43	1,43
Límit inferior	-0,84	-1,46	0,62	12,93	5,55	5,54	3,61	1,54	0,49	-4,41	1,36	-6,11	-2,63	-0,94	-2,37	12,90	5,23	6,23
Límit superior	29,51	6,13	23,38	31,74	20,45	13,13	38,39	9,13	30,84	61,75	33,30	28,78	35,96	18,94	17,71	15,77	8,10	9,10

Dilució 1:	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
------------	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----

## Resultats

% Vives	15,18%	57,91%	26,39%	62,98%	55,46%	46,51%
% Mortes	84,82%	42,09%	73,61%	37,02%	44,54%	53,49%

Cél·lules/mL	Control			Merlot			Parellada			Pinot Noir			Xarel-lo			Pells		
	Límit inferior	Mitjana	Límit superior	Límit inferior	Mitjana	Límit superior	Límit inferior	Mitjana	Límit superior	Límit inferior	Mitjana	Límit superior	Límit inferior	Mitjana	Límit superior	Límit inferior	Mitjana	Límit superior
Llevats totals	-2,11E+06	3,58E+07	7,38E+07	3,23E+07	5,58E+07	7,93E+07	9,03E+06	5,25E+07	9,60E+07	-1,10E+07	7,17E+07	1,54E+08	-6,57E+06	4,17E+07	8,99E+07	3,22E+07	3,58E+07	3,94E+07
Llevats vius	-3,65E+06	5,83E+06	1,53E+07	1,39E+07	3,25E+07	5,11E+07	3,85E+06	1,33E+07	2,28E+07	3,41E+06	4,33E+07	8,33E+07	-2,34E+06	2,25E+07	4,73E+07	1,31E+07	1,67E+07	2,03E+07
Llevats morts	1,54E+06	3,00E+07	5,85E+07	1,38E+07	2,33E+07	3,28E+07	1,22E+06	3,92E+07	7,71E+07	-1,53E+07	2,83E+07	7,20E+07	-5,93E+06	1,92E+07	4,43E+07	1,56E+07	1,92E+07	2,28E+07

Recompte	Control			Suc			Pells			Vit. C (x 0,5)			Vic. C (x1)			Vit. C (x2)			Revidox (x 0,5)			Revidox (x1)			Revidox (x2)		
	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes
	17	17	0	20	20	0	27	25	2	20	20	0	16	16	0	12	11	1	8	7	1	8	8	0	17	17	0
	12	12	0	20	19	1	22	21	1	16	16	0	15	15	0	26	15	0	9	9	0	8	8	0	11	11	0
	13	13	0	22	22	0	23	22	1	22	22	0	18	18	0	19	18	1	10	10	0	4	4	0	12	12	0

Estadístic	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes
Mitjana	14,00	14,00	0,00	20,67	20,33	0,33	24,00	22,67	1,33	19,33	19,33	0,00	16,33	16,33	0,00	19,00	14,67	0,67	9,00	8,67	0,33	6,67	6,67	0,00	13,33	13,33	0,00
Desviació estàndard	2,65	2,65	0,00	1,15	1,53	0,58	2,65	2,08	0,58	3,06	3,06	0,00	1,53	1,53	0,00	7,00	3,51	0,58	1,00	1,53	0,58	2,31	2,31	0,00	3,21	3,21	0,00
Nombre	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
95% IC	6,57	6,57	#NUM!	2,87	3,79	1,43	6,57	5,17	1,43	7,59	7,59	#NUM!	3,79	3,79	#NUM!	17,39	8,72	1,43	2,48	3,79	1,43	5,74	5,74	#NUM!	7,99	7,99	#NUM!
Límit inferior	7,43	7,43	#NUM!	17,80	16,54	-1,10	17,43	17,50	-0,10	11,74	11,74	#NUM!	12,54	12,54	#NUM!	1,61	5,94	-0,77	6,52	4,87	-1,10	0,93	0,93	#NUM!	5,35	5,35	#NUM!
Límit superior	20,57	20,57	#NUM!	23,54	24,13	1,77	30,57	27,84	2,77	26,92	26,92	#NUM!	20,13	20,13	#NUM!	36,39	23,39	2,10	11,48	12,46	1,77	12,40	12,40	#NUM!	21,32	21,32	#NUM!

Dilució 1:	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
------------	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----

## Resultats

% Vives	100,00%			98,33%			94,57%			100,00%			100,00%			81,37%			95,83%			100,00%			100,00%		
% Mortes	0,00%			1,67%			5,43%			0,00%			0,00%			4,53%			4,17%			0,00%			0,00%		

Cèl·lules/mL	Control			Suc			Pells			Vit. C (x 0,5)			Vic. C (x1)			Vit. C (x2)			Revidox (x 0,5)			Revidox (x1)			Revidox (x2)		
	Límit inferior	Mitjana	Límit superior	Límit inferior	Mitjana	Límit superior	Límit inferior	Mitjana	Límit superior	Límit inferior	Mitjana	Límit superior	Límit inferior	Mitjana	Límit superior	Límit inferior	Mitjana	Límit superior	Límit inferior	Mitjana	Límit superior	Límit inferior	Mitjana	Límit superior	Límit inferior	Mitjana	Límit superior
Llevats totals	1,86E+07	3,50E+07	5,14E+07	4,45E+07	5,17E+07	5,88E+07	4,36E+07	6,00E+07	7,64E+07	2,94E+07	4,83E+07	6,73E+07	3,13E+07	4,08E+07	5,03E+07	4,03E+06	4,75E+07	9,10E+07	1,63E+07	2,25E+07	2,87E+07	2,32E+06	1,67E+07	3,10E+07	1,34E+07	3,33E+07	5,33E+07
Llevats vius	1,86E+07	3,50E+07	5,14E+07	4,13E+07	5,08E+07	6,03E+07	4,37E+07	5,67E+07	6,96E+07	2,94E+07	4,83E+07	6,73E+07	3,13E+07	4,08E+07	5,03E+07	1,49E+07	3,67E+07	5,85E+07	1,22E+07	2,17E+07	3,12E+07	2,32E+06	1,67E+07	3,10E+07	1,34E+07	3,33E+07	5,33E+07
Llevats morts	#NUM!	0,00E+00	#NUM!	-2,75E+06	8,33E+05	4,42E+06	-2,52E+05	3,33E+06	6,92E+06	#NUM!	0,00E+00	#NUM!	#NUM!	0,00E+00	#NUM!	-1,92E+06	1,67E+06	5,25E+06	-2,75E+06	8,33E+05	4,42E+06	#NUM!	0,00E+00	#NUM!	#NUM!	0,00E+00	#NUM!

Recompte	Control			Suc			Pells			Vit. C (x 0,5)			Vic. C (x1)			Vit. C (x2)			Revidox (x 0,5)			Revidox (x1)			Revidox (x2)		
	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes
	23	18	5	18	12	8	26	18	8	16	16	0	16	15	1	18	16	2	15	15	0	11	10	1	12	11	1
	23	15	8	21	18	3	19	13	6	15	12	3	15	15	0	17	15	2	9	8	1	11	11	0	15	14	1
	18	10	8	25	16	9	26	17	9	17	14	3	18	16	2	14	13	1	12	11	1	12	12	0	10	9	1

Estadístic	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes
Mitjana	21,33	14,33	7,00	21,33	15,33	6,67	23,67	16,00	7,67	16,00	14,00	2,00	16,33	15,33	1,00	16,33	14,67	1,67	12,00	11,33	0,67	11,33	11,00	0,33	12,33	11,33	1,00
Desviació estàndard	2,89	4,04	1,73	3,51	3,06	3,21	4,04	2,65	1,53	1,00	2,00	1,73	1,53	0,58	1,00	2,08	1,53	0,58	3,00	3,51	0,58	0,58	1,00	0,58	2,52	2,52	0,00
Nombre	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
95% IC	7,17	10,04	4,30	8,72	7,59	7,99	10,04	6,57	3,79	2,48	4,97	4,30	3,79	1,43	2,48	5,17	3,79	1,43	7,45	8,72	1,43	1,43	2,48	1,43	6,25	6,25	#NUM!
Límit inferior	14,16	4,29	2,70	12,61	7,74	-1,32	13,63	9,43	3,87	13,52	9,03	-2,30	12,54	13,90	-1,48	11,16	10,87	0,23	4,55	2,61	-0,77	9,90	8,52	-1,10	6,08	5,08	#NUM!
Límit superior	28,50	24,37	11,30	30,06	22,92	14,65	33,71	22,57	11,46	18,48	18,97	6,30	20,13	16,77	3,48	21,50	18,46	3,10	19,45	20,06	2,10	12,77	13,48	1,77	18,58	17,58	#NUM!

Dilució 1:	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
------------	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----

## Resultats

% Vives	66,34%			72,13%			67,68%			87,45%			94,21%			89,99%			93,52%			96,97%			91,67%		
% Mortes	33,66%			27,87%			32,32%			12,55%			5,79%			10,01%			6,48%			3,03%			8,33%		

Cèl·lules/mL	Control			Suc			Pells			Vit. C (x 0,5)			Vic. C (x1)			Vit. C (x2)			Revidox (x 0,5)			Revidox (x1)			Revidox (x2)		
	Límit inferior	Mitjana	Límit superior	Límit inferior	Mitjana	Límit superior	Límit inferior	Mitjana	Límit superior	Límit inferior	Mitjana	Límit superior	Límit inferior	Mitjana	Límit superior	Límit inferior	Mitjana	Límit superior	Límit inferior	Mitjana	Límit superior	Límit inferior	Mitjana	Límit superior	Límit inferior	Mitjana	Límit superior
Llevats totals	3,54E+07	5,33E+07	7,13E+07	3,15E+07	5,33E+07	7,51E+07	3,41E+07	5,92E+07	8,43E+07	3,38E+07	4,00E+07	4,62E+07	3,13E+07	4,08E+07	5,03E+07	2,79E+07	4,08E+07	5,38E+07	1,14E+07	3,00E+07	4,86E+07	2,47E+07	2,83E+07	3,19E+07	1,52E+07	3,08E+07	4,65E+07
Llevats vius	1,07E+07	3,58E+07	6,09E+07	1,94E+07	3,83E+07	5,73E+07	2,36E+07	4,00E+07	5,64E+07	2,26E+07	3,50E+07	4,74E+07	3,47E+07	3,83E+07	4,19E+07	2,72E+07	3,67E+07	4,62E+07	6,52E+06	2,83E+07	5,01E+07	2,13E+07	2,75E+07	3,37E+07	1,27E+07	2,83E+07	4,40E+07
Llevats morts	6,74E+06	1,75E+07	2,83E+07	-3,30E+06	1,67E+07	3,66E+07	9,68E+06	1,92E+07	2,87E+07	-5,76E+06	5,00E+06	1,58E+07	-3,71E+06	2,50E+06	8,71E+06	5,81E+05	4,17E+06	7,75E+06	-1,92E+06	1,67E+06	5,25E+06	-2,75E+06	8,33E+05	4,42E+06	#NUM!	2,50E+06	#NUM!

Recompte	Control			Suc			Pells			Vit. C (x 0,5)			Vic. C (x1)			Vit. C (x2)			Revidox (x 0,5)			Revidox (x1)			Revidox (x2)		
	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes
	15	7	8	24	12	12	21	13	8	18	16	2	17	15	2	10	9	1	21	20	1	8	8	0	23	20	3
	29	15	14	18	11	7	27	16	11	21	19	2	10	9	1	15	15	0	13	11	2	11	9	2	20	18	2
	14	8	6	19	9	10	20	12	8	14	13	1	11	11	0	19	17	2	10	8	2	9	9	0	28	23	5

Estadístic	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes
Mitjana	19,33	10,00	9,33	20,33	10,67	9,67	22,67	13,67	9,00	17,67	16,00	1,67	12,67	11,67	1,00	14,67	13,67	1,00	14,67	13,00	1,67	9,33	8,67	0,67	23,67	20,33	3,33
Desviació estàndard	8,39	4,36	4,16	3,21	1,53	2,52	3,79	2,08	1,73	3,51	3,00	0,58	3,79	3,06	1,00	4,51	4,16	1,00	5,69	6,24	0,58	1,53	0,58	1,15	4,04	2,52	1,53
Nombre	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
95% IC	20,83	10,83	10,34	7,99	3,79	6,25	9,40	5,17	4,30	8,72	7,45	1,43	9,40	7,59	2,48	11,20	10,34	2,48	14,13	15,51	1,43	3,79	1,43	2,87	10,04	6,25	3,79
Limit inferior	-1,50	-0,83	-1,01	12,35	6,87	3,42	13,26	8,50	4,70	8,94	8,55	0,23	3,26	4,08	-1,48	3,47	3,32	-1,48	0,54	-2,51	0,23	5,54	7,23	-2,20	13,63	14,08	-0,46
Limit superior	40,17	20,83	19,68	28,32	14,46	15,92	32,07	18,84	13,30	26,39	23,45	3,10	22,07	19,26	3,48	25,87	24,01	3,48	28,79	28,51	3,10	13,13	10,10	3,54	33,71	26,58	7,13

Dilució 1:	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
------------	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----

## Resultats

% Vives	51,84%			52,83%			60,39%			90,74%			92,75%			93,16%			86,62%			93,94%			86,37%		
% Mortes	48,16%			47,17%			39,61%			9,26%			7,25%			6,84%			13,38%			6,06%			13,63%		

Cèl·lules/mL	Control			Suc			Pells			Vit. C (x 0,5)			Vic. C (x1)			Vit. C (x2)			Revidox (x 0,5)			Revidox (x1)			Revidox (x2)		
	Limit inferior	Mitjana	Limit superior	Limit inferior	Mitjana	Limit superior	Limit inferior	Mitjana	Limit superior	Limit inferior	Mitjana	Limit superior	Limit inferior	Mitjana	Limit superior	Limit inferior	Mitjana	Limit superior	Limit inferior	Mitjana	Limit superior	Limit inferior	Mitjana	Limit superior	Limit inferior	Mitjana	Limit superior
Llevats totals	-3,75E+06	4,83E+07	1,00E+08	3,09E+07	5,08E+07	7,08E+07	3,32E+07	5,67E+07	8,02E+07	2,24E+07	4,42E+07	6,60E+07	8,15E+06	3,17E+07	5,52E+07	8,66E+06	3,67E+07	6,47E+07	1,35E+06	3,67E+07	7,20E+07	1,38E+07	2,33E+07	3,28E+07	3,41E+07	5,92E+07	8,43E+07
Llevats vius	-2,07E+06	2,50E+07	5,21E+07	1,72E+07	2,67E+07	3,62E+07	2,12E+07	3,42E+07	4,71E+07	2,14E+07	4,00E+07	5,86E+07	1,02E+07	2,92E+07	4,81E+07	8,31E+06	3,42E+07	6,00E+07	-6,28E+06	3,25E+07	7,13E+07	1,81E+07	2,17E+07	2,53E+07	3,52E+07	5,08E+07	6,65E+07
Llevats morts	-2,52E+06	2,33E+07	4,92E+07	8,54E+06	2,42E+07	3,98E+07	1,17E+07	2,25E+07	3,33E+07	5,81E+05	4,17E+06	7,75E+06	-3,71E+06	2,50E+06	8,71E+06	-3,71E+06	2,50E+06	8,71E+06	5,81E+05	4,17E+06	7,75E+06	-5,50E+06	1,67E+06	8,84E+06	-1,15E+06	8,33E+06	1,78E+07

Recompte	Control			Suc			Pells			Vit. C (x 0,5)			Vic. C (x1)			Vit. C (x2)			Revidox (x 0,5)			Revidox (x1)			Revidox (x2)		
	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes
	22	12	10	13	6	7	28	16	12	14	13	1	13	12	1	12	12	0	14	12	2	21	19	2	19	16	3
	19	10	9	24	10	14	27	13	14	25	23	2	20	20	0	18	17	1	18	16	2	13	12	1	12	11	1
	25	13	12	16	9	7	27	16	11	16	16	0	18	17	1	17	16	1	23	20	3	11	11	0	17	16	1

Estadístic	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes	Total	Vives	Mortes
Mitjana	22,00	11,67	10,33	17,67	8,33	9,33	27,33	15,00	12,33	18,33	17,33	1,00	17,00	16,33	0,67	15,67	15,00	0,67	18,33	16,00	2,33	15,00	14,00	1,00	16,00	14,33	1,67
Desviació estàndard	3,00	1,53	1,53	5,69	2,08	4,04	0,58	1,73	1,53	5,86	5,13	1,00	3,61	4,04	0,58	3,21	2,65	0,58	4,51	4,00	0,58	5,29	4,36	1,00	3,61	2,89	1,15
Nombre	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
95% IC	7,45	3,79	3,79	14,13	5,17	10,04	1,43	4,30	3,79	14,56	12,75	2,48	8,96	10,04	1,43	7,99	6,57	1,43	11,20	9,94	1,43	13,14	10,83	2,48	8,96	7,17	2,87
Limit inferior	14,55	7,87	6,54	3,54	3,16	-0,71	25,90	10,70	8,54	3,78	4,59	-1,48	8,04	6,29	-0,77	7,68	8,43	-0,77	7,13	6,06	0,90	1,86	3,17	-1,48	7,04	7,16	-1,20
Limit superior	29,45	15,46	14,13	31,79	13,50	19,37	28,77	19,30	16,13	32,89	30,08	3,48	25,96	26,37	2,10	23,65	21,57	2,10	29,53	25,94	3,77	28,14	24,83	3,48	24,96	21,50	4,54

Dilució 1:	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
------------	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----

## Resultats

% Vives	53,06%			48,02%			54,85%			94,95%			95,58%			96,19%			87,19%			94,26%			90,00%		
% Mortes	46,94%			51,98%			45,15%			5,05%			4,42%			3,81%			12,81%			5,74%			10,00%		

Cèl·lules/mL	Control			Suc			Pells			Vit. C (x 0,5)			Vic. C (x1)			Vit. C (x2)			Revidox (x 0,5)			Revidox (x1)			Revidox (x2)		
	Limit inferior	Mitjana	Limit superior	Limit inferior	Mitjana	Limit superior	Limit inferior	Mitjana	Limit superior	Limit inferior	Mitjana	Limit superior	Limit inferior	Mitjana	Limit superior	Limit inferior	Mitjana	Limit superior	Limit inferior	Mitjana	Limit superior	Limit inferior	Mitjana	Limit superior	Limit inferior	Mitjana	Limit superior
Llevats totals	3,64E+07	5,50E+07	7,36E+07	8,85E+06	4,42E+07	7,95E+07	6,47E+07	6,83E+07	7,19E+07	9,44E+06	4,58E+07	8,22E+07	2,01E+07	4,25E+07	6,49E+07	1,92E+07	3,92E+07	5,91E+07	1,78E+07	4,58E+07	7,38E+07	4,64E+06	3,75E+07	7,04E+07	1,76E+07	4,00E+07	6,24E+07
Llevats vius	1,97E+07	2,92E+07	3,87E+07	7,91E+06	2,08E+07	3,38E+07	2,67E+07	3,75E+07	4,83E+07	1,15E+07	4,33E+07	7,52E+07	1,57E+07	4,08E+07	6,59E+07	2,11E+07	3,75E+07	5,39E+07	1,52E+07	4,00E+07	6,48E+07	3,50E+06	6,21E+07	1,79E+07	3,58E+07	5,38E+07	
Llevats morts	1,63E+07	2,58E+07	3,53E+07	-1,77E+06	2,33E+07	4,84E+07	2,13E+07	3,08E+07	4,03E+07	-3,71E+06	2,50E+06	8,71E+06	-1,92E+06	1,67E+06	5,25E+06	-1,92E+06	1,67E+06	5,25E+06	2,25E+06	5,83E+06	9,42E+06	-3,71E+06	2,50E+06	8,71E+06	-3,00E+06	4,17E+06	1,13E+07