



ELS ANTIOXIDANTS TENEN UN COSTAT FOSC?

Joan Fernández Mas

Microbiologia

IES Berenguer d'Entença

Roser Mas Cabré

11/01/2015

ÍNDEX

INTRODUCCIÓ.	1
FONAMENT TEÒRIC.	3
1. Bacteris.	3
1.1. Característiques generals.	3
1.2. Morfologia.	3
1.3. Estructura dels bacteris.	4
1.4. Metabolisme.	10
1.5. Bacteris i microorganismes utilitzats en la fase experimental.	11
2. Antibiótics.	14
2.1. Què és un antibiòtic?	14
2.2. Història dels antibiòtics.	14
2.3. Funcionament dels antibiòtics.	14
2.4. Classificació dels antibiòtics.	15
2.5. Antibiótics utilitzats en la fase experimental.	21
3. Radicals lliures i espècies reactives d'oxigen.	22
3.1. Què és una espècie reactiva d'oxigen?	22

4. Antioxidants.	24
4.1. Què és un antioxidant?	24
4.2. Funcionament dels antioxidants.	25
4.3. Classificació dels antioxidants.	25
4.4. Relació antioxidant radical lliure	25
4.5. Antioxidants utilitzats en la fase experimental.	30
 TREBALL EXPERIMENTAL	 33
 1. Introducció	 33
 2. Material	 33
 3. Procediment	 34
3.1. Esterilització del material.	34
3.2. Preparació del medi de cultiu.	35
3.3. Obtenció de bacteris.	36
3.4. Elaboració dels antibiogrames.	36
3.5. Valoració de la presència de ROS amb la tinció d'un reactiu fluorescent.	37
3.6. Efecte dels antioxidants sobre els antibiòtics.	38

4. Resultats	39
4.1. Elaboració dels antibiogrames.	39
4.2. Valoració de la presència de ROS amb la tinció d'un reactiu fluorescent.	39
4.3. Efecte dels antioxidants sobre els antibiòtics.	41
5. Discussió de resultats.	45
5.1. Quin és el millor antibiòtic?	45
5.2. Podem demostrar la presència de ROS amb la tinció d'un reactiu fluorescent?	46
5.3. Els antioxidants redueixen l'efecte dels antibiòtics?	46
CONCLUSIÓ	48
VALORACIÓ PERSONAL	51
AGRAÏMENTS	52
BIBLIOGRAFIA	53
ANNEXOS	60
Annex-1	61
Annex-2	64
Annex-3	66
Annex-4	68

INTRODUCCIÓ

Alhora d'escollir el tema pel treball de recerca tenia clar que volia que fos un treball de biologia perquè es l'assignatura que més em motiva. Volia que fos un treball que estigués relacionat amb la salut, ja que en el futur m'agradaria estudiar medicina.

Vaig trobar una sèrie d'articles que donaven dues teories contraposades, uns parlaven sobre el fet que els antibiòtics provoquen la formació de radicals lliures en els bacteris, aquests són nocius pels bacteris, i uns altres explicaven que aquesta teoria era falsa. Aquesta incertesa hem va despertar curiositat per saber el mecanisme d'acció dels antibiòtics.

El curs passat vaig fer un curset a la URV on ens van oferir ajuda per realitzar el treball de recerca. I així un cop triat el tema vaig contactar amb la Dra. Anna Borrull que hem va explicar i ajudar a fer la part practica del treball a més d'orientar-me cap al món dels antioxidants.

Aquest treball m'ha ajudat a entendre millor el món dels bacteris i el que fa referència als antibiòtics i com actuen. També m'ha ajudat a descobrir els antioxidants, substàncies de les quals havia sentit parlar bastant però que fins ara no entenia molt bé que eren ni quina era realment la seva funció.

Aquest treball té com objectiu estudiar si els antioxidants tenen un efecte advers en l'acció bactericida dels antibiòtics.

Per tant les hipòtesis que plantejo en el meu treball són:

- 1. Potser els antibiòtics generen que els bacteris produeixin radicals lliures que danyen al bacteri.**

2. Si l'afirmació anterior es correcta, pot ser els antioxidants reduiran l'efecte bactericida dels antibiòtics al neutralitzar els radicals lliures.

Per investigar si aquestes hipòtesis són certes s'ha treballat amb diverses colònies de bacteris sotmeses a diferents condicions. En primer lloc s'ha volgut comprovar si realment els antibiòtics tenen un efecte bactericida i quin dels antibiòtics resulta ser el més eficaç. A continuació s'ha realitzat una experiència amb fluorescència en un cultiu de llevats per veure la presència de radicals lliures. Finalment s'han utilitzat els cultius restants per fer uns antibiogrames amb antioxidants i antibiòtics.

Els problemes que m'han anat sorgint són diversos. Alhora de fer la recerca bibliogràfica m'he trobat amb una gran quantitat d'informació anteposada respecte a la idea que els antibiòtics provoquen o no radicals lliures. El principal problema en la part pràctica ha sigut que l'experiència de fluorescència no es podia dur a terme amb antibiòtics i per tant s'acaben fent deduccions de forma indirecte.

El plantejament d'aquest treball de recerca s'ha fet a partir del mètode científic. A partir de la proposta del problema s'ha marcat l'objectiu principal de la recerca, s'han formulat les hipòtesis, s'ha dissenyat l'experimentació per obtenir uns resultats que, amb el seu anàlisi, ens han permès contrarestar o no les hipòtesis i, finalment, s'ha arribat a unes conclusions que ens podran ajudar a formular teories i a formular noves preguntes.

FONAMENTS TEÒRICS

1. Els bacteris

1.1. Característiques generals

Els bacteris (del grec *baktêrion* que significa “petit pal”) són uns organismes unicel·lulars procariotes, la seva mida varia entre 1µm i 7µm. Els organismes procariotes es classifiquen en Eubacteris i Arqueobacteris. Els bacteris pertanyen al grup dels Eubacteris.

Les cèl·lules procariotes es diferencien de les cèl·lules eucariotes en que el seu material genètic no es troba envoltat per una membrana nuclear (com en el cas de les cèl·lules eucariotes), el DNA no s'associa amb histones (proteïnes cromosòmiques), els procariotes no tenen orgànuls amb membrana i la seva reproducció, en general, és una divisió anomenada fissió binària.

1.2. Morfologia

Els bacteris es poden classificar segons la seva forma en quatre grups:

- Cocs: del grec “Kókkos” que significa llavor o gra, que són aquells bacteris amb una forma esfèrica.
- Bacils: del llatí “Baculus”, que significa bastó, i són tots aquells bacteris amb una forma allargada.
- Espirils: són tots aquells bacteris amb un cos cel·lular amb forma d'espiral.
- Espiroquetes: són uns bacteris que es caracteritzen per tenir un cos cel·lular allargat i cargolat helicoïdalment.

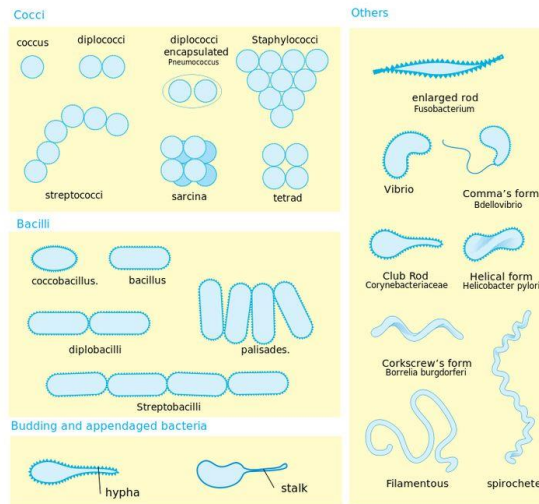


Figura 1: Classificació dels bacteris segons la seva forma

1.3. Estructura dels bacteris

Podríem analitzar la cèl·lula en tres zones: la zona externa, la interna i el material genètic.

La part externa consta de tres estructures a més dels flagels i dels cilis que poden o no ser-hi. Aquestes estructures són:

- La Membrana plasmàtica o bicapa lipídica està formada per fosfolípids i proteïnes. La principal funció de la membrana és separar el medi extern del medi intern realitzant una permeabilitat selectiva. Algunes de les proteïnes poden actuar de receptors, i altres de transportadors que els hi permet regular l'entrada i sortida de substàncies de la cèl·lula.
- Paret cel·lular és un recobriment del bacteri que envolta tota la membrana plasmàtica i li dona rigidesa. Principalment està constituïda per un polímer denominat peptidoglicà. La principal funció és la de donar consistència i rigidesa al bacteri per evitar la seva lisi, ja que la pressió hidrostàtica que exerceix el medi intern és més elevada que la del medi extern.

Segons la seva composició, es poden presentar dos tipus de paret cel·lular, la tinció Gram permet diferenciar-los. Els bacteris poden ser Gram-positiu, quan la tinció de Gram ha donat un color blau o violat (Figura 3) , o Gram-negatiu, quan la tinció de Gram ha donat un color rosat (Figura 2).

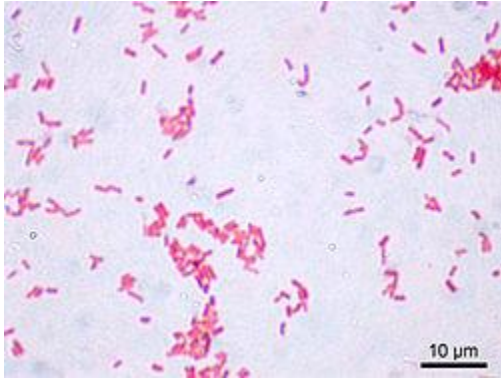


Figura 2: tinció gram-

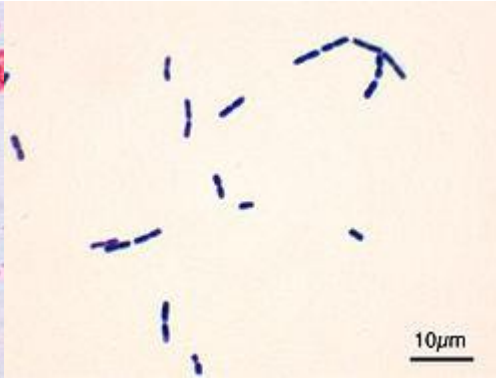


Figura 3: tinció gram+

- Les parets gram-positiu estan formades per una xarxa de peptidoglicà, anomenada mureïna, i cadenes d'àcid teïcoic i lipoteïcoic que serveixen com a quelats. En cas de que hi hagi un flagel aquest conté dos anells com a suport.
- Les parets gram-negatiu tenen una estructura didèrmica (conté dos membranes cel·lulars). Aquestes dues membranes són membranes lipídiques i entre aquestes dues es troba una fina capa de peptidoglicà (aquest espai s'anomena espai periplasmàtic).

La paret pot estar recoberta d'altres polímers que formen una capa anomenada glicocàlix i la seva funció és protegir a la cèl·lula de la dessecació, la fagocitosi d'altres organismes i la ingestió de substàncies tòxiques. També serveix com a dipòsit de nutrients i de residus i a més intervé en la adhesió cel·lular.

En la paret cel·lular també es poden trobar estructures filamentoses que permeten l'adhesió a altres cèl·lules o a superfícies, també trobem els pili sexual i els flagels.

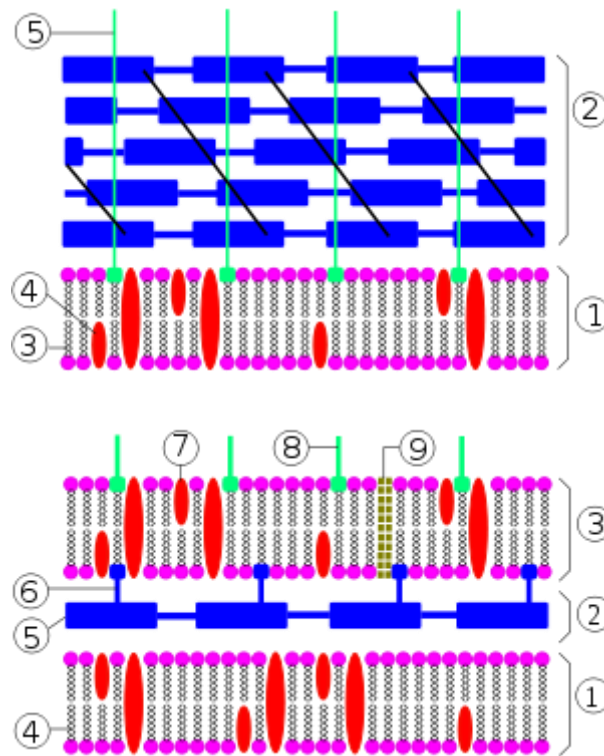


Figura 4: paret Gram-positiu (a dalt) i paret Gram-negatiu (a baix)

A dalt: Bacteri Gram-positiu. 1-membrana citoplasmàtica, 2-peptidoglicà, 3-fosfolípids, 4-proteïnes, 5-àcid lipoteicoic.

A baix: Bacteri Gram-negatiu. 1-membrana citoplasmàtica (membrana interna), 2-espai periplasmàtic, 3-membrana externa, 4-fosfolípids, 5-peptidoglicà, 6-lipoproteïna, 7-proteïnes, 8-lipopolisacàrids, 9-porines.

- Càpsula: és una capa rígida que recobreix la paret cel·lular d'alguns bacteris. Aquesta capa està formada per diversos polímers orgànics tals com les glicoproteïnes (en major quantitat) o polisacàrids. Té diverses funcions, la principal és protegir al bacteri de la fagocitosi i dels bacteriòfags. Les altres funcions són la de reserva de substàncies de rebuig i de nutrients, protegir el bacteri de la deshidratació i permetre l'adhesió del bacteri a les cèl·lules del hoste.
- Flagel: és una prolongació citoplasmàtica mòbil que permet el desplaçament de la cèl·lula.

El flagel es un tub helicoïdal buit d'uns 20nm de gruix i unes 7µm de llargària. Els flagels es poden disposar de diferents maneres aquestes són: “monotrico”, “lofotrico”, “anfotrico” i “peritrico”

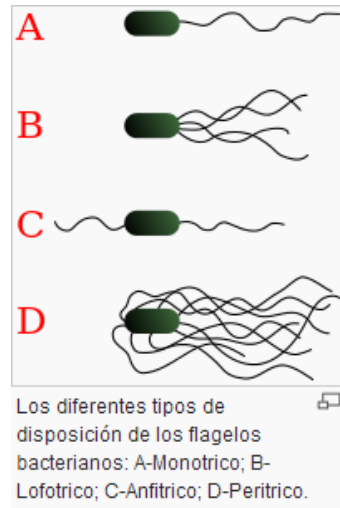


Figura 5: tipus de flagels 1

- Fímbries: són unes estructures tubulades, curtes i fines, que són utilitzades per adherir-se a altres cèl·lules.
- Pilis: són unes estructures tubulades, curtes (però lleugerament més llargues que les fímbries) i fines, i la seva funció és la de transmetre material genètic

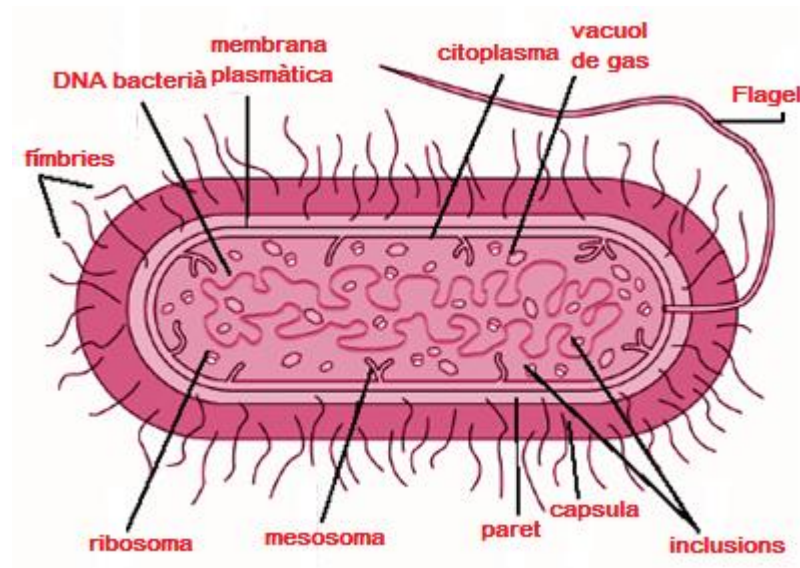


Figura 6: orgànuls del bacteri

La zona interna és bàsicament el citoplasma amb tots els orgànuls cel·lulars:

- Citoplasma: és una emulsió col·loïdal, fina i granulosa que acull els orgànuls i els facilita el moviment.
- Ribosomes: és un orgànul no membranós que està format per dos subunitats desiguals, una més gran que l'altra. Els ribosomes estan constituïts per ARNr i proteïnes. La seva funció és realitzar la síntesi de proteïnes a partir de l'ARNm que prové de la transcripció del DNA bacterià aquest procés consisteix en copiar una seqüència d'ADN en ARN pel qual es copia i es transforma una seqüència d'ADN en ARN.

El ribosoma procariota es més petit que el ribosoma eucariota, ja que té un coeficient de sedimentació¹ de 70S respecte a l'eucariota de 80S. Les subunitats del ribosoma procariota son de 30S la subunitat petita i de 50S la subunitat gran, en canvi en les cèl·lules eucariotes les subunitats són de 60S i de 40S. Aquest fet té molta importància ja que com s'explica més endavant alguns antibiòtics actuen sobre les subunitats del ribosoma procariota i és per aquesta diferència en el coeficient de sedimentació que evita que l'antibiòtic sigui nociu per les nostres cèl·lules, és a dir les eucariotes.

Concretament la subunitat gran dels ribosomes procariotes està formada per dos cadenes d'ARNr, una amb uns 3000 nucleòtids i l'altra amb uns 120 nucleòtids (riques en Adenina i Guanina) i proteïnes. La subunitat petita està formada per una sola cadena d'ARNr amb uns 1600 nucleòtids (sobretot Guanina i Adenina) i proteïnes.

¹ Coeficient de sedimentació d'una partícula o substància és una magnitud que et permet relacionar la mida i el volum amb la velocitat de síntesi de la substància i es calcula dividint la velocitat constant de sedimentació amb la acceleració aplicada. Les unitats són els Svedbergs (S). Els valors del coeficient de sedimentació no són additius (30S+40S≠80S sinó que és 70S) a causa de que depèn tan de la massa com de la forma.

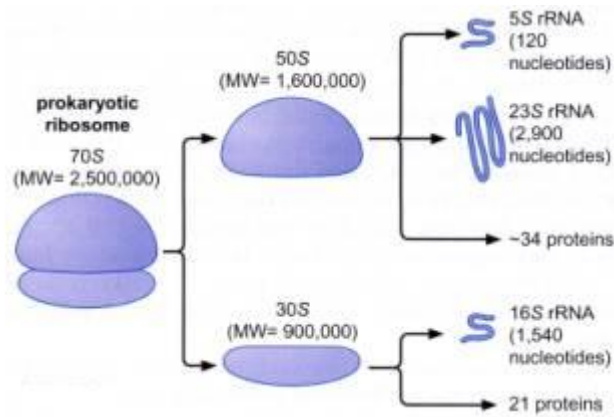


Figura 7: el ribosoma procariota

- Vacúol de gas: són unes vesícules que contenen aire i la seva funció és intervenir en la fotosíntesi (tan sols són presents en els cianobacteris).
- Inclusions: són acumulacions de substàncies de reserva que el bacteri ha sintetitzat en moments d'abundància.
- Mesosoma: són unes invaginacions de la membrana plasmàtica que intervenen en la divisió de la cèl·lula i en la transmissió d'electrons de la respiració cel·lular.

I per últim trobem el material genètic format per la molècula de DNA

- Nucleoide: és la zona on es localitza la major part del material genètic de la cèl·lula procariota. Aquest material genètic està format per una sola molècula de DNA circular de doble cadena que es manté ancorada en un punt de la membrana plasmàtica, concretament en el mesosoma. La molècula de DNA per enrotllar-se utilitza unes proteïnes similars a les histones que s'anomenen ADN girasa i per fer la funció contrària un enzim anomenat Topoisomerasa I.
- Plasmidi: són porcions de material genètic circular disperses pel citoplasma de la cèl·lula. Es repliquen independentment del cromosoma bacterià. Normalment aporten gens funcionals que no es troben en el cromosoma bacterià i que poden ser responsables de la resistència als antibiòtics o bé aporten alguna via

metabòlica per aprofitar determinats substrats. Els bacteris poden intercanviar-se aquests gens a través de la conjugació bacteriana.

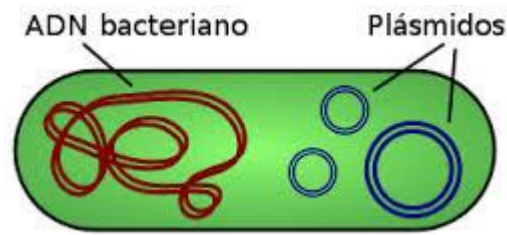


Figura 8: material genètic d'un bacteri

1.4. Metabolisme:

El metabolisme microbià és el conjunt de processos pels quals el microorganisme obtenen energia i nutrients.

Troblem diferents tipus de metabolismes en un bacteri els quals els podem classificar segons la font de energia, carboni o H^+/e^- .

FONT D'ENERGIA	TIPUS
Llum	Fotòtrof
Oxidació de compostos orgànic e inorgànics.	Quimiòtrof
FONT D' H^+/e^-	TIPUS
Molècules inorgàniques reduïdes	Litòtrof
Molècules orgàniques	Organòtrof
FONT DE CARBONI	TIPUS
CO_2	Autòtrof
Molècules orgàniques reduïdes de altres organismes	Heteròtrof

Aquestes formes de metabolitzar les fonts primàries permeten agrupar als bacteris en quatre grups:

- **Fotolitotròfic autòtrof:** són els que utilitzen llum solar com a font d'energia, CO_2 com a font de carboni i com a font de H^+ utilitzen l' H_2O (els cianobacteris) o H_2S (bactèries púrpures i verdes del sofre).
- **Fotolitotròfic heteròtrof:** són els que utilitzen llum com a font d'energia, molècules orgàniques simples com a font de carboni i com a font e^- molècules inorgàniques.
- **Quimiolitotròfic autòtrof:** són els que utilitzen compostos químics com a font d'energia, CO_2 com a font de carboni i reductors inorgànics com a font d' e^- .
- **Quimioorganotròfic heteròtrof:** són els que utilitzen compostos químics com a fonts d'energia, compostos orgànics com a font de carboni i reductors orgànics com a font d' e^- .

El metabolisme en els microorganismes també permet classificar aquests segons si necessiten oxigen o no en les seves reaccions metabòliques. Si necessiten O_2 per desenvolupar-se s'anomenen **aeròbics**, i si no necessiten O_2 en el seu metabolisme diem que són organismes **anaeròbics**, dins d'aquest grup trobem dos classes, els que no poden viure en presència d' O_2 , els anomenats **anaeròbics estrictes**, o els organismes aeròbics que en absència d' O_2 utilitzen la fermentació per desenvolupar-se s'anomenen **anaeròbics facultatius**.

1.5. Bacteris i microorganismes utilitzats en la fase experimental:

1. *Saccharomyces cerevisiae*: és un llevat, un fong unicel·lular, utilitzat en la fermentació del pa, la cervesa i el vi. En aquest treball s'ha utilitzat per veure els efectes dels antioxidants sobre els radicals lliures en cèl·lules eucariotes.

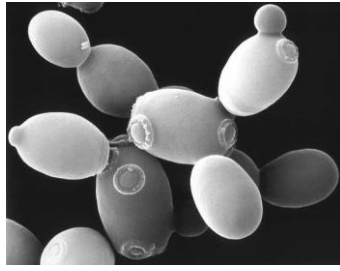


Figura 9: *Saccharomyces cerevisiae*

2. *Escherichia coli*: és un bacteri que habita en els intestins i en aigües negres, és necessari pel funcionament correcte de la digestió i a més produeix les vitamines B i K. *Escherichia coli* es un bacteri gram-negatiu amb forma de bacil, és anaeròbic facultatiu (pot fermentar la glucosa i la lactosa), no forma espores i es pot desplaçar a partir de cilis.



Figura 10: *Escherichia coli*

3. *Bacillus cereus*: és un bacteri que es pot trobar en el terra, en la pols i en les espècies i es tòxic per a les persones. *Bacillus cereus* és un bacteri gram-positiu anaeròbic facultatiu, amb forma de bacils, forma espores que són termoresistents, es desplacen a partir de flagels peritrics.

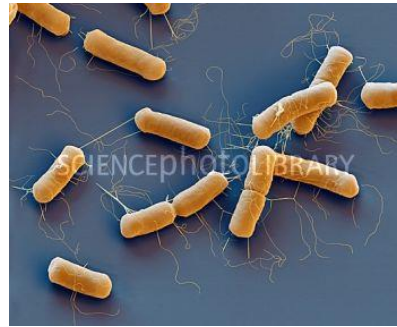


Figura 11: *Bacillus cereus*

4. *Staphylococcus aureus*: és un bacteri que es troba en la flora de la pell pot causar infeccions quan es produeixen ferides. *Staphylococcus aureus* és un bacteri gram-positiu amb la forma dels cocs (esfèrica) amb un metabolisme anaeròbic facultatiu.

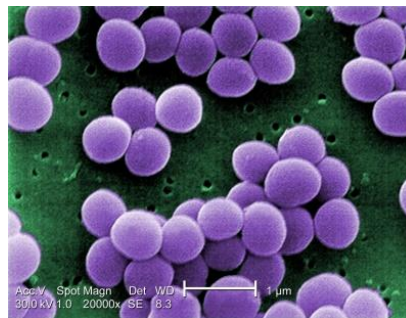


Figura 12: *Staphylococcus aureus*

5. *Micrococcus luteus*: és un bacteri Gram-positiu que es pot trobar al terra, a la pols, a l'aigua i a l'aire. És un bacteri totalment aeròbic amb una morfologia de cocs (esferes) i s'agrupa formant tètades.



Figura 13: *Micrococcus luteus*

2. ANTIBIÒTICS

2.1. Què és un antibiòtic?:

Un antibiòtic (del grec *αντί* - *anti*, "en contra" + *βιοτικός* – *biotikos*, "donat a la vida") és qualsevol substància química produïda per un ésser viu o derivat sintètic que mata o impedeix el creixement d'algunes classes de microorganismes.

2.2. Història dels antibiòtics:

El primer antibiòtic en descobrir-se va ser la penicil·lina per Ernest Duchesne l'any 1897 però el seu treball no va rebre atenció per part de la comunitat científica. Posteriorment a l'any 1909 a Alemanya Paul Ehrlich va desenvolupar l'antibiòtic de curt espectre Salvarsan. Posteriorment a Gran Bretanya, Alexander Fleming, per la contaminació d'una de les seves plaques de petri va observar com al voltant del fong el bacteri *Staphylococcus aureus* no creixia i el líquid que envoltava al fong (que era del gènere *Penicillium*) el va denominar penicil·lina. La penicil·lina es va aconseguir purificar l'any 1940 gràcies a un grup liderat per Howard Florey.

2.3. Funcionament dels antibiòtics:

Els antibiòtics actuen sobre els bacteris de maneres molt diverses i en diferents parts del microorganisme.

Una de les zones més atacades pels antibiòtics és la paret cel·lular, que també es l'òrganul que s'encarrega de protegir la cèl·lula, els antibiòtics que ataquen a la paret ho fan bloquejant la síntesi, l'exportació, l'organització o la formació de la paret cel·lular, específicament en els enllaços del peptidoglicà (principal component de la paret cel·lular), fent que aquesta es debiliti i per pressió osmòtica rebenti el bacteri, es a dir, es produeixi la lisi cel·lular.

Els antibiòtics també poden atacar a la membrana plasmàtica inhibint la síntesi dels elements que la componen provocant que perdi la capacitat de la permeabilitat selectiva fent que alguns elements tòxics puguin entrar a la cèl·lula.

Una altra part a la que ataquen els antibiòtics és als àcids nucleics (ADN i ARN), anul·lant la seva síntesi.

Els antibiòtics també poden actuar inhibint el funcionament dels ribosomes, és a dir, impedeixen la formació de proteïnes. Els ribosomes procariotes són vulnerables a alguns antibiòtics però en canvi no afecten als ribosomes eucariotes.

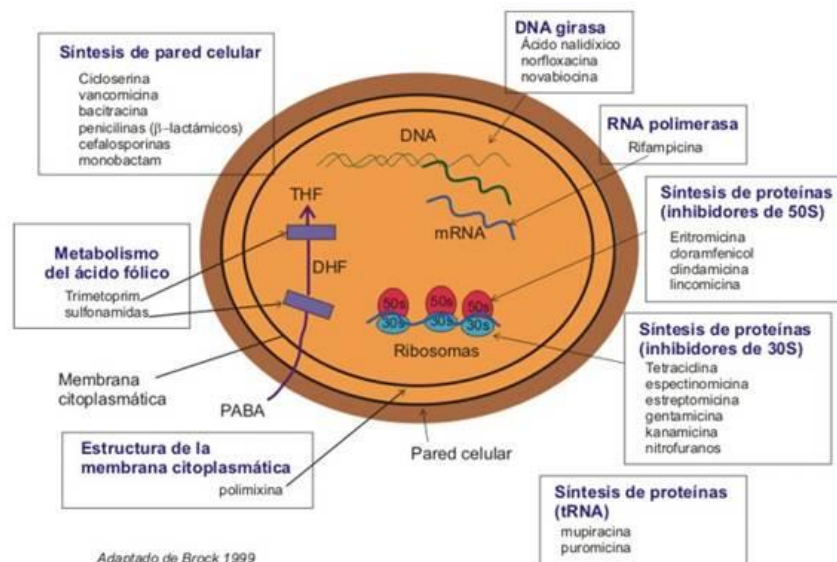


Figura 14: zones d'acció de antibiòtics

2.4. Classificació dels antibiòtics

Els antibiòtics es poden classificar de 5 maneres distintes: segons el seu origen, la seva estructura química, la seva activitat sobre microorganismes, el seu espectre d'acció i el seu mecanisme d'acció.

Si classifiquem els antibiòtics segons el seu origen trobem tres grups. En el primer grup formen part els **antibiòtics naturals** que són qualsevol substància produïda pel

metabolisme d'un ésser viu, principalment fongs, amb la habilitat d'inhibir el creixement o destruir microorganismes. El segon grup està format pels **antibiòtics semisintètics** que són productes naturals amb certes modificacions en la seva estructura química que permeten una millora en les seves propietats fisicoquímiques i farmacològiques. I per últim els **antibiòtics sintètics** que són aquelles substàncies produïdes artificialment que posseeixen la propietat d'inhibir el creixement o destruir microorganismes.

També podríem classificar els antibiòtics segons la seva manera d'actuar, es a dir com afecten als bacteris. Segons aquesta classificació trobem tres grans grups que són: els **bacteriostàtics**, són aquells que inhibeixen el creixement bacterià, els **bactericides**, són els que produeixen la mort sense necessitat de lisi, i els **bacteriolítics**, que són els que generen la mort a partir de la lisi cel·lular. En la figura 13 veiem com actuen respecte en un gràfic. En el primer gràfic veiem com actua un antibiòtic bacteriostàtic a mesura que avança el temps, el que s'observa és que en el moment en que es posa l'antibiòtic (fletxa) els bacteris deixen de reproduir-se encara que segueixen estant vius. El segon gràfic explica com actua un antibiòtic bactericida i el que s'observa és que quan es fica l'antibiòtic el total de bacteris no disminueix mentre que el nombre de bacteris viables disminueix fins a 0. El tercer i últim gràfic veiem que quan s'aplica l'antibiòtic bacteriolític disminueix tant el nombre total de bacteris com el nombre de bacteris viables.

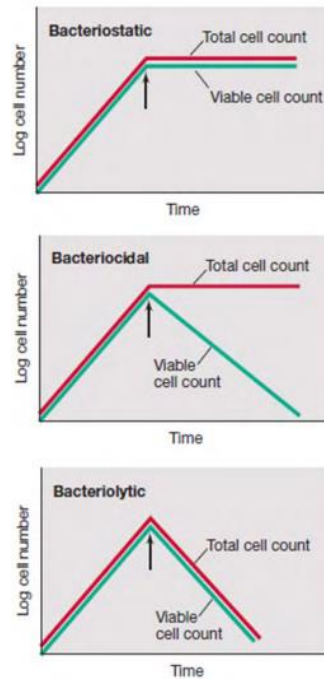


Figura 15: forma actuar antibiòtics

Els antibiòtics també es classifiquen segons el seu espectre d'acció on trobem dos grans grups els **antibiòtics d'ampli espectre** (com la penicilina) que són aquells que presenten activitat enfront la majoria dels grups bacterians d'importància clínica i els **antibiòtics d'espectre reduït** (com la vancomicina) que són els que tan sols afecten a un grup determinat de bacteris.

Una altra possibilitat és la de classificar-los segons la seva estructura química:

- **β-lactàmic**: és un grup d'antibiòtics que agrupa totes les penicil·lines, les cefalosporines, els carbacefem, els carbapenems i qualsevol agent antibiòtic que contingui un anell de β-lactàmic. Aquests tipus d'antibiòtic actua de manera bacteriolítica inhibint la síntesi de la barrera de peptidoglicà de la paret cel·lular. La penicil·lina pertany a aquest grup d'antibiòtics.

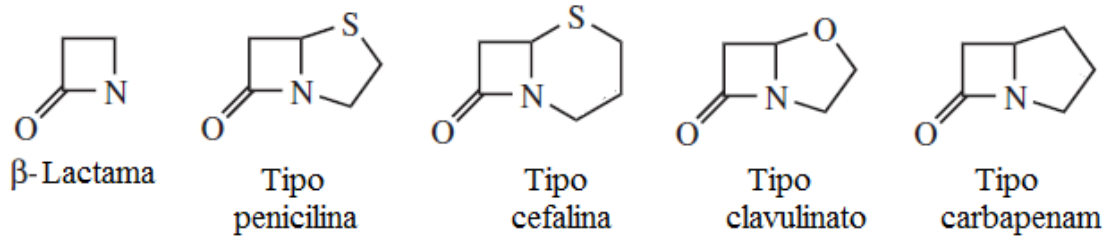


Figura 16: tipus de β -lactàmics

- **Aminoglicòsid**: és un grup d'antibiòtics que funcionen com a bacteriostàtics alterant la formació correcta de proteïnes a l'actuar sobre els ribosomes. Els principals antibiòtics d'aquest grup són l'estreptomicina, la gentamicina, la tobramicina, la netilmicina, la kanamicina i la amikacina.

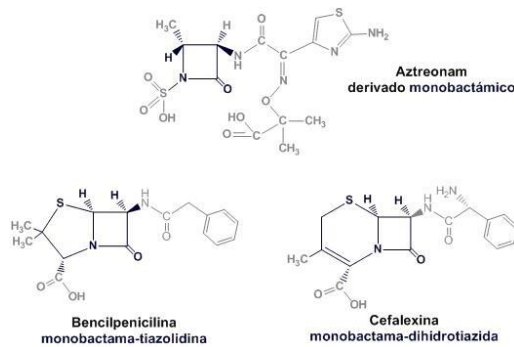


Figura 17: tipus d'aminoglicòsids

- **Glicopèptid**: és un grup d'antibiòtics bactericides que resulten més eficaços contra els bacteris gram-positius i actuen inhibint la síntesi de la paret cel·lular. Uns exemples d'aquest grup són vancomicina, teicoplanina, ramoplanina, daptomicina.

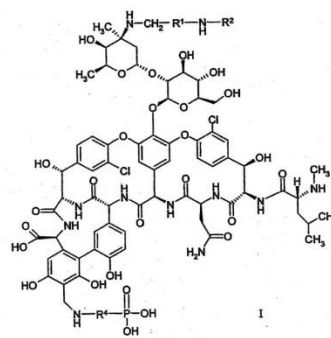


Figura 18: Glicopèptid

- **Lincosamida**: és un grup d'antibiòtics que depenen de la seva concentració actua com a bactericida o com a bacteriostàtic. El seu mecanisme d'acció consisteix en inhibir la síntesi de proteïnes al unir-se amb el ribosoma en la part 50s. Encara que és similar als macròlids tan en estructura com en el mecanisme d'acció, les lincosamides tenen un espectre més ampli. A causa de la seva toxicitat, actualment, tan sols s'utilitzen en pacients amb al·lèrgia a la penicil·lina. Exemples: licomicina, clindamicina.

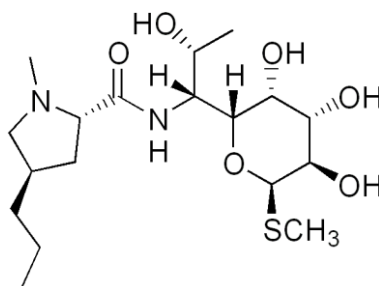


Figura 19: Lincosamida

- **Macròlid**: és un grup d'antibiòtics que es caracteritza per tenir un anell macrocíclic de lactona. Aquest grup es caracteritza per ser més eficaç contra els bacteris gram-positius, encara que hi ha un antibiòtic d'aquest grup que també és eficaç contra els gram-negatius. Actuen inhibint la síntesi proteica alterant l'estructura dels ribosomes (s'enganxen a la posició 50s dels ribosomes).

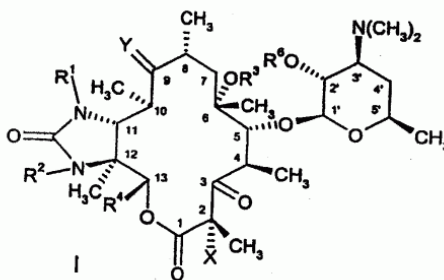


Figura 20: Macròlid

- **Quinolina**: és un grup d'antibiòtics d'ampli espectre i bacteriostàtic, és a dir, impedeix la reproducció i aquest fet ho aconsegueix bloquejant la subunitat A del

DNA girasa bacterià (estabilitza la cadena de DNA una vegada s'ha separat). El grup més important són les fluroquinolines.

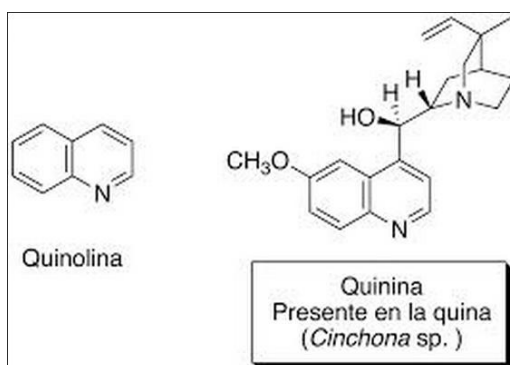


Figura 21: Quinolina i quinina

- **Tetraciclina**: són un grup d'antibiòtics naturals i semisintètics amb un ampli espectre d'acció que generalment actuen com a bacteriostàtics però amb dosis molt altes actuen com a bactericides a causa de la seva toxicitat, i afecten principalment a bacteris gram-positius. La seva manera d'actuar consisteix en inhibir la producció de proteïnes, alterant l'estructura dels ribosomes.

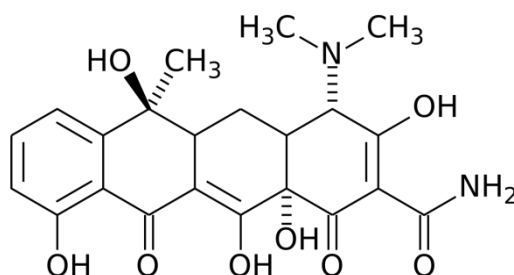


Figura 22: Tetraciclina

I l'últim tipus de classificació dels antibiòtics es basa en els blancs d'acció que són:

- 1) **Inhibidors de la paret bacteriana**
- 2) **Inhibidors de les betalactamases**
- 3) **Inhibidors de la síntesi de proteïnes**
- 4) **Inhibidors de la síntesi d'àcids nucleics**

2.5. Antibiòtics utilitzats en la fase experimental:

La **gentamicina** és una ampicil·lina d'ampli espectre que afecta a bacteris gram-negatius aeròbics com la *Escherichia coli* i alguns bacteris gram-positius com *Bacillus cereus* o els *Staphylococcus* (com el *Staphilococcus aureus*). El seu mecanisme d'acció consisteix en interferir en la síntesi correcta de proteïnes, això és possible gracies a dos fases, la primera consisteix en la entrada de la gentamicina al bacteri que ve determinada per la capacitat d'absorció de la membrana, i la segona fase consisteix en la unió del antibiòtic amb la subunitat 30s del ribosoma bacterià.

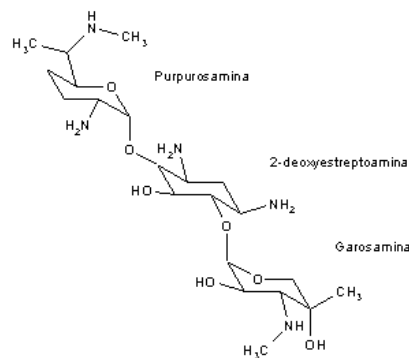


Figura 23: Gentamicina $C_{21}H_{43}N_5O_7$

La **ampicil·lina** és un antibiòtic β -lactàmic semblant a la penicil·lina. També és un antibiòtic d'ampli espectre que sobre tot actua sobre els bacteris gram-positius encara que també fa efecte sobre els bacteris gram-negatius. Funciona com un bactericida gracies a que inhibeix la producció de la paret cel·lular durant la replicació impeding la formació de ponts de peptidoglicà.

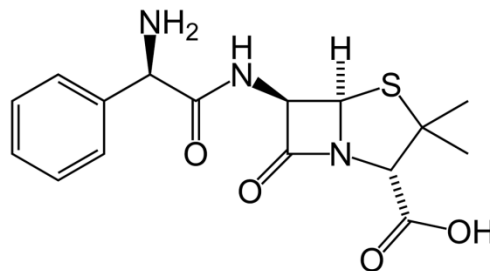


Figura 24: Ampicilina $C_{16}H_{18}N_3O_4S$

3. RADICALS LLIURES I ESPÈCIES REACTIVES D'OXIGEN

3.1. Què és una espècie reactiva d'oxigen (ROS)?:

Un cas especial de radicals lliures són les espècies reactives d'oxigen.

Les espècies reactives d'oxigen són molècules amb oxigen, molt reactives a causa que a l'últim orbital tenen un electró no aparellat (radical lliure), la qual cosa genera una gran inestabilitat física.

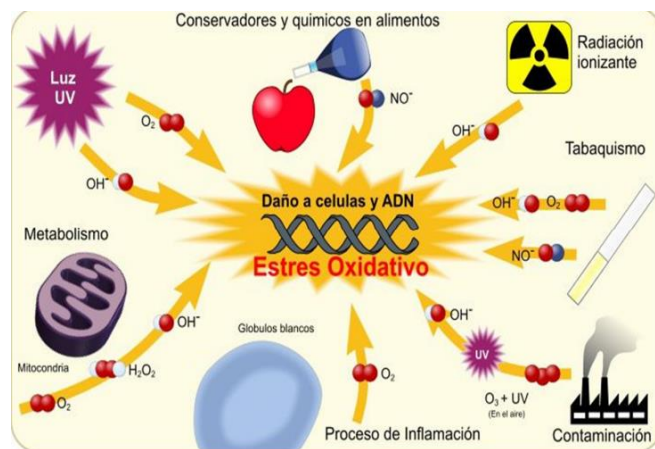


Figura 25: procedència de ROS

Les espècies reactives d'oxigen participen en processos fisiològics de l'organisme i a la vegada són residus d'aquests processos. Quan aquestes espècies reactives d'oxigen superen els mecanismes d'inactivació es diu que la cèl·lula té un estat metabòlic d'estrès oxidatiu que es caracteritza per danys moleculars i cel·lulars que poden provocar diverses malalties cròniques-degeneratives.

Les espècies reactives d'oxigen es produeixen en la respiració de les nostres cèl·lules, en el sistema immunològic, en el reticle endoplasmàtic i en l'enzim xantina DHS-a, però també es generen per causes externes com la contaminació ambiental, el tabaquisme, les dietes riques en lípids, l'exposició excessiva a radiacions solars, la ingesta d'olis

vegetals no refinats (que contenen radicals lliures a causa de la seva exposició a altes temperatures), l'estrès, etc.

Especies reactivas d'oxigen			
Radicals lliures		No radicals	
Hidròxid	OH·	Peròxids orgànics	ROOH
Peròxid	ROO·	Oxigen	O ₂
Hidroperòxid	HOO·	Peròxid d'hidrogen	H ₂ O ₂
Superòxid	O ₂ ·	Àcid hipoclorós	HClO
Òxid nítric	NO·	Àcid nítrós	HNO ₂
Alcòxid	RO·	Peròxid nitrit	ONOO·
Diòxid de nitrogen	NO ₂ ·	Ozó	O ₃

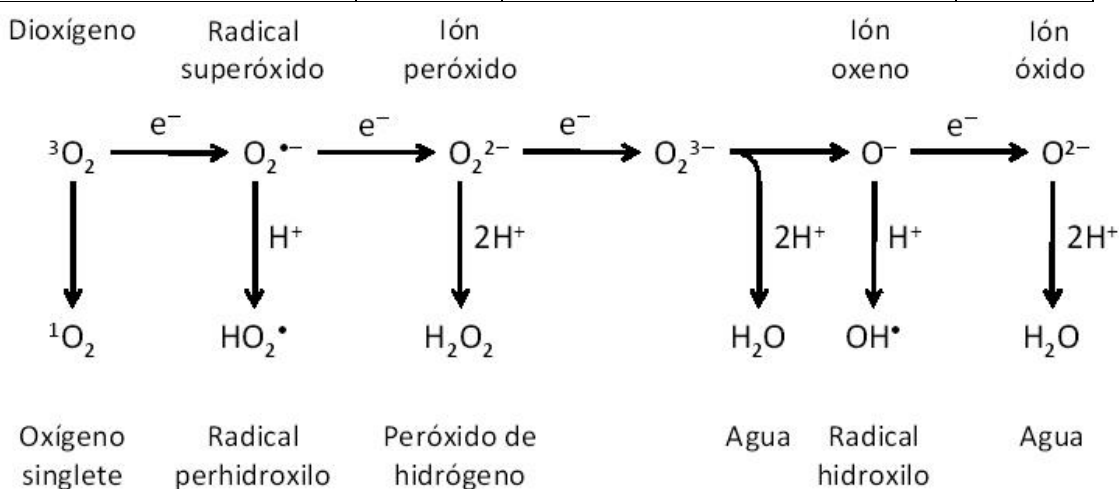


Figura 26: formació de radicals lliures

La idea que els antibiòtics ataquen les cèl·lules bacterianes utilitzant un únic mecanisme d'acció que consisteix en generar compostos ROS, és una teoria bastant acceptada, tot i que l'equip de Kim Lewis² l'ha aconseguit desestimar. Aquest equip ha realitzat uns estudis en els quals no han trobat cap correlació entre les possibilitats de

² Annex-4

supervivència d'una cèl·lula bacteriana en presència d'antibiòtics i el seu nivell d'espècies reactives.

Aquest fet és el que s'ha volgut provar en la part experimental d'aquest treball. Si realment els antibiòtics produeixen espècies reactives, la presència d'antioxidants podria reduir l'efecte dels antibiòtics. Un dels procediments que s'ha dissenyat en la part experimental ha sigut la de la tinció fluorescent de les espècies reactives d'oxigen en llevats per saber si realment els antioxidants redueixen l'estrès oxidatiu de la cèl·lula, es a dir el nivell de radicals lliures o ROS. La utilització de bacteris en aquesta pràctica no ha sigut possible ja que el protocol sols es aplicable als llevats.

4. ANTIOXIDANTS

4.1. Què és un antioxidant?:

Un antioxidant és qualsevol substància química capaç de neutralitzar els radicals lliures, aquests són radicals químics, àtoms, molècules o ions amb electrons desaparellats, molt reactius, que produeixen reaccions en cadena d'oxidació de molècules com ara l'ADN, les proteïnes, els lípids,... Per tant podríem dir que un antioxidant, com bé diu el seu nom, impedeix les reaccions d'oxidació.



Figura 27: nivells de defensa antioxidant

4.2. Funcionament dels antioxidants:

La seva manera d'actuar és simple, cedeix un electró i el radical lliure de les espècies reactives d'oxigen es torna neutre.

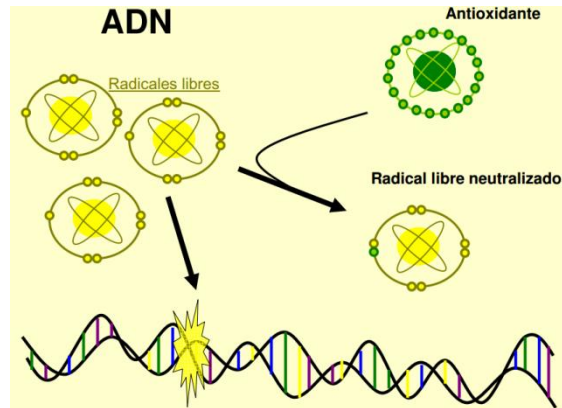


Figura 28: funcionament antioxidants

4.3. Classificació dels antioxidants:

Existeixen diverses classes d'antioxidants que els podem classificar segons la seva procedència o segons la seva estructura química.

Si classifiquem els antioxidants segons la seva estructura química trobem 4 grans grups que són els enzims, els antioxidants d'alt pes molecular, els antioxidants de baix pes molecular i algunes hormones.

En canvi si els distingim utilitzant la seva procedència en trobem dos tipus els exògens, és a dir, que provenen de l'exterior com les vitamines o alguns metalls, i els endògens que els fabrica el propi cos com els enzims.

4.4. Relació antioxidant-radical lliure:

En el cas dels antioxidants endògens trobem quatre enzims importants que són: el superòxid dismutasa (SOD) que neutralitza el radical superòxid transformant-lo en

ELS ANTIOXIDANTS TENEN UN COSTAT FOSC?

peròxid d'hidrogen, la catalasa (CAT) que fa reaccionar el peròxid d'hidrogen en oxigen més aigua, això ho fa utilitzant com cofactor un grup hemo i el manganès i per últim trobem el glutatió peroxidasa (gsh-px) i la transferasa (gst) que la seva funció consisteix en protegir l'organisme de l'aigua oxigenada i compostos inestables, el glutatió peroxidasa ho aconsegueix gràcies a un cofactor de seleni.

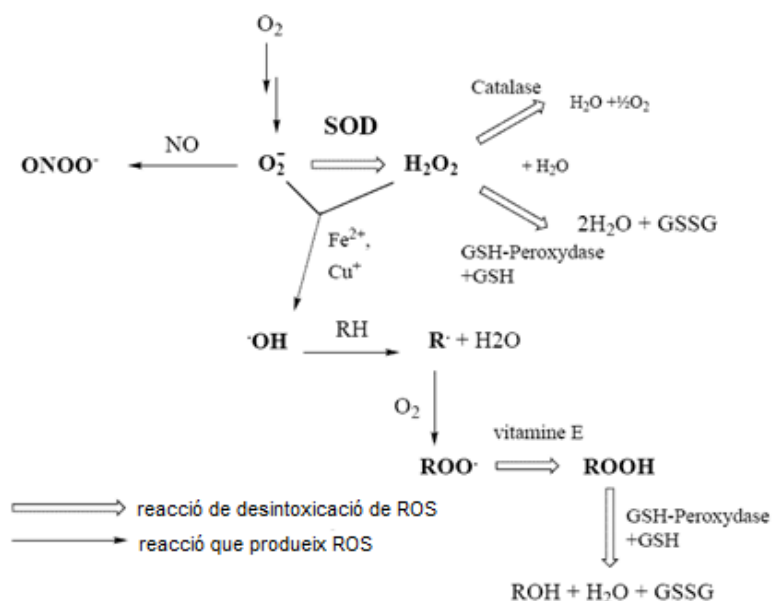


Figura 29: reaccions antioxidants

Mecanismos enzimáticos:

a) Superóxido dismutasa:



b) Catalasa:



c) Peroxidasas:



Figura 30: reaccions antioxidants

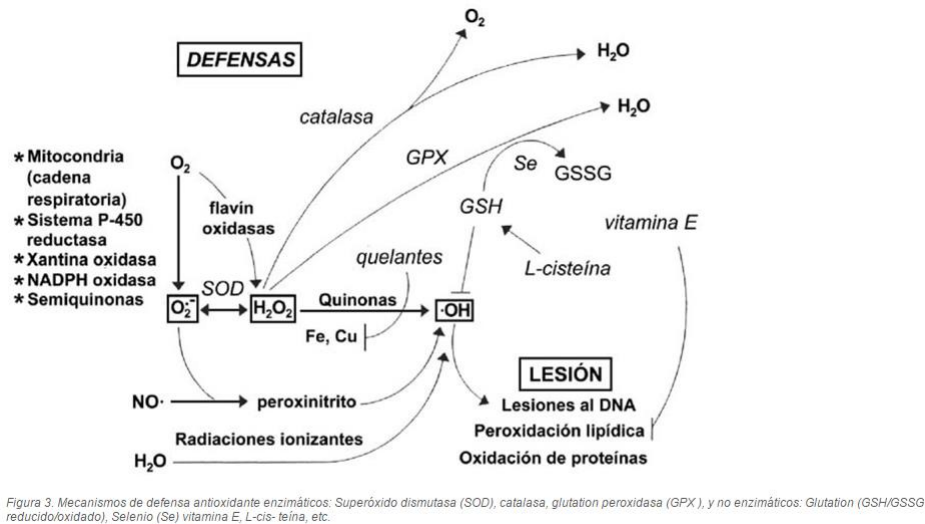


Figura 31: reaccions antioxidants

Per altra banda els antioxidants exògens actuen de maneres diferents.

- La vitamina E o α -tocoferol és un potent antioxidant que tan sols actua amb els radicals lliures liposolubles. Actua juntament amb la CAT i el SOD per neutralitzar els radicals d'hidroxil, anions de superòxid i el peròxid d'hidrogen. El podem trobar en aliments, com les hortalisses, les verdures, alguns olis, arròs integral, etc.



Figura 32: obtenció de vitamina E

- La vitamina C o àcid ascòrbic és un potent antioxidant hidrosoluble molt eficaç contra l'oxidació dels lípids. Aquesta vitamina té dues funcions, una d'aquestes consisteix en regenerar la vitamina E i l'altra en neutralitzar els radicals d'hidroxil, els anions de superòxid i l'oxigen singlet. El seu funcionament es basa

en neutralitzar els radicals lliures transformant-se en un radical ascòrbic que ràpidament es descompon en àcid ascòrbic i àcid deshidroascòrbic. El trobem en cítrics, com la taronja, en les bledes, en els tomaques, etc.



Figura 33: obtenció de la vitamina C

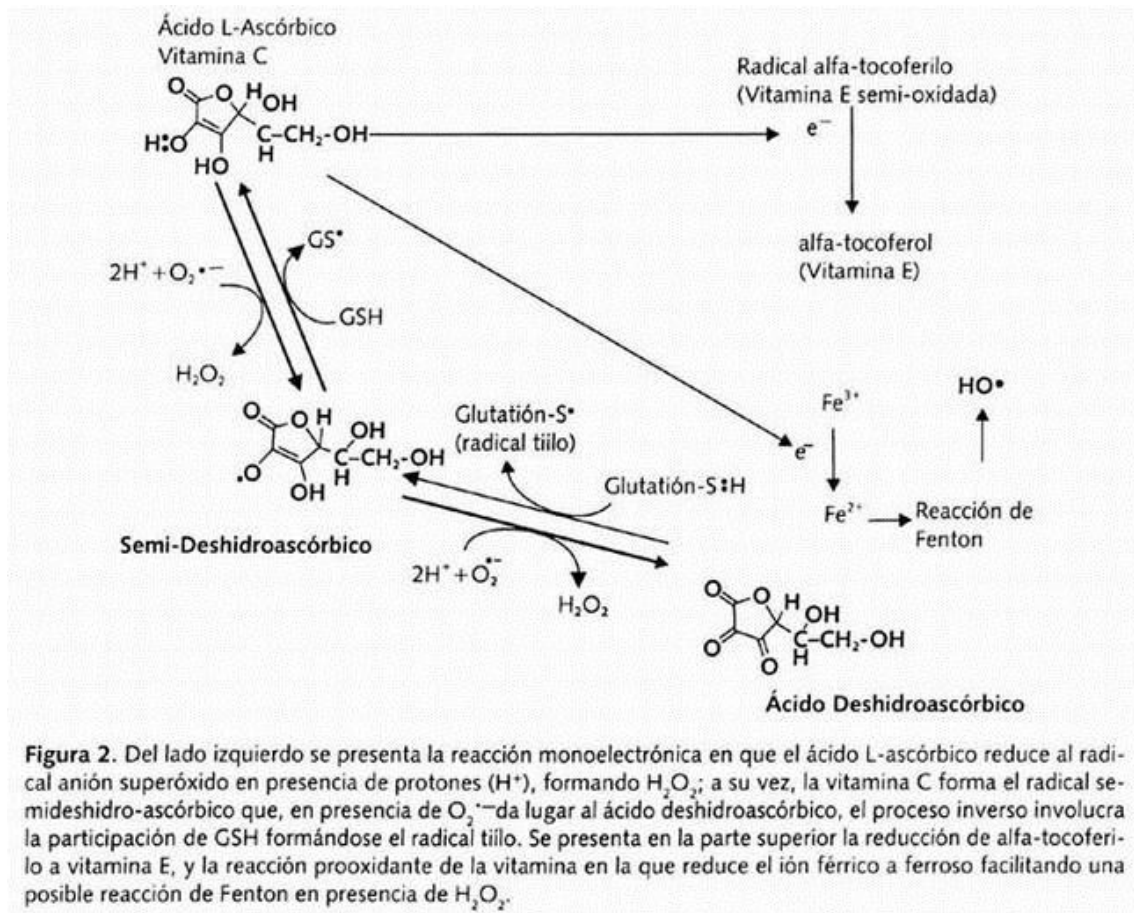


Figura 2. Del lado izquierdo se presenta la reacción monoelectrónica en que el ácido L-ascórbico reduce al radical anión superóxido en presencia de protones (H^+), formando H_2O_2 ; a su vez, la vitamina C forma el radical semideshidro-ascórbico que, en presencia de $O_2^{\bullet-}$ da lugar al ácido deshidroascórbico, el proceso inverso involucra la participación de GSH formándose el radical tiilo. Se presenta en la parte superior la reducción de alfa-tocoferilo a vitamina E, y la reacción prooxidante de la vitamina en la que reduce el ión férrico a ferroso facilitando una posible reacción de Fenton en presencia de H_2O_2 .

Figura 34: acció de la vitamina C

- La provitamina A o β -carotè és el carotenoide més abundant de la natura que a l'ingerir-se es transforma en vitamina A, aquesta protegeix l'ADN de les

mutacions que provoquen els radicals lliures, com l'oxigen singlet. Es pot trobar en els pigments vegetals de coloració groga o taronja.



Figura 35: obtenció de vitamina A/ β -carotè

- Els oligoelements són els elements indispensables en la vida però que es troben en quantitats al voltant del 0,5%. D'aquests elements tenen una funció antioxidant el Zn, el Mn, el Cu, el Se i el Fe. El Zn, el Mn i el Cu actuen sobre l'enzim SOD per poder eliminar els radicals de hidroxil, l'enzim GSH-Px per fer la seva funció necessita Se, i l'enzim CAT necessita Fe.



Figura 36: oligoelements

4.5. Antioxidants utilitzats en la fase experimental:

- Càpsules de vitamina E: són unes càpsules grogues de 200 mg que contenen vitamina E (acetat de dl- α -tocoferol), principalment, glicerol (E-422), tartazina (E-102) entre altres.
- Móres

Moras, crudas	
Valor nutricional por cada 100 g	
Energía 50 kcal 220 kJ	
Carbohidratos	11.94 g
• Azúcares	4.42 g
• Fibra alimentaria	6.5 g
Grasas	0.65 g
Proteínas	1.2 g
Tiamina (vit. B ₁)	0.032 mg (2%)
Riboflavina (vit. B ₂)	0.038 mg (3%)
Niacina (vit. B ₃)	0.598 mg (4%)
Ácido pantoténico (vit. B ₅)	0.329 mg (7%)
Vitamina B ₆	0.055 mg (4%)
Ácido fólico (vit. B ₉)	21 µg (5%)
Vitamina C	26.2 mg (44%)
Vitamina E	0.87 mg (6%)
Vitamina K	7.8 µg (7%)
Calcio	25 mg (3%)
Hierro	0.69 mg (6%)
Magnesio	22 mg (6%)
Manganeso	0.67 mg (34%)
Fósforo	29 mg (4%)
Potasio	151 mg (3%)
Sodio	1 mg (0%)
Zinc	0.42 mg (4%)
% CDR diaria para adultos.	
Fuente: Moras, crudas en la base de datos de nutrientes de USDA.	

Antioxidant

- Mandarina

Energía 50 kcal 220 kJ		Antioxidant
Carbohidratos	13.34 g	
• Azúcares	10.58 g	
• Fibra alimentaria	1.18 g	
Grasas	0.31 g	
• saturadas	0.039 g	
• trans	0.00 g	
• monoinsaturadas	0.06 g	
• poliinsaturadas	0.065 g	
Proteínas	0.81 g	
Agua	85.17 g	
Retinol (vit. A)	34 µg (4%)	
Tiamina (vit. B ₁)	0.058 mg (4%)	
Riboflavina (vit. B ₂)	0.036 mg (2%)	
Niacina (vit. B ₃)	0.376 mg (3%)	
Vitamina B ₆	0.078 mg (6%)	
Ácido fólico (vit. B ₉)	16 µg (4%)	
Vitamina B ₁₂	0 µg (0%)	
Vitamina C	26.7 mg (45%)	
Vitamina D	0 µg (0%)	
Vitamina E	0.2 mg (1%)	
Vitamina K	0 µg (0%)	
Calcio	37 mg (4%)	
Hierro	0.15 mg (1%)	
Magnesio	12 mg (3%)	
Fósforo	20 mg (3%)	
Potasio	166 mg (4%)	
Sodio	2 mg (0%)	
Zinc	0.07 mg (1%)	
% CDR diaria para adultos.		
Fuente: Mandarina comercial en la base de datos de nutrientes de USDA.		

Tomàquet

Valor nutricional por cada 100 g	
Energía 20 kcal 70 kJ	
Carbohidratos	3.9 g
• Azúcares	2.6 g
• Fibra alimentaria	1.2 g
Grasas	0.2 g
Proteínas	0.9 g
Agua	94.5 g
Retinol (vit. A)	42 µg (5%)
• β-caroteno	449 µg (4%)
Tiamina (vit. B ₁)	0.037 mg (3%)
Niacina (vit. B ₃)	0.594 mg (4%)
Vitamina B ₆	0.08 mg (6%)
Vitamina C	14 mg (23%)
Vitamina E	0.54 mg (4%)
Vitamina K	7.9 µg (8%)
Magnesio	11 mg (3%)
Manganeso	0.114 mg (6%)
Fósforo	24 mg (3%)
Potasio	237 mg (5%)
% CDR diaria para adultos.	
Fuente: Tomate rojo, crudo en la base de datos de nutrientes de USDA .	

Antioxidant

- Suc de taronja

Valor nutricional por cada 100 g (c. sinensis)	
Energía 50 kcal 200 kJ	
Carbohidratos	11,75 g
• Azúcares	9,35 g
• Fibra alimentaria	2,4 g
Grasas	0,12 g
• saturadas	0,015 g
• monoinsaturadas	0,023 g
• poliinsaturadas	0,025 g
Proteínas	0,94 g
Agua	86,75 g
Retinol (vit. A)	11 µg (1%)
• β-caroteno	71 µg (1%)
Tiamina (vit. B ₁)	0.087 mg (7%)
Riboflavina (vit. B ₂)	0.040 mg (3%)
Niacina (vit. B ₃)	0.282 mg (2%)
Ácido pantoténico (vit. B ₅)	0.250 mg (5%)
Vitamina B ₆	0.060 mg (5%)
Ácido fólico (vit. B ₉)	30 µg (8%)
Vitamina B ₁₂	0 µg (0%)
Vitamina C	53.2 mg (89%)
Vitamina D	0 µg (0%)
Vitamina E	0.18 mg (1%)
Vitamina K	0 µg (0%)
Calcio	40 mg (4%)
Hierro	0.10 mg (1%)
Magnesio	10 mg (3%)
Manganeso	0.025 mg (1%)
Fósforo	14 mg (2%)
Potasio	181 mg (4%)
Sodio	0 mg (0%)
Zinc	0.07 mg (1%)
% CDR diaria para adultos.	
Fuente: Naranja en la base de datos de nutrientes de USDA.	

Antioxidant

TREBALL EXPERIMENTAL

1. Introducció

L'objectiu d'aquesta recerca es comprovar si els antioxidants poden reduir l'efecte dels antibiòtics. La lectura d'uns articles científics sobre l'acció dels antibiòtics³ van ser el motiu que va provocar l'inici d'aquesta recerca. En aquests articles es proposa la idea que l'acció dels antibiòtics pot suposar la formació de radicals lliures generant un estrès cel·lular. Aquest estrès cel·lular provoca desequilibris metabòlics als bacteris inhibint el seu creixement o bé produint una lisi cel·lular.

Com sabem la presència dels antioxidants contraresta l'efecte nociu dels radicals lliures, concretament el ROS (espècies reactives d'oxigen). Per tant, la meua hipòtesi és que, si els antibiòtics generen radicals lliures, la presència d'antioxidants potser reduirà l'efecte d'aquest antibiòtic i per tant reduïrem el seu efecte bactericida.

2. Material

Material i equipament	Micropipeta, punta esterilitzada, capsula petri, bunsen, nansa de Digralsky, estufa/forn, autoclau o olla a pressió, proveta, vas de precipitats, diari, cotó, gasa esterilitzada, paper d'alumini, matràs Erlenmeyer, pipeta Pasteur, tubs d'assaig, morter, reixeta
Reactius i material d'estudi	Mores, vitamina E, suc de taronja, tomàquet, mandarina, agar, Ypd, <i>Sacharomyces cerevisial</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Straphilococcus aureus</i> , ampicil·lina, gentamicina, zymoliasa, etanol, aigua destil·lada, dihidroetidum d'heli

³ Annex-1-2-3-4

3. Procediment

Per portar a terme la recerca s'han seguit diferents etapes. En primer lloc ha estat necessari una fase de preparació del material, que ha consistit en l'esterilització del mateix, la preparació del medi de cultiu (sòlid i líquid) i de les plaques de cultiu i finalment l'obtenció dels bacteris. La següent fase ha consistit en realitzar els antibiogrames per conèixer quin es l'antibiòtic més efectiu, a continuació, s'ha provocat la presència de ROS i la seva neutralització amb antioxidants. En una tercera i última fase s'han incubat els bacteris amb l'antibiòtic més efectiu i amb diferents antioxidants.

3.1. ESTERILITZACIÓ DE MATERIAL

L'esterilització és un procés que consisteix en eliminar tots els éssers vius viables, és a dir que puguin créixer i reproduir-se. És una tècnica emprada sobretot en els àmbits de la biologia però també en altres ciències com la química.

Per aconseguir que un material estigui esterilitzat primer es neteja amb sabó tot el material que contindrà les mostres, com els tubs d'assaig o les plaques de petri.

Aquesta esterilització es pot realitzar amb l'autoclau o en el seu defecte amb una olla a pressió. En cas de l'olla a pressió s'ha de fer una doble esterilització, primer a l'olla i després a l'estufa. S'afegeixen dos dits d'aigua a l'olla i es col·loca una reixeta amb el material que es vol esterilitzar. Es tanca l'olla i es col·loca al foc on es deixarà bullir durant uns 30 minuts.

Passat aquest temps es treu el material de l'olla. En el cas dels tubs d'assaig es tapen amb cotó i s'emboiquen amb paper de diari. Les plaques de petri es col·loquen una sobre l'altra de manera que la part interna quedi aïllada i s'emboiquen amb paper de diari.

Es col·loca el material embolicat a l'estufa durant uns 45 minuts a 100-120°C. Passat aquest temps es treu i es deixa que es refredi. Si no es destapa es pot conservar el material estèril durant uns mesos.

3.2. PREPARACIÓ DEL MEDI DE CULTIU

- Medi de cultiu sòlid

Es dissolen en un vas de precipitats 20 g d'agar en 500mL d'aigua destil·lada. A continuació es reparteix l'agar preparat en diferents erlenmeyers, es tapen amb cotó i una gasa esterilitzada embolicant la part de dalt amb paper d'alumini.

Es fiquen dos dits d'aigua en una olla a pressió, preferentment destil·lada, i s'introdueixen els erlenmeyers durant uns 40 minuts. Passat aquest temps es treuen els erlenmeyers i es deixen refredar durant 5 minuts.

Per tenir un entorn estèril es treballa dins una campana extractora i a prop d'un fogonet d'alcohol o un bunsen.

A continuació es reparteix la preparació d'agar en diferents plaques de petri estèrils, es deix que es refredin i quan l'agar s'ha solidificat es deixa a l'estufa a uns 35-37°C durant unes 48h per comprovar que no s'hagin contaminat.

Una vegada ha passat aquest temps les plaques ja estan llestes per a fer créixer el bacteri desitjat.

- Medi de cultiu líquid

Una vegada esterilitzat el material es pesen a la balança 9 g de TBS⁴ i es dissolen en 500mL d'aigua destil·lada. La dissolució així preparada es posa a l'autoclau o a l'olla

⁴ TBS- és un medi nutritiu que afavoreix el creixement d'una àmplia varietat de microorganismes.

expres durant 30 minuts. Es col·loca la solució en els tubs d'assaig tapant-los amb cotó i una gasa esterilitzada i finalment paper d'alumini per fora.

3.3. OBTENCIÓ DE BACTERIS

S'han utilitzat bacteris de la nostra pell, de la ma d'alguns alumnes i bacteris que creixen en diferents baranes de l'institut. Per extreure la mostra s'agafa cotó i es passa per damunt del material. Cotó o dits es freguen per damunt de l'agar i es posa a l'estufa a 36°C. Al cap de dos dies han crescut les colònies on es recolliran bacteris per posar-los en el medi de cultiu líquid i es torna a ficar a l'estufa a la mateixa temperatura.

3.4. ELABORACIÓ DELS ANTIBIOGRAMES

Una vegada obtinguda la dissolució concentrada de bacteris s'agafen amb una micropipeta 400µL i es fiquen a la capsula petri. Tot seguit s'agafa la nansa de Digrafsky prèviament esterilitzada amb etanol i foc, i deixant-la refredar s'utilitza per escampar la solució de bacteris per tota la superfície de l'agar.



Figura 37: fent la sembra

Amb la part més ampla d'una punta esterilitzada es fan tres forats a l'agar de manera que quedin suficientment separats per evitar que les zones d'influència dels antibiòtics es fusionin. Tot seguit s'escriu una lletra a la part posterior de la capsula per identificar el que es fica a cada forat. A continuació amb la micropipeta s'agafen 40 µL de

cadascun dels antibiòtics: gentamicina, ampicil·lina i l'enzim zymoliasa⁵, i es col·loquen al forat corresponent. Per últim es fiquen les càpsules de petri a l'estufa durant uns 2 o 3 dies a una temperatura de 36°C.

3.5. VALORACIÓ DE LA PRESENCIA DE ROS AMB LA TINCIÓ D'UN REACTIU FLUORESCENT

Aquesta valoració es va fer a la URV amb la supervisió i l'ajut de la Dra. Anna Borrull. Ella em va explicar que el procediment d'aquesta pràctica es exclusiu per a llevats, raó per la qual no s'ha pogut fer amb bacteris i antibiòtics. Per a realitzar aquest procediment s'ha utilitzat el llevat *Sacharomyces cerevisial*.

En aquesta prova el que es pretén comprovar és si realment, com diu la teoria, els antioxidants redueixen la presència de radicals lliures, és a dir, d'espècies reactives d'oxigen.

Afegint etanol al llevat es produeixen radicals lliures, ja que l'alcohol estressa les cèl·lules del llevat. Amb l'ajut d'un tint anomenat dihidroetidum d'heli que marca l'oxigen de l'etanol es podrà veure si la cèl·lula de llevat genera radicals lliures, aquest fet es posarà en evidència mirant la mostra en un microscopi capaç de veure la fluorescència.

Per poder respondre a la pregunta formulada anteriorment s'han preparat quatre mostres. S'agafa el medi de cultiu *Sacharomyces cerevisiae* que ha estat en agitació tot un matí i es reparteix en quatre tubs d'assaig. Cadascun dels tubs d'assaig portarà unes condicions diferents:

⁵ S'ha utilitzat amb la intenció de saber si té un efecte bactericida ja que la seva forma d'actuar consisteix en dissoldre la paret cel·lular.

- cultiu de control (3ml Ypd⁶ + 1ml llevat)
- medi amb antioxidant (3ml Ypd + 1ml llevat + 1ml vitamina C)
- medi amb oxidant (3ml Ypd + 1ml llevat + 1ml etanol)
- medi amb oxidant i antioxidant (3ml Ypd + 1ml llevat + 1ml etanol + 1ml vitamina C)

Es centrifuguen a 7800 rpm durant 3 minuts. S'extreu el líquid resultant amb una succionadora, i es fica el tint dihidroetidum d'heli, i es deix reposar durant uns 3 minuts. A continuació es torna a centrifugar per extreure l'excés de tint. Es fiquen les cèl·lules tenyides a un portaobjectes i es tapa amb un cobreobjectes. A continuació s'observen al microscopi (capaç de veure la fluorescència) amb un emissor de fluorescència .

Es localitza una bona zona al microscopi i es fan fotografies amb i sense fluorescència. Finalment es procedeix al comptatge de les cèl·lules amb i sense fluorescència i es calcula un percentatge per poder extreure'n conclusions.

3.6. EFECTE DELS ANTIOXIDANTS SOBRE ELS ANTIBIOTICS.

A continuació es realitzaran diferents antibiogrames amb l'antibiòtic més eficaç i una sèrie d'antioxidants.

Es repeteixen els passos de l'**apartat d** amb la gentamicina. S'agafa un morter i es trituren els fruits d'on es pretén treure l'antioxidant. A continuació s'agafa el líquid que surt dels fruits amb la micropipeta (40 µL), es fica el líquid dins del forat corresponent fet a la càpsula petri i es repeteix amb cadascun dels antioxidants. Per acabar es fiquen les plaques petri dins l'estufa durant 2 o 3 dies a una temperatura de 36°C

⁶ L'Ypd és una substància nutritiva que s'utilitza per fer medis de cultiu. Està format per glucosa 2%, peptona 2%, extracte de llevat 1%

4. RESULTATS

4.1. Resultat dels antibiogrames per conèixer quin és l'antibiòtic més efectiu:

- Observant el resultat dels antibiogrames trobem que de les tres substàncies utilitzades l'antibiòtic més efectiu en tots els bacteris i llevats és la gentamicina.
- L'enzim Zimoliasa no té cap efecte bactericida.
- L'antibiòtic ampicil·lina tan sols afecta al *Staphylococcus aureus* mentre que al llevat i als altres dos bacteris és innocu.

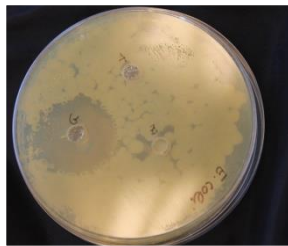


Figura 38: *Escherichia coli* + antibiòtics



Figura 39: *Bacillus cereus* + antibiòtics



Figura 40: *Staphylococcus aureus* + antibiòtics

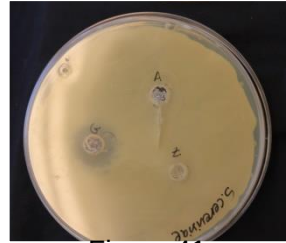
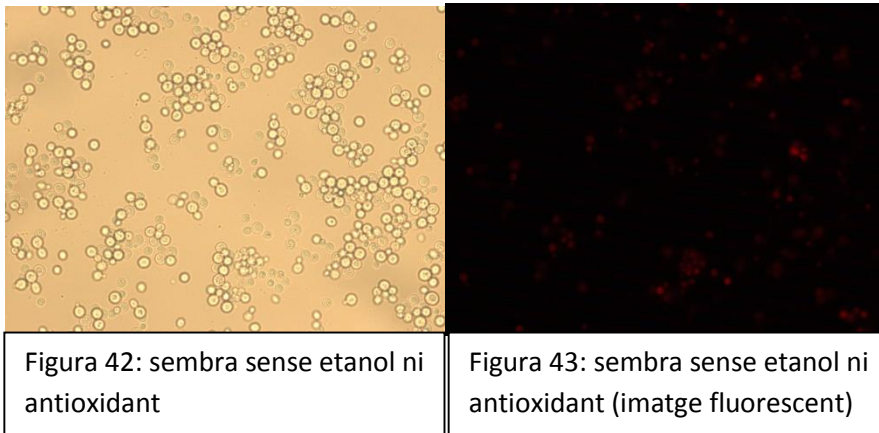


Figura 41: *Sacharomyces cerevisial* + antibiòtics

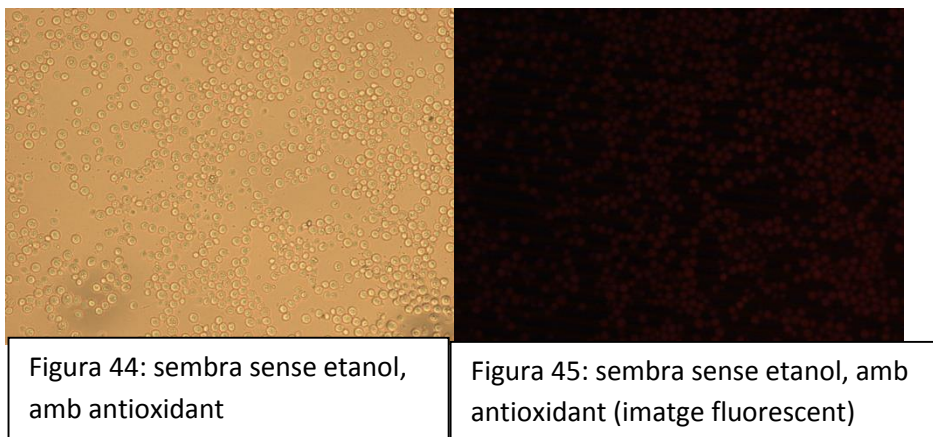
4.2. Resultats per comprovar l'efecte dels antioxidants sobre el ROS amb tinció fluorescent:

1. Les figures 42 i 43 ens mostren els resultats obtinguts de la tinció fluorescent a la mostra que per nosaltres actuarà com la mostra en blanc (llevat amb Ypd). En la figura 42 es mostra el 100% de les cèl·lules, mentre que en la figura 43 veiem

un 14,52% de cèl·lules respecte a la figura 42. Les cèl·lules que es veuen en la figura 43 són aquelles amb un alt nivell d'estrès.



2. Les figures 44 i 45 ens mostren els resultats obtinguts de la tinció fluorescent a la mostra que només conté antioxidant (llevat amb Ypd i vitamina C). En la figura 44 es mostra el 100% de les cèl·lules, mentre que en la figura 45 veiem un 0,16% de cèl·lules respecte a la figura 44. Les cèl·lules que es veuen en la figura 45 són aquelles amb una alt nivell d'estrès.



3. Les figures 46 i 47 ens mostren els resultats obtinguts de la tinció fluorescent a la mostra que només conté l'oxidant (llevat amb Ypd i etanol). En la figura 46 es mostra el 100% de les cèl·lules, mentre que en la figura 47 veiem un 97,01% de cèl·lules respecte a la figura 46. Les cèl·lules que es veuen en la figura 47 són aquelles amb una alt nivell d'estrès.

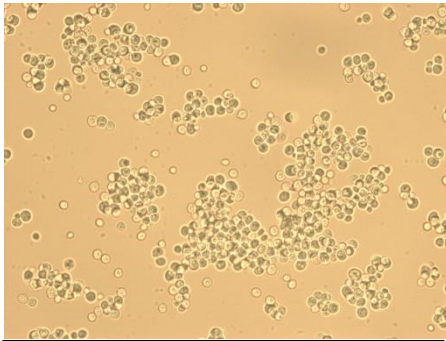


Figura 46: sembra amb etanol, sense antioxidant

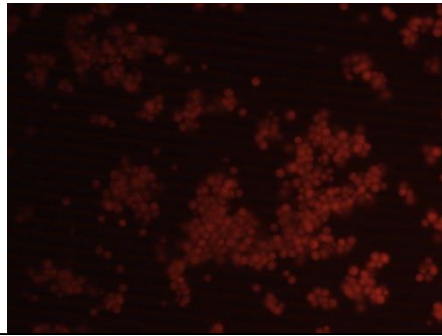


Figura 47: sembra amb etanol, sense antioxidant (imatge fluorescent)

4. Les figures 48 i 49 ens mostren els resultats obtinguts de la tinció fluorescent a la mostra conté l'antioxidant i l'oxidant (llevat amb Ypd, vitamina C i etanol). En la figura 48 es mostra el 100% de les cèl·lules, mentre que en la figura 49 veiem un 21,45% de cèl·lules respecte a la figura 48. Les cèl·lules que es veuen en la figura 49 són aquelles amb una alt nivell d'estrès.

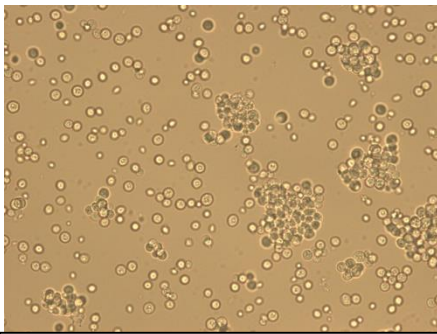


Figura 48: sembra amb etanol, amb antioxidant

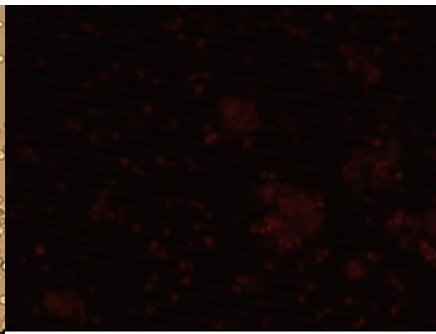


Figura 49: sembra amb etanol, amb antioxidant (imatge fluorescent)

4.3. Resultats per comprovar l'efecte de diversos antioxidants sobre l'actuació dels antibiòtics

Aquesta pràctica s'ha realitzat diverses vegades. La primera va ser a la universitat i es va repetir a l'institut, aconsellat per la tutora, perquè es va veure la necessitat que en cada placa de petri hi hagués una mostra que fes de blanc (tan sols amb antibiòtic) per poder comparar. Els resultats van ser:

1) *Bacillus cereus*:

ANTIOXIDANT	ZONA D'INHIBICIÓ
Vitamina E	3cm
Suc de Móra	2,5cm
Suc de taronja	3cm



Figura 50: sembra amb bacillus cereus

2) *Esterichia coli*: com a conseqüència del seu creixement irregular es difícil determinar la zona d'inhibició.

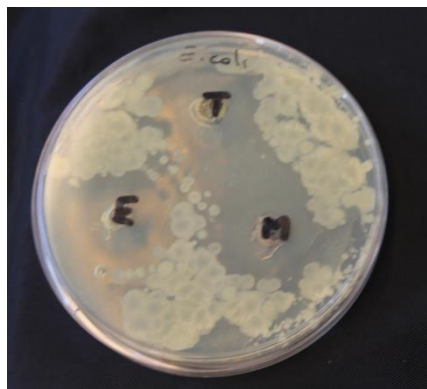


Figura 51: sembra amb Esterichia coli

3) *Straphilococcus aureus*:

ANTIOXIDANT	ZONA D'INHIBICIÓ
Vitamina E	2,2cm
Suc de Móra	2,2cm
Suc de taronja	2,5cm

ELS ANTIOXIDANTS TENEN UN COSTAT FOSC?

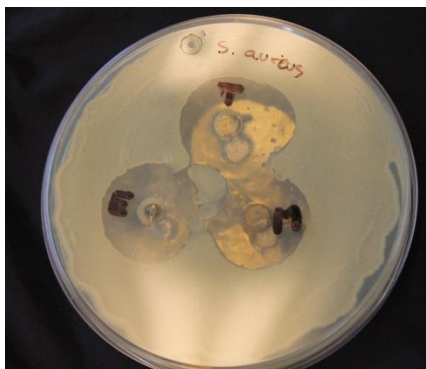


Figura 52: sembra amb straphilococcus aureus

4) *Sacharomyces cerevisial*:

ANTIOXIDANT	ZONA D'INHIBICIÓ
Vitamina E	2,3cm
Suc de Móra	2cm
Suc de taronja	2,5cm



Figura 53: sembra amb sacharomyces cerevisial

Les següents experiències es van fer a l'institut amb cultius de *Micrococcus luteus*. Però els primers que es van fer no es van obtenir resultats rellevants perquè el procediment no es va seguir amb prou rigor:

ELS ANTIOXIDANTS TENEN UN COSTAT FOSC?



Figura 54: antibiograma amb antioxidant. 1 (*Micrococcus luteus*)

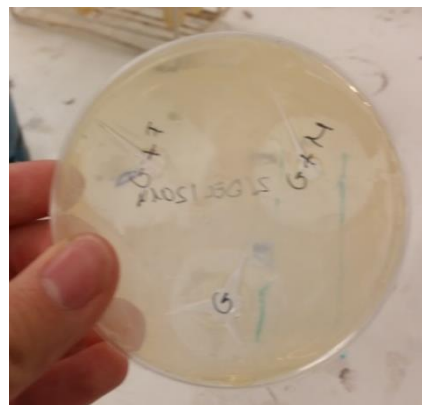


Figura 55: antibiograma amb antioxidant. 2 (*Micrococcus luteus*)

La següent vegada i un cop resolt els problemes anteriors els resultats van ser:

ANTIOXIDANT O ANTIBIOTIC	ZONA D'INHIBICIÓ
Gentamicina	3cm
Mandarina	2,1cm
Tomàquet	2,7cm

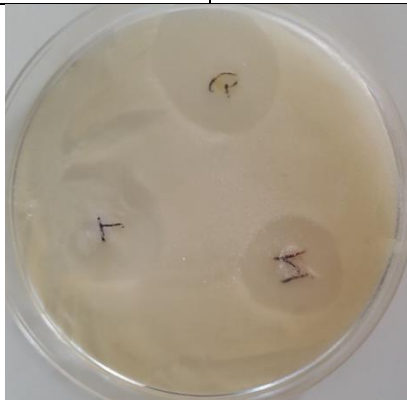


Figura 56: antibiograma amb antioxidant. 3 (*Micrococcus luteus*)

ANTIOXIDANT	ZONA D'INHIBICIÓ
Gentamicina	2,6cm
Mandarina	2,3cm
Tomàquet	2,5cm



Figura 57: antibiograma amb antioxidant. 4 (*Micrococcus luteus*)

5. DISCUSSIÓ DELS RESULTATS

5.1. Quin és el millor antibiòtic?

- Veiem que la gentamicina es l'antibiòtic més efectiu perquè té un anell d'inhibició més gran, això es degut al fet que la gentamicina és un antibiòtic d'ample espectre, és a dir, afecta a un gran ventall d'espècies bacterianes, sobretot bacteris gram-negatius però també alguns gram-positius com veiem en l'experiència.
- Una altra observació és que l'ampicil·lina tan sols té un efecte antibiòtic vers *Staphylococcus aureus* ja que és un bacteri gram-positiu que permet l'entrada de l'antibiòtic, en canvi és un antibiòtic que no té efecte sobre *E. Coli* perquè l'estructura de la seva paret evita l'entrada d'aquest antibiòtic.
- L'enzim zimoliasa, és un enzim que digereix la paret cel·lular dels llevats. En aquest cas s'ha observat que no té cap efecte antibiòtic, ni tan sols en el llevat *Sacharomyces cerevisial*.

5.2. Podem demostrar la presència de ROS amb la tinció d'un reactiu fluorescent?

- S'ha observat que en les cèl·lules sense etanol ni antioxidant hi ha una mínima presència de ROS, la causa més probable pot ser que el mateix metabolisme ja genera aquestes espècies reactives d'oxigen. També veiem cert grau de tinció, és a dir hi ha unes cèl·lules més brillants que altres, i això ens posa de manifest que tenen més ROS.
- El que s'observa en les cèl·lules amb vitamina C és que quasi no hi ha cèl·lules molts estressades, és a dir amb molt ROS, si s'observa amb detall es pot arribar a veure una lleugera tinció que la podem considerar descartable. Aquesta disminució de la intensitat ens permet relacionar-la amb l'actuació de la vitamina C, i per tant pot resultar ser un antioxidant eficaç contra els radicals d'hidroxil, els anions de superòxid i l'oxigen singlet.
- En la mostra de les cèl·lules amb etanol veiem que el 100% de les cèl·lules es troben en un elevat grau d'estrès, ja que l'etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) conté un radical de $\text{OH}^\cdot$ que és un potent oxidant.
- En la última prova del marcatge de l'oxigen (etanol + vitamina C) observem que totes les cèl·lules estan estressades, però quan la comparem amb la mostra que tan sols té etanol es veu una clara reducció de la intensitat i per tant de les espècies reactives d'oxigen que s'hagin format.
- Per tant els antioxidant neutralitzen les espècies reactives d'oxigen en les cèl·lules eucariotes com les del llevat *Sacharomyces cerevisial* i aquest fet es pot extrapolar i dir que en les cèl·lules procariotes els antioxidant també neutralitzen el ROS.

5.3. Els antioxidants redueixen l'efecte dels antibiòtics?

- En la experiència del cultiu de bacteris s'ha comprovat que les mans dels alumnes presenten majoritàriament *Micrococcus*, mentre que en altres llocs com, la barana de les escales o del passadís, a més de contenir *Micrococcus* també s'ha detectat la presència d'alguns fongs.
- En l'estudi de l'antibiograma amb antioxidant que es va realitzar a la universitat es pot comprovar que els anells d'inhibició de la Gentamicina depenen del bacteri i de l'antioxidant que trobem. En el cas de la mora s'observa que en la major part dels casos té l'anell d'inhibició més petit que els altres antioxidants. Aquesta reducció de l'anell d'inhibició pot ser que es doni pel fet que el bacteri pateixi una situació d'estrès⁷ que els antioxidants de la mora poden neutralitzar o afeblir. El problema d'aquesta experiència va ser que al no tindre una mostra en blanc que et permetés comprovar si realment hi ha hagut una disminució de l'efecte de l'antibiòtic.
- Amb aquesta intenció es va repetir l'experiència a l'institut. Després de diversos intents els resultats no van ser els esperats, possiblement la principal causa va ser la manca de rigor alhora de distribuir l'antibiòtic i els antioxidants. Un cop resolt els problemes dels primers intents es van aconseguir finalment uns resultats similars als de la universitat. Concretament s'ha observat una zona d'inhibició més petita, probablement la causa d'aquests resultats és que els antibiòtics poden generar un cert estrès en els bacteris, i per tant, els antioxidants presents en les mandamines o en el tomàquet poden provocar una reducció de l'efecte antibiòtic de la gentamicina.

⁷ faig referència a l'estrès oxidatiu d'una cel·lula. Aquesta situació es dona quan la cel·lula té una gran quantitat de radicals lliures o ROS.

CONCLUSIÓ

En aquest treball he intentat demostrar dues hipòtesis:

- **Potser els antibiòtics generen que els bacteris produeixin radicals lliures que danyen al bacteri.**
- **Si l'afirmació anterior es correcta, pot ser els antioxidants reduiran l'efecte bactericida dels antibiòtics al neutralitzar els radicals lliures.**

Per demostrar aquestes hipòtesis s'ha fet necessari estudiar com actuen els antibiòtics sobre les estructures bacterianes i quines parts del bacteri fan la funció de protecció. La paret cel·lular té un paper clau, però també intervenen altres estructures com els ribosomes alhora de sintetitzar-la, la membrana cel·lular i la capsula. Aquests són els principals obstacles que ha de superar un antibiòtic per atacar el bacteri. Així doncs s'ha fet necessari determinar a partir de quins mecanismes s'aconsegueix que l'antibiòtic actuï sobre aquestes estructures produint el seu efecte bactericida.

La hipòtesi que s'ha plantejat en aquest treball proposa que aquest efecte bactericida pot anar acompanyat de l'alliberament de radicals lliures que podran modificar la composició de les molècules orgàniques del bacteri, danyant les seves estructures. Per neutralitzar aquests radicals lliures s'ha plantejat la segona hipòtesi amb la idea de comprovar si els antioxidants poden reduir l'efecte bactericida dels antibiòtics.

Amb aquestes hipòtesis inicials s'ha fet necessari buscar que és un radical lliure o una espècie reactiva d'oxigen i que és un antioxidant. S'ha vist que els radicals lliures són substàncies químiques amb una composició inestable a causa que tenen l'últim electró desaparellat. Un tipus de radical lliure són les espècies reactives d'oxigen o ROS, són molècules amb oxigen, molt reactives a causa que a l'últim orbital tenen un electró no

aparellat (radical lliure). A la vegada s'ha fet necessari, fer una recerca bibliogràfica per a decidir quins aliments naturals contenen substàncies químiques capaces de neutralitzar els radicals lliures i que de forma general són considerats antioxidants.

El disseny experimental que s'ha realitzat ha pretès, en primer lloc, confirmar, a partir d'antibiogrames, l'efecte bactericida dels antibiòtics. Els resultats obtinguts han sigut els esperats: tant la gentamicina com l'ampicil·lina aconseguixen impedir el creixement bacterià, i d'aquesta manera s'observa en les plaques de cultiu zones d'inhibició d'aquest creixement. A més s'ha complementat l'estudi amb una tercera substància, en aquest cas no es tracta d'un antibiòtic sinó que es tracta d'un enzim, la Zymoliasa. Aquest enzim té un mecanisme d'actuació semblant als antibiòtics perquè pot ser capaç de digerir la paret cel·lular d'alguns bacteris. Finalment, a diferència dels antibiòtics treballats, s'ha observat que l'efecte d'aquest enzim no és suficient per aconseguir zones d'inhibició del creixement bacterià..

En segon lloc s'ha fet la valoració de la presència de radicals lliures, concretament de ROS, amb la tinció d'un reactiu fluorescent. S'ha induït estrès cel·lular a cèl·lules eucariotes, concretament a cèl·lules de llevat, aquest estrès es manifesta amb la formació de radicals lliures, a més, s'han sotmès a la presència d'antioxidants per comprovar si realment els antioxidants neutralitzen els radicals lliures. Aquesta tècnica ens funciona bé amb cèl·lules eucariotes, com en el cas dels llevats, però en canvi no és una tècnica aplicable a les cèl·lules procariotes. Tot i així, podem extrapolar els resultats, i per tant, si en els llevats els resultats han sigut que efectivament els aliments (móres, mandarines, tomàquets) han actuat com a antioxidants neutralitzant i reduint la presència de radicals lliures, podem esperar que en els bacteris l'efecte sigui semblant.

En tercer lloc s'han realitzat una sèrie d'antibiogrames amb gentamicina i amb antioxidants, amb la finalitat de comprovar que, si realment els antibiòtics alliberen radicals lliures i aquests, tal com hem comprovat, són neutralitzats pels antioxidants, llavors podrem observar realment una reducció de la zona d'inhibició. Els resultats ens han permès confirmar que efectivament es produeix una certa reducció de la zona d'inhibició quan ho comparem amb la mostra que ens fa de blanc i que per tant no conté els antioxidants.

Així doncs es pot arribar a la conclusió final que els antibiòtics en la seva actuació bactericida, provoquen, entre d'altres mecanismes, que el bacteri generi espècies reactives d'oxigen que a l'actuar com a radicals lliures ocasionin una sèrie de danys morfològics i bioquímics que indueixin a la mort cel·lular. És per aquest motiu que es redueixi l'efecte de l'antibiòtic al afegir l'antioxidant perquè causa la neutralització d'aquests radicals lliures anomenats espècies reactives d'oxigen.

La pregunta que ens pot quedar finalment per plantejar i que sens dubte podria ser motiu d'un nou treball de recerca és que, si durant un episodi d'infecció bacteriana s'estan prenent antibiòtics, el fet de prendre antioxidants (suc de taronja, tomàquet...) pot suposar una reducció de l'efectivitat de l'antibiòtic. A partir dels resultats que hem obtingut amb aquesta recerca ens podríem aventurar a predir que realment els antioxidants poden reduir l'efecte de l'antibiòtic, però en canvi els antioxidants poden ser beneficiosos per a les nostres cèl·lules, perquè possiblement un procés infecció bacteriana pot arribar a suposar estrès per les nostres cèl·lules i per tant l'efecte dels antioxidants podria ajudar a reduir la presència de radicals lliures. Al final caldria investigar si els beneficis que suposen per un costat els antioxidants es compensen amb els perjudicis que podrien suposar per un altre.

VALORACIÓ PERSONAL

En aquest treball he dedicat moltes hores tant en la fase experimental (que pot semblar la més interessant) com en la fase més bibliogràfica que m'ha permès tenir els fonaments teòrics del treball. Penso que a nivell personal m'ha ajudat a entendre com funciona realment un treball experimental, la majoria de vegades suposa moltes hores de dedicació per obtenir al final pocs resultats. A més, també m'ha obert la ment respecte aquest món misteriós de la microbiologia i la complexitat del funcionament dels antibiòtics i dels antioxidants.

També m'he adonat de la dificultat que suposa la lectura d'articles científics, moltes vegades amb idees contraposades per la falta d'un experiment definitiu que permeti comprovar la teoria

AGRAÏMENTS

M'agradaria donar les gràcies a totes aquelles persones que m'han ajudat d'una manera o d'un altre en el moment de fer la meua recerca i el meu treball.

A la meua família pel suport que m'han donat i perquè en tot moment han estat disposats a ajudar-me en el que sigui.

A la meua professora de biologia, que ha sigut la meua tutora, pel seu temps i la seva dedicació i per totes les hores que ha perdut amb mi per ajudar-me.

I finalment a la Universitat Rovira i Virgili per permetrem utilitzar les seves instal·lacions, per realitzar part de la pràctica i pel material deixat. Concretament m'agradaria donar gràcies a la llicenciada en microbiologia Anna Borrull Rivera que m'ha ajudat a fer les pràctiques a la Universitat i m'ha donat respòs en tots aquells dubtes que he tingut.

BIBLIOGRAFIA

- Introducció a la microbiologia (9ª edició, ed medica: panamericana, autors: Gerard J. Tortora, Berdell R. Funke, Christine L. Case)
- Invitació a la biologia (6ª edició, ed medica: panamericana, autors: Helena Curtis, N. Sue Barnes, Adriana Schnek, Graciela Flores)
- WIKIPEDIA (26 de Juliol del 2014)
http://es.wikipedia.org/wiki/C%C3%A9lula_procaríota
- WIKIPEDIA (26 de Juliol del 2014)
http://es.wikipedia.org/wiki/Membrana_plasm%C3%A1tica
- WIKIPEDIA (26 de Juliol de 2014)
[http://es.wikipedia.org/wiki/C%C3%A9lula_\(microbiolog%C3%A0a\)](http://es.wikipedia.org/wiki/C%C3%A9lula_(microbiolog%C3%A0a))
- WIKIPEDIA (30 de Juliol de 2014)
http://ca.wikipedia.org/wiki/C%C3%A9lula_bacteriana
- WIKIPEDIA (30 de Julio de 2014) <http://es.wikipedia.org/wiki/Flagelo>
- WIKIPEDIA (30 de Juliol de 2014) http://es.wikipedia.org/wiki/Pared_celular
- BIOLOGIAMEDICA.BLOGSPOT (30 de Juliol de 2014)
<http://biologiamedica.blogspot.com.es/2010/09/bacterias-gram-positivas-y-gram.html>
- WIKIPEDIA (30 de Juliol de 2014)
http://es.wikipedia.org/wiki/Bacteria_Gram_negativa
- WIKIPEDIA (30 de Juliol de 2014)
http://es.wikipedia.org/wiki/Bacteria_Gram_positiva
- WIKIPEDIA (30 de Juliol de 2014) <http://es.wikipedia.org/wiki/Fimbria>

- DIVERSIDAD MICROBIANA (5 d'Agost de 2014)
http://www.diversidadmicrobiana.com/index.php?option=com_content&view=article&id=51&Itemid=67
- BIOLOGIA NIVEL DE ENSEÑANZA MEDIA: MESOSOMA (5 d'Agost de 2014)
<http://eca-ensenanzamedia-biologia.blogspot.com.es/2008/05/mesosoma.html>
- WIKIPEDIA (5 d'Agost de 2014)
[http://ca.wikipedia.org/wiki/Mesosoma_\(c%C3%A8l%C2%B7lula\)](http://ca.wikipedia.org/wiki/Mesosoma_(c%C3%A8l%C2%B7lula))
- SLIDESHARE (5 d'Agost de 2014)
<http://es.slideshare.net/CamiloBeleo/metabolismo-bacteriano-24817583>
- WIKIPEDIA (5 d'Agost de 2014)
http://es.wikipedia.org/wiki/Metabolismo_microbiano
- WIKIPEDIA (15 d'Agost de 2014)
http://es.wikipedia.org/wiki/Saccharomyces_cerevisiae
- CSIC: SERES MODELICOS (15 d'Agost de 2014)
<http://seresmodelicos.csic.es/llevat.html>
- WIKIPEDIA (15 d'Agost de 2014)
http://es.wikipedia.org/wiki/Organismo_anaerobio
- WIKIPEDIA (15 d'Agost de 2014) http://es.wikipedia.org/wiki/Organismo_aerobio
- ESCHERICHIA COLI (15 d'Agost de 2014)
<http://cbtis253escherichiacoli.blogspot.com/p/caracteristicas-generales.html>
- WIKIPEDIA (15 d'Agost de 2014) http://es.wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli
- BACILLUS CEREUS (22 d'Agost de 2014)
<http://bacteriabacilluscereus.blogspot.com/>
- WIKIPEDIA (22 d'Agost de 2014) http://es.wikipedia.org/wiki/Bacillus_cereus

- EL ESTRAFILOCOCUS AUREUS (22 d'Agost de 2014)
http://www.ehowenespanol.com/estafilococo-aureus-caracteristicas-bioquimicas-sobre_44034/
- WIKIPEDIA (22 d'Agost de 2014)
http://es.wikipedia.org/wiki/Staphylococcus_aureus
- FAO.ORG (22 d'Agost de 2014)
<http://www.fao.org/docrep/007/y5468s/y5468s02.htm>
- WIKIPEDIA <http://biomodel.uah.es/biomodel-misc/anim/centrif/centrif-vs.html> (24 d'Agost de 2014) <http://es.wikipedia.org/wiki/Antibi%C3%B3tico>
- BIOTEGNOLOGIA: EL DESCUBRIMIENTO DE LOS ANTIBIÓTICOS (24 d'Agost de 2014) <http://blogs.creamoselfuturo.com/bio-tecnologia/2010/06/21/el-descubrimiento-de-los-antibioticos-historia-y-evolucion-2/>
- FBIOYF.UNR.EDU: CLASIFICACIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS (24 d'Agost de 2014)
http://www.fbioyf.unr.edu.ar/evirtual/pluginfile.php/108387/mod_resource/content/1/Crecimiento%20parte%20d.pdf
- CIENCIAS NATURALES: LOS ANTIBIÓTICOS (24 d'Agost de 2014)
<http://www.areaciencias.com/quimica/los-antibioticos.html>
- MONOGRAFIAS: LOS ANTIBIÓTICOS (24 d'Agost de 2014)
<http://www.monografias.com/trabajos10/antib/antib.shtml#clasif>
- TEXTOS CIENTÍFICOS (27 d'Agost de 2014)
<http://www.textoscientificos.com/antibioticos/introduccion>
- WIKIPEDIA (27 d'Agost de 2014) <http://es.wikipedia.org/wiki/Antibi%C3%B3tico>
- MEDLINEPLUS (27 d'Agost de 2014)
<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/antibiotics.html>

- FAMILYDOCTOR (27 d'Agost de 2014)
<http://es.familydoctor.org/familydoctor/es/drugs-procedures-devices/prescription-medicines/antibiotics-when-they-can-and-cant-help.html>
- MONOGRAFIAS (27 d'Agost de 2014)
<http://www.monografias.com/trabajos10/antibi/antibi.shtml>
- MOTIVACION.ABOUT (27 d'Agost de 2014)
<http://motivacion.about.com/od/alimentacion/a/Antioxidantes.htm>
- WIKIPEDIA (27 d'Agost de 2014) <http://es.wikipedia.org/wiki/Antioxidante>
- MEDLINEPLUS (27 d'Agost de 2014)
<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/antioxidants.html>
- (27 d'Agost de 2014) <http://www.webconsultas.com/dieta-y-nutricion/nutrientes/antioxidantes-3971>
- (27 d'Agost de 2014) <http://www.botanical-online.com/medicinalasantioxidantes.htm>
- WIKIPEDIA (27 d'Agost de 2014)
http://es.wikipedia.org/wiki/Antibi%C3%B3tico_betalact%C3%A1mico
- WIKIPEDIA (4 de Setembre de 2014)
<http://es.wikipedia.org/wiki/Macr%C3%B3lido>
- WIKIPEDIA (4 de Setembre de 2014)
<http://es.wikipedia.org/wiki/Aminogluc%C3%B3sido>
- WIKIPEDIA (4 de Setembre de 2014)
<http://es.wikipedia.org/wiki/Glucop%C3%A9ptido>
- WIKIPEDIA (4 de Setembre de 2014) <http://es.wikipedia.org/wiki/Lincosamida>
- SLIDESHARE (4 de Setembre de 2014)
<http://es.slideshare.net/pablongonius/antibioticos-1-dr-diaz>

ELS ANTIOXIDANTS TENEN UN COSTAT FOSC?

- WIKIPEDIA (4 de Setembre de 2014) <http://es.wikipedia.org/wiki/Quinolona>
- WIKIPEDIA (4 de Setembre de 2014) <http://es.wikipedia.org/wiki/Tetraciclina>
- <http://www.vademecum.es/principios-activos-tetraciclina-j01aa07>
- WIKIPEDIA (6 de Setembre de 2014) <http://es.wikipedia.org/wiki/Gentamicina>
- VADEMECUM: GENTAMICINA (6 de Setembre de 2014)
<http://www.vademecum.es/principios-activos-gentamicina-j01gb03>
- AEMPS.GOB (6 de Setembre de 2014)
http://www.aemps.gob.es/cima/pdfs/es/ft/50957/50957_ft.pdf
- WIKIPEDIA (6 de Setembre de 2014) <http://es.wikipedia.org/wiki/Antioxidante>
- GENCAT.CAT: ANTIOXIDANTS (6 de Setembre de 2014)
<http://www.gencat.cat/salut/acsa/html/ca/dir1311/dd16054/antioxidants.pdf>
- UM.COM: LOS ANTIOXIDANTES EN LA NATURALEZA (6 de Setembre de 2014)
<http://www.um.es/lafem/Actividades/OtrasActividades/CursoAntioxidantes/MaterialAuxiliar/2012-01-24-AntioxidantesEnNaturaleza-TiposDistribucion.pdf>
- DIRICO.COM: ANTIOXIDANTES (6 de Setembre de 2014)
http://www.dirico.com.ec/archivos/Presentacion_Antioxidantes.pdf
- FEDERACIONCAFE: LOS RADICALES LIBRES (6 de Setembre de 2014)
<http://www.federacioncafe.com/Documentos/CafeYSalud/CafeYAntioxidantes/Radicales%20libres.pdf>
- WIKIPEDIA (10 de Setembre de 2014)
http://es.wikipedia.org/wiki/%C3%81cido_nitroso
- WIKIPEDIA (10 de Setembre de 2014)
http://es.wikipedia.org/wiki/Per%C3%B3xido_de_hidr%C3%B3geno

- WIKIPEDIA (10 de Setembre de 2014)
http://es.wikipedia.org/wiki/%C3%81cido_hipocloroso
- WIKIPEDIA (10 de Setembre de 2014)
http://es.wikipedia.org/wiki/Per%C3%B3xido_org%C3%A1nico
- WIKIPEDIA (10 de Setembre de 2014)
<http://es.wikipedia.org/wiki/Ox%C3%ADgeno>
- WIKIPEDIA (10 de Setembre de 2014) <http://es.wikipedia.org/wiki/Peroxinitrito>
- WIKIPEDIA (10 de Setembre de 2014) <http://es.wikipedia.org/wiki/Ozono>
- ORTOBARCELONA: ANTIOXIDANTES (10 de Setembre de 2014)
http://ortobarcelona.com/antioxidantes_endogenos_y_exogenos.html
- REVISTA DEL INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES
RESPIRATORIAS (10 de Setembre de 2014)
http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-75852004000200010
- WIKIPEDIA (13 de Setembre de 2014) <http://es.wikipedia.org/wiki/Ribosoma>
- RAFAELES07: SISTEMAS MEMBRANOSOS (13 de Setembre de 2014)
<http://rafaeles07.webnode.es/ribosomas/ribosoma-70s-procariota/>
- LAGUIADEBIOLOGIA (13 de Setembre de 2014)
<http://biologia.laguia2000.com/citologia/partes-de-la-celula-procariota>
- WIKIPEDIA (13 de Setembre de 2014) <http://es.wikipedia.org/wiki/Nucleoide>
- HIPERTEXTOS DEL AREA DE BIOLOGIA(13 de Setembre de 2014)
<http://www.biologia.edu.ar/bacterias/micro2.htm>
- WIKIPEDIA (13 de Setembre de 2014) <http://ca.wikipedia.org/wiki/Plasmidi>
- SLIDESHARE(17 de Setembre de 2014)
<http://es.slideshare.net/farmacologiabasicafucs/clasificacion-antibioticos>

- WIKIPEDIA (17 de Setembre de 2014)
http://es.wikipedia.org/wiki/Micrococcus_luteus
- BIOMODLE (17 de Setembre de 2014) <http://biomodel.uah.es/biomodel-misc/anim/centrif/centrif-vs.html>

ANNEXES

Annex-1: *“Lo nocivo de tomar antibióticos”*

Annex-2: *“Antibióticos: riesgo de la ingesta prolongada”*

Annex-3: *“Descubren que los antibióticos tienen una única forma de matar”*

Annex-4: *“La capacidad bactericida de los antibióticos no depende de las especies reactivas del oxígeno”*

Annex-1: “Lo nocivo de tomar antibióticos”

Una razón más a tomar en cuenta acerca de los **efectos negativos de los antibióticos**. Según un estudio publicado en la revista Science Translational Medicine y titulado "Bactericidal Antibiotics Induce Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Damage in Mammalian Cells", **ciertos antibióticos causarían desbalances en el funcionamiento de las mitocondrias de los mamíferos**, lo que puede provocar daños en los tejidos.

El estudio sugiere que las propiedades bactericidas de los antibióticos son las mismas que afectan las mitocondrias, ya que estas tienen ciertas características semejantes a las bacterias.

Las **mitocondrias** son los orgánulos que **se encargan de producir energía dentro de la célula**, y tienen un ADN similar al de ciertas bacterias. Esto sugiere que las mitocondrias son producto de un antiguo desarrollo endosimbiótico, en el que una bacteria fue engullida por otra célula. Es por eso que los medicamentos dirigidos a atacar bacterias podrían afectar también a las mitocondrias.

El equipo dirigido por el profesor Jim Collins, experto en Ingeniería Biomédica de la Universidad de Boston, ya había realizado investigaciones relacionadas con los efectos de los antibióticos, como **el aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)**, unas moléculas muy perjudiciales para las bacterias.

Esta nueva investigación se centró en analizar si es que **los antibióticos también producen un aumento de la producción de ROS en las mitocondrias** de los mamíferos. Para ello, se examinaron líneas celulares humanas en varios tejidos a los que se trataron con tres tipos de antibiótico bactericida: ciprofloxacina, ampicilina y kanamicina.

Los resultados mostraron que **los antibióticos, administrados según niveles clínicos, generan ROS**. Collins explica que lo hacen afectando las mitocondrias: "hemos demostrado que lo hacen, en parte, mediante la interrupción de la función mitocondrial". Esto no sucede con todos los tipos de antibióticos como es el caso de la tetraciclina, la cual no mata bacterias, sino tan solo evita su crecimiento.

Asimismo, **las células tratadas con los antibióticos mostraron estrés oxidativo**, un tipo de daño causado por las ROS cuando varios componentes celulares se enlazan y oxidan.

Este mismo experimento se repitió con ratones y, luego de administrarles los tres antibióticos, se observó que aumentaron también sus niveles de ROS y que hubo estrés oxidativo.

Sin embargo, un daño serio a nivel celular no se presentaría si se prescribe a la persona antibióticos durante un tiempo corto, ya que los mecanismos de reparación de daños en el ADN son eficaces. En cambio, **el impacto sí podría ser serio en el caso de personas a quienes se les administran antibióticos de manera constante**.

Para ver si los daños a la mitocondria por ROS pueden ser reducidos, Collins y su equipo experimentaron con un antioxidante llamado **acetilcisteína** (NAC). Al ser administrado junto con los antibióticos, **el NAC mitigó el aumento de especies reactivas dentro de la célula (ROS) y del efecto de estrés oxidativo**, y no afectó el efecto antibacteriano de los antibióticos.

Para Collins, esto se debería a que el NAC no estaría penetrando en las bacterias pero sí en las mitocondrias, de modo que el efecto antibiótico es más específico.

Mientras siguen las investigaciones, Collins recomienda que los antibióticos sean consumidos solo cuando realmente sean necesarios.

<https://sophimania.lamula.pe/2013/07/11/lo-nocivo-de-tomar-antibioticos/sophimania/>

Annex-2: “Antibióticos: riesgos de la ingesta prolongada”

Los antibióticos matan a las bacterias, pero su ingesta prolongada podría causar una disfunción mitocondrial e inducir un estrés oxidante en células saludables, de acuerdo a un estudio científico conocido durante los últimos días.

Los hallazgos podrían ayudar a explicar por qué estos fármacos causan problemas para varios pacientes en regímenes de largo plazo.

Los antibióticos han sido durante mucho tiempo un arma estándar en la batalla contra las infecciones y varias enfermedades.

Conforme los aspectos ligados al sobreuso de antibióticos y la resistencia bacteriana en medicina se van profundizando, otro factor ha emergido en el debate de los antibióticos: su efecto en células sanas.

El uso de antibióticos a largo plazo ha sido ligado con varios efectos secundarios, incluyendo pérdida del oído y daño renal. El pensamiento médico tradicional dice que los antibióticos podrían desencadenar la producción de especies reactivas del oxígeno, o ROS (por sus siglas en inglés), que destruyen el ADN bacteriano. Sin embargo, las interrogantes continúan sobre si los antibióticos inducen ROS en la estructura celular.

En estados Unidos, el Dr. Sameer Kalghatgi investigó los efectos de bactericida o antibióticos eliminadores de bacteria específicamente en células “mamíferas”. Los investigadores observaron que tres diferentes tipos de antibióticos bactericidas

(quinolones, betalactámicos y aminoglicósidos) todos indujeron la producción de ROS en cultivos de células humanas en el laboratorio.

Este estrés oxidante causa daño a ADN, proteínas y lípidos de membrana sanos.

Observando más de cerca, los autores del trabajo de investigación descubrieron que los antibióticos bactericidas afectaron la cadena de transportación de electrones mitocondriales de las células, lo que resultó en una acumulación de ROS.

Los ratones a los que se les dieron dosis clínicas de antibióticos bactericidas mostraron señales similares de daño oxidante en su sangre y glándulas mamarias. Sin embargo, tratamiento con el poderoso antioxidante acetilcisteína N revirtió el daño ROS, sin comprometer las propiedades eliminadoras de bacterias de los antibióticos.

De manera notable, los científicos del equipo del Dr. Kalghatgi descubrieron que la tetraciclina, un antibiótico bacterio-estático que limita el crecimiento de las bacterias pero no las mata, no induce daño ROS en las células.

Los hallazgos sugieren que el daño celular de antibióticos bactericidas podría potencialmente ser prevenido mediante el tomar antioxidantes o el cambiar a antibióticos bacterio-estáticos.

<http://www.eldia.com.ar/edis/20130707/Antibioticos-riesgos-ingesta-prolongada-revistadomingo7.htm>

Annex-3: “*Descubren que los antibióticos tienen una única forma de matar*”

Científicos de la Universidad de Northeastern, en Estados Unidos, han descubierto que todos los antibióticos actúan de la misma manera a la hora de acabar con las bacterias a las que se enfrenta, como el asesino que sólo sabe manejar un único tipo de armamento, cuando en realidad se creía que cada tipo de bactericida tenía una forma propia de matar.

En concreto, los resultados que publica la revista Science muestran cómo actúan estos medicamentos fomentando que las células bacterianas desarrollen unos compuestos llamados especies reactivas de oxígeno (ROS), ante las que son susceptibles.

Este hallazgo, en cambio, rompe con el pensamiento estándar hasta ahora, que establecía que cada uno de los tres principales tipos de antibióticos tenía una forma propia de matar. De hecho, ha explicado Kim Lewis, autor del estudio, se ha visto que esta hipótesis alternativa no se sostiene, incluso aunque las bacterias sean incapaces de desarrollar ROS siguen siendo vulnerables a los antibióticos.

"Hemos decidido hacer el experimento más simple y más crítico dirigido a combatir esta hipótesis", dijo Lewis, quien concluye que "matar a los antibióticos está relacionado con la producción de ROS".

El equipo analizó dos tratamientos de cultivo bacterianos con antibióticos, tanto en presencia como en ausencia de oxígeno, lo que no causó apenas diferencias en la muerte celular en ambos grupos.

Antes de realizar estos experimentos, el equipo de Lewis analizó primero las señales de un colorante fluorescente que otros investigadores habían utilizado como un indicador de los niveles de ROS. El equipo trató a las células bacterianas con una variedad de antibióticos y midieron la fuerza de esta señal.

Dado que los antibióticos parecen aumentar los niveles de ROS, se esperaba un aumento de las concentraciones que se correlacionara con señales más fuertes. Sin embargo, el grupo de Lewis no veía tal correlación.

"Pero hay una diferencia entre correlación y la observación directa", dijo Iris Keren, coautor del estudio. Con el fin de apoyar sus observaciones con datos inequívocos, los miembros del equipo separaron físicamente las células que tenían fuertes señales fluorescentes de aquellos con señales débiles y los trataron tanto con los mismos antibióticos. Ambas poblaciones sufrieron la muerte celular equivalente.

Con estos resultados, Lewis y Keren esperan ser capaces de concentrar sus esfuerzos en la comprensión de los mecanismos reales que usan los antibióticos para eliminar las bacterias con el fin de abordar con eficacia las infecciones bacterianas crónicas, uno de los problemas más apremiantes que enfrenta la salud pública en la actualidad.

<http://www.medicinatv.com/noticias/descubren-que-los-antibioticos-tienen-una-unica-forma-de-matar-245396>

Annex-4: “La capacidad bactericida de los antibióticos no depende de las especies reactivas del oxígeno”.

La idea de que todos los antibióticos atacan a las bacterias usando un mismo mecanismo esencial, el de forzar a las células bacterianas a generar compuestos conocidos como especies reactivas del oxígeno, a los cuales las bacterias son vulnerables, ha ganado cierta popularidad en años recientes, pero ahora una nueva investigación pone en duda su validez.

En este nuevo estudio, el equipo de Kim Lewis, Iris Keren, Yanxia Wu, Julio Inocencio y Lawrence R. Mulcahy, todos de la Universidad del Nordeste, en Boston, Massachusetts, Estados Unidos, no ha encontrado correlación alguna entre las probabilidades de supervivencia de una célula individual en presencia de antibióticos, y su nivel de especies reactivas de oxígeno.

Por ejemplo, algunos antibióticos pueden hacer su trabajo tanto en condiciones aerobias como anaerobias, o sea sin que el oxígeno tenga un papel decisivo. En cambio, las especies reactivas del oxígeno sólo se pueden formar cuando hay oxígeno.

En los experimentos, una sustancia que neutraliza a las especies reactivas del oxígeno protegió a las células ante antibióticos presentes en bajas concentraciones, pero el efecto también fue observado bajo condiciones anaerobias.

Incluso bacterias que son incapaces de generar especies reactivas del oxígeno son pese a ello vulnerables a antibióticos.

En los experimentos, se constató que el grado de supervivencia de bacterias tratadas con varios antibióticos bajo condiciones aerobias era esencialmente el mismo que bajo

condiciones anaerobias. Esto sugiere que las especies reactivas del oxígeno no tienen un papel relevante en la función bactericida de los antibióticos. En otras palabras, los antibióticos aparentemente no matan a las bacterias a través de la inducción de especies reactivas del oxígeno.

[http://noticiasdelaciencia.com/not/6733/la-capacidad-bactericida-de-los-antibioticos-no -
depende-de-las-especies-reactivas-del-oxigeno/](http://noticiasdelaciencia.com/not/6733/la-capacidad-bactericida-de-los-antibioticos-no-depender-de-las-especies-reactivas-del-oxigeno/)