

Temes de Bioquímica Treballs de recerca

J. M. Fernández-Novell / R. Fusté / J. J. Guinovart



EDICIONS
UNIVERSITAT DE
BARCELONA

TEMES DE BIOQUÍMICA
Treballs de recerca

Josep M. Fernández-Novell
Roser Fusté
Joan J. Guinovart

Col·lecció
Gabinet d'Orientació Universitària
4

TEMES DE BIOQUÍMICA

Treballs de recerca

Departament de Bioquímica
i Biologia Molecular

UNIVERSITAT DE BARCELONA. Dades catalogràfiques

Fernàndez Novell, Josep Ma.

Temes de bioquímica : treballs de recerca. – (Gabinet d'Orientació Universitària ; 4)

Referències bibliogràfiques

ISBN 84-8338-197-4

I. Fusté, Roser II. Guinovart i Cirera, Joan J. III. Universitat de Barcelona.

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular IV. Títol

V. Col·lecció: Gabinet d'Orientació Universitària (Col·lecció) ; 4

1. Bioquímica 2. Educació secundària

© EDICIONS DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA, 2000
Balmes, 25, 08007 Barcelona; Tel.: 93 403 55 30; Fax 93 403 55 31
eub@org.ub.es; www.ub.es/edicions/eub.htm

Director de la col·lecció: Benito Echeverría

Producció: Publicacions de la Universitat de Barcelona

Impressió: Gráficas Rey S.L.

Dipòsit legal: B-36.578-2000

ISBN: 84-8338-197-4

Tots els drets d'aquesta publicació (incloent-hi el disseny de la coberta)
EDICIONS DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA

Imprès a Espanya / Printed in Spain

Queda rigorosament prohibida la reproducció total o parcial d'aquesta obra. Cap part d'aquesta publicació, incloent-hi el disseny de la coberta, pot ser reproduïda, emmagatzemada, transmesa o utilitzada per cap tipus de mitjà o sistema, sense l'autorització prèvia per escrit de l'editor.

ÍNDIX

Pròleg	7
Introducció	9
Greix a la carta	11
Combat als bacteris	21
La intel·ligència de les plantes	29
Gens virtuals	39
Mosques i gens	49
Què mengem?	59
Dieta i salut	67
La clorofil·la, seguint el rastre del Sol	73
Proteases d'origen vegetal	83
El sabó i la neteja	81
Cromatografia dels lípids	99
Annex	107

Estudis recents demostren que el sector d'alta tecnologia determina quines àrees metropolitanes estan tenint èxit o ensorrant-se. Així, les activitats d'I + D (investigació més desenvolupament) poden explicar el 65% de la diferència en creixement econòmic de varies regions metropolitanes durant els anys 90. Per això, l'existència d'una estructura de recerca és, sense cap dubte, el factor més important a l'hora d'incubar indústries d'alta tecnologia. Àrees, com Massachusetts i Califòrnia als Estats Units o les rodalies de Cambridge a Anglaterra han tingut impressionants beneficis econòmics que han sorgit de l'activitat duta a terme per les universitats i centres de recerca de les zones respectives, incloent-hi la creació de milers de llocs de treball.

Cal que Catalunya no quedi fora d'aquest món, ja que aquí, més que no pas en cap altre camp, ens hi juguem el futur. És necessari, doncs, donar a Catalunya les institucions de recerca que li permetin incorporar-se a aquesta nova societat de l'alta tecnologia que serà la que decidirà el benestar dels països al començament del nou mil·lenni.

En aquest context cal adonar-se'n que, de la mateixa manera que el futbol base és fonamental per a l'existència dels grans equips, el desenvolupament de la recerca en un país necessita que el nivell científic a les escoles de secundària sigui alt i que l'alumnat tingui la possibilitat d'estar immers en una atmosfera que afavoreixi les vocacions científiques. La incorporació del treball de recerca al batxillerat permetrà a l'alumnat familiaritzar-se amb el mètode científic, i sens dubte contribuirà a aquest fi.

El Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat de Barcelona té una tradició de col·laboració amb els centres de secundària materialitzada en cursos per a professors i per a alumnes. Ara vol contribuir també a facilitar les tasques del professorat proporcionant-li amb aquest llibre un instrument per a introduir l'alumnat en el meravellós camp de la recerca en la ciència que ha revolucionat el nostre coneixement de la natura i de nosaltres mateixos i que serà, a ben segur, la ciència del segle XXI.

INTRODUCCIÓ

El DOGC del 2-9-1998 exposa que: "Al llarg del batxillerat, l'alumnat ha de consolidar les seves capacitats de recerca i desenvolupar-ne de noves, aplicant-les a les diferents matèries del currículum en el que s'anomena **treball de recerca**",

Durant el segon curs de batxillerat tots els alumnes han de realitzar un treball d'investigació, és a dir, han de plantejar-se una pregunta i contestar-la mitjançant el mètode científic. Aquest treball els ha de permetre familiaritzar-se amb el que solen ser els treballs acadèmics propis de l'àmbit universitari (a partir d'una qüestió inicial, recollir dades bibliogràfiques i/o experimentals, elaborar unes conclusions, etc.). El *treball de recerca* és imprescindible per superar el batxillerat i cal aprovar-lo. Compta un 10% sobre la nota final de l'etapa.

Gran part del professorat que ha de guiar aquestes investigacions demostra certa inquietud pel fet de no existir ni bibliografia ni d'altra documentació al seu abast sobre el tema. Cal tenir present que aquest *treball de recerca* es realitza només a Catalunya. Aquest fet introdueix el professorat en una nova dinàmica de l'ensenyament: aconseguir que l'alumnat consolidi, al llarg del Batxillerat, les seves capacitats d'investigació. Això s'aconseguirà amb una major preparació, per part del professorat, en la metodologia científica, un dels objectius que pretén assolir aquest llibre.

En el moment de delimitar l'abast i els objectius del treball cal tenir present que no es tracta "fonamentalment" de realitzar una gran recerca, sinó de mostrar el camí metodològic i formal de com investigar. Això no vol dir que el tema quedi en un segon terme, sinó que s'ha de concretar de tal manera que no obligui l'alumne a esmerçar més temps del que correspongui d'acord amb el valor que té el treball de recerca: 2 crèdits.

El tutor del treball ha de saber qui és el seu alumne "acadèmicament", què se li pot demanar i què no, per tant, cal adaptar el *treball*

de recerca al perfil de l'alumnat. Aquest treball comença amb la selecció del tema sempre relacionat amb el seu entorn quotidià (relació ciència, tecnologia i societat) i que ha de despertar el seu interès. S'escolleixen els objectius, formulant les preguntes addients, es trien els materials i els mètodes, s'arriben a unes conclusions i s'elaboren els documents necessaris per exposar-lo.

Amb aquest llibre, el departament de Bioquímica i Biologia Molecular pretén omplir el buit existent en aquesta nova matèria. Inclou informació sobre guions de possibles *treballs de recerca* en Bioquímica i Biologia Molecular, atractius tant pel professorat com per a l'alumnat i que al mateix temps són de fàcil realització en els laboratoris dels centres de secundària. Vol ser una eina d'utilitat per a tot el professorat que estigui interessat en desenvolupar els *treballs de recerca* dins del camp Biosanitari, per això, s'han proposat diferents temes que abarquen un ampli ventall de preguntes (sobre genètica, enzimologia, analítica, etc,...) dins d'aquest camp.

Cada treball consta de títol, objectiu/s, introducció, material i reactius, procediment, resultats i discussió, conclusions i bibliografia. A més a més, tots ells contenen dos esquemes, un de tota la part procedimental i l'altre, el més important per al professor-tutor, inclou una sèrie de preguntes relacionades de manera que permet dirigir simultàniament diferents treballs de recerca sobre el mateix tema. Només en el primer treball "Greix a la carta" s'hi troba l'explicació detallada del significat de cadascun dels apartats anteriors.

El nostre objectiu és simplificar la tasca del professorat mostrant com a partir d'experiències bàsiques el nostre alumnat pot ser capaç de realitzar els treballs de recerca. En cada capítol hem indicat diferents possibilitats d'ampliació del tema que poden o no ser desenvolupades en un mateix treball; no són temes tancats sinó que resten oberts a la possible ampliació duta a terme tan pel professorat com pel propi alumnat.

Esperem que aquest llibre assoleixi les fites proposades inicialment i estimuli el professorat interessat en el camp biosanitari a desenvolupar treballs de recerca en aquesta àrea i així, tots plegats, contribuïrem a formar una societat cada cop més culta i més sensible envers la ciència

GREIX A LA CARTA*

Josep M. Fernández-Novell

Roser Fusté

1. Objectius

Cal tenir present que els objectius de qualsevol treball de recerca han de fomentar l'esperit investigador de l'alumnat, han de ser preguntes que es puguin respondre amb els coneixements assolits a l'etapa i, si pot ser, relacionats amb la vida i/o l'entorn quotidià.

Quantificació dels greixos totals presents en l'alvocat i el kiwi.

Possibles preguntes a desenvolupar en diferents treballs de recerca:

- *Tenen la mateixa quantitat de greixos l'alvocat i el kiwi?*
- *Els lípids d'aquestes fruites estan uniformement repartits?*
- *Com es relacionen les dietes riques en una d'aquestes fruites i algunes de les malalties metabòliques?*
- ...

2. Introducció

La introducció consta de tota la part teòrica i de suport tècnic que el nostre alumnat necessitarà per desenvolupar la recerca. Tindrà més o menys pes depenent de l'enfocament que cada tutor i/o alumne/a donin al treball. En aquest llibre es descriu una introducció molt general, no amb la idea que siguin desenvolupats tots els apartats en

* Adaptació de *Pràctiques de Bioquímica* del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat de Barcelona.

un únic treball sinó perquè sigui el criteri dels professors/es tutors el que indiqui a cada alumne/a els punts més adients a estudiar segons els objectius de cada treball.

— Què són els lípids?

- Propietats
- Saponificació
- Esterificació

— Classificació dels lípids

- Àcids grassos
- Acilglicèrids
- Ceres
- Fosfolípids
- Esteroides
- Terpens o isoprenoides
- Prostaglandines

— Funció biològica dels lípids

- Aïllant
- Reserva d'energia
- Solubilitzant de certes vitamines

— Absorció i transport dels triglicèrids

— Presència dels lípids en la dieta

- mediterrània
- vegetariana
- anglosaxona
- ...

— Relació dels lípids amb

- malalties cardiovasculars
- diabetis
- obesitat
- ...

3. Material i reactius

Aquest apartat inclou el detall de tot el material i els reactius necessaris per dur a terme la part experimental (laboratori i/o treball de camp) de l'estudi. S'acompanya de la valoració de riscos tant del material com dels reactius emprats. Unes normes de seguretat es troben en l'annex final del llibre.

3.1. Material

- Balança
- Tisores, pinces i espàtula
- Paper d'alumini
- Tubs de vidre gruixut amb tap de rosca i amb cercle de tefló (sense el tefló la tanca no seria hermètica)
- Agitador orbital
- Embut i cotó fluix
- Tubs de plàtic tipus Eppendorf
- Pipetes de 10 mL, 5 mL i 2 mL
- Pipetejadors, tipus pi-pump o tipus pera de seguretat
- Pipetes Pasteur
- Motllos d'alumini

3.2. Reactius

- Hexà/isopropanol (3/2 v/v)
- Na_2SO_4 0,47 mol/L
- Hexà
- Tros de kiwi
- Tros d'alvocat

3.3. Valoració de riscos

- L'hexà és nociu i tots dos dissolvents, hexà i isopropanol, són inflamables; per tant, no poden estar a prop de fonts de calor i cal evitar d'inhalar-los. Es pipetejara directament de l'ampolla, en la vitrina de gasos; amb l'ajut d'un pipetejador o d'una pera de seguret, **mai directament amb la boca**.
- Es recomana que totes les extraccions i les manipulacions amb els dissolvents es facin sota la campana de gasos.

4. Procediment

La part experimental està desenvolupada en la seva totalitat. El professorat té un marge de llibertat per canviar els valors de les mesures (massa i volum) i aproximar-los als seus propis treballs de recerca. També s'inclou un esquema simplificat amb els processos que s'han de desenvolupar en l'experiència. Tot el procediment es fa tres vegades per disminuir l'error d'una sola mesura.

- 1) Obtenció d'un tros de kiwi i d'alvocat (pot guardar-se congelat). Peseu acuradament, de cada fruita, tres trossos d'uns 0,5 g cadascun (seguiu puntualment el procediment de pesada). Cal apuntar el pes amb les xifres significatives adients, es suficient que la balança sigui sensible fins els cg.
- 2) Utilitzeu sis tubs de vidre gruixut amb tap de rosca i cercle de tefló perquè tanqui hermèticament i, així, evitar pèrdues dels dissolvents orgànics.
- 3) Afegiu, a cada tub, 10 mL de la mescla prèviament preparada d'hexà/isopropanol (3/2 v/v).

Compte! Seguiu les normes de seguret.

- 4) Etiqueteu els tubs (si es marquen amb un retolador de vidre, podria esborrar-se en cas que es produís una pèrdua dels dissolvents). Es col·loquen les mostres, una a dins de cada tub, submergides dins de la mescla de dissolvents. Es tapen els tubs i es col·loquen en un agitador orbital durant tota la nit per aconseguir l'extracció total dels lípids.
- 5) L'endemà, els lípids s'hauran extret i dissolt en la mescla de dissolvents, de manera que les proteïnes i la majoria de glúcids hauran quedat en el tros de fruita sense dissoldre. Es filtra amb un embut i una petita bola de cotó i es recull l'extracte lipídic en un altre tub de rosca (cal canviar l'embut i el tros de cotó per a cada mostra).
- 6) S'afegeixen 3 mL de sulfat de sodi 0,47 mol/L en cada tub i s'agita per inversió; tot seguit es col·loquen els tubs en l'agitador orbital durant 5 minuts i es deixa reposar uns 5 minuts fins que les dues capes quedin ben definides. La superior d'hexà conté els lípids que ens interessin i la inferior, amb la mescla d'isopropanol/aigua/sulfat sòdic, conté les substàncies polars no lipídiques.
- 7) Amb una pipeta Pasteur es passen els aproximadament 6 mL de la dissolució dels lípids en hexà de cada tub a un motllo d'alumini diferent per a cada mostra i prèviament tarat. S'evapora l'hexà a la campana de gasos amb una font de calor adient. Si s'evapora sense font de calor es pot deixar fins el dia següent. Es pesa de nou el motllo amb els lípids i per diferència amb el pes del motllo buit obtenim la quantitat de lípids presents en cada mostra.

Vegeu l'esquema adjunt.

Si es creu oportú continuar amb la identificació dels lípids presents en els extractes obtinguts, abans de fer l'evaporació se separa 1 mL de la barreja lipídica i es guarda en un tub Eppendorf per dur a terme la cromatografia en capa prima.

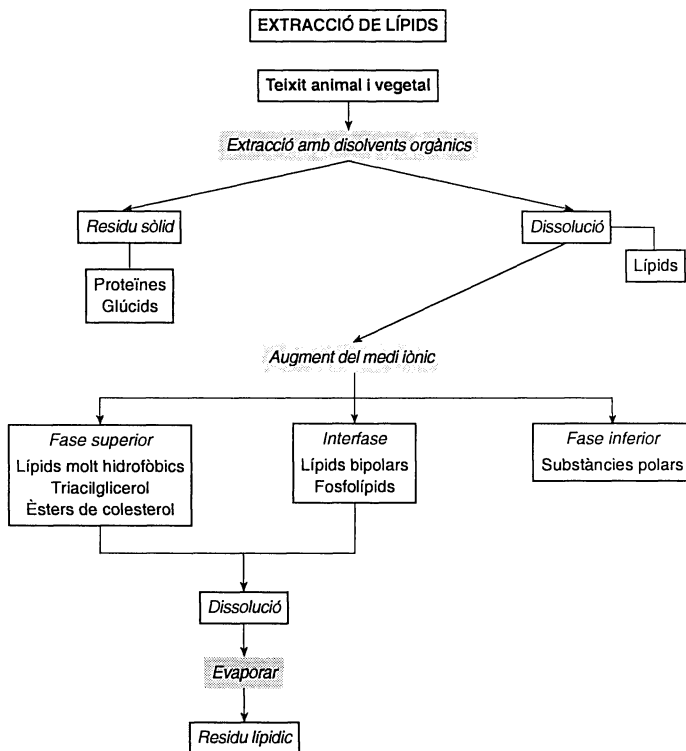


FIG. I.I Extracció de lípids

5. Resultats i discussió

Els resultats han de ser clars i completament desenvolupats. Cal recalcar la importància de les xifres significatives i en tots ells calcular les desviacions estàndards per tal que l'alumnat no adquireixi la falsa idea que un sol experiment ja dona un resultat conclouent.

La discussió dels resultats ha de girar sobre la comprensió, les possibles aplicacions i el desenvolupament global del treball.

5.1. Resultats

Pes del tros de kiwi 1: **1,26 g**

Pes del tros de kiwi 2: **0,60 g**

Pes del tros de kiwi 3: **0,78 g**

Motllo (1) buit: **0,863 g**

Motllo (1) + lípids (1): **0,866 g**

Motllo (2) buit: **0,864 g**

Motllo (2) + lípids (2): **0,865 g**

Motllo (3) buit: **0,860 g**

Motllo (3) + lípids (3): **0,862 g**

$[(\text{motllo lípids} - \text{motllo buit}) / \text{grams de mostra}] \times 100$

Mitjana dels tres resultats: $(0,24 + 0,17 + 0,26) / 3$

Resultat global: 0,22 +/- 0,03 % de lípids

Pes del tros d'alvocat 1: **1,30 g**

Pes del tros d'alvocat 2: **0,70 g**

Pes del tros d'alvocat 3: **0,86 g**

Motllo (1) buit: **0,858 g**

Motllo (1) + lípids (1): **0,966 g**

Motllo (2) buit: **0,860 g**

Motllo (2) + lípids (2): **0,975 g**

Motllo (3) buit: **0,863 g**

Motllo (3) + lípids (3): **0,998 g**

$[(\text{motllo lípids} - \text{motllo buit}) / \text{grams de mostra}] \times 100$

Mitjana dels tres resultats: $(8,30 + 16,4 + 15,7) / 3$

Resultat global: 13,5 +/- 3,1 % de lípids

5.2. Discussió

- Els resultats ens indiquen que, en aquestes fruites tropicals, la quantitat de lípids presents en cada una és força diferent. També cal tenir present que en el cas de l'alvocat la quantitat de lípids per gram de fruita depèn de la part de la fruita analitzada, això vol dir que les tres mostres d'alvocat han de ser de la mateixa zona.
- Els greixos presents en totes dues fruites no tenen per què tenir, necessàriament, la mateixa composició química. Per poder determinar-la caldria desenvolupar una separació per cromatografia en capa prima.
- *Lligada a la introducció específica de cada treball.*
- ...

6. Conclusions

Aquest apartat ha d'incloure les conclusions del treball que contestin les preguntes inicials dels objectius i, com a calaix de sastre, també pot incloure totes les conclusions que l'alumnat pugui fer amb referència a ciència, tecnologia i societat, així com les seves pròpies conclusions personals.

- La quantitat de lípids totals presents en el kiwi és pràcticament negligible.
- La quantitat de lípids totals presents en l'alvocat varia entre el 8 i el 16 % segons la part de la fruita analitzada.
- *Lligada a la introducció específica de cada treball.*
- Aspectes personals d'aprofitament i d'interès que ha despertat l'elaboració d'aquest treball de recerca.
- ...

7. Bibliografia

Ha de ser adequada al nivell final del treball de recerca i que pugui ser assolida, tant la informació com la bibliografia, pel nostre alumnat. Ha de ser de fàcil localització, ja sigui en les biblioteques dels centres com en les biblioteques públiques:

- Institut Nacional de Seguretat i Higiene en el Món Laboral. *Guia de riesgos químicos*. Barcelona: NIOHS/OSHA, 1982.
- Llibres de text de biologia (2n de batxillerat i COU).
- Llibres de bioquímica general.
- Revistes de divulgació científica.
- TINAJAS, ANTONIO. *Cuerpomente*. 1998, núm. 22, pàg.77.
- ...

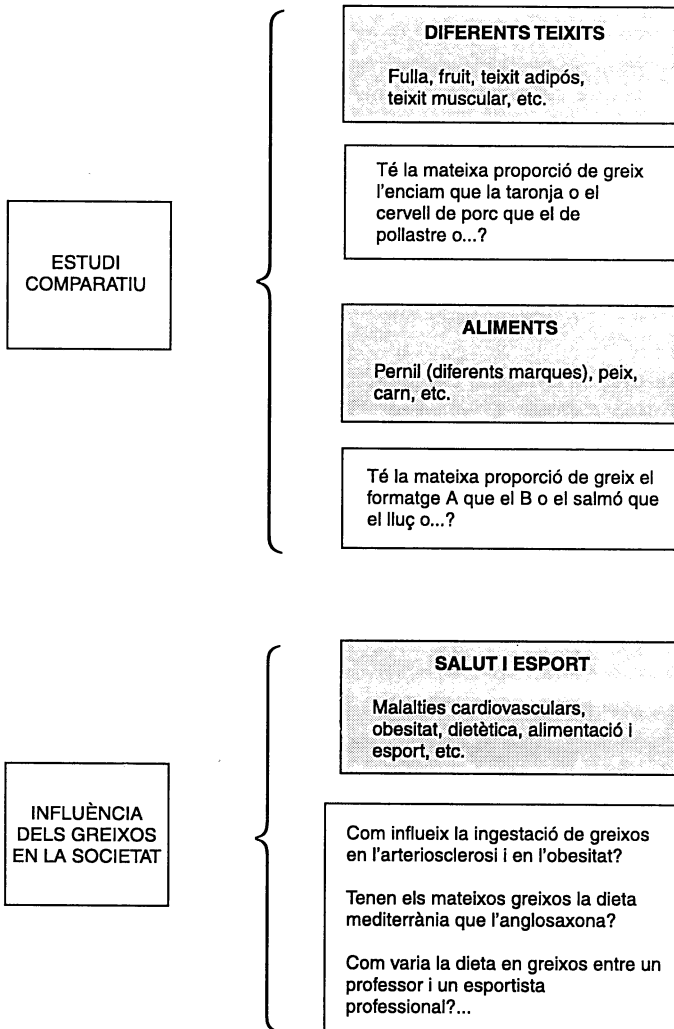


FIG. 1.2. Treballs de recerca relacionats amb greix a la carta

COMBAT ALS BACTERIS

Narciso Campos

1. Objectius

Determinació de la sensibilitat o resistència a antibiòtics en el bacteri Escherichia coli.

Possibles preguntes a desenvolupar en diferents treballs de recerca:

- Com s'aconsegueix el creixement òptim d'E. Coli?
- Un determinat antibiòtic pot ser efectiu en qualsevol malaltia infecciosa?
- L'antibiòtic tetraciclina pot combatre l'E. Coli?
- ...

2. Introducció

2.1. Antibiòtics

- Concepte i propietats bàsiques
- Utilització en terapèutica
- Determinació de l'espectre d'acció
 - Factors que afecten l'efectivitat dels antibiòtics
 - Possibles efectes adversos i contraindicacions
 - Importància de la utilització controlada
- Classificació per tipus de molècula i mecanisme d'acció
 - Descripció de l'antibiòtic o antibiòtics utilitzats

- Producció d'antibiòtics
 - En cultiu de microorganismes
 - Síntesi química

2.2. *Escherichia coli* com a sistema d'estudi

- Hàbitat i fisiologia
- Composició del medi de cultiu

3. *Material i reactius*

3.1. Material Biològic

- Soca d'*E. coli* de control, no resistent a cap antibiòtic.
- Diverses soques d'*E. coli* resistents almenys a un dels antibiòtics següents: ampicil·lina, kanamicina, cloramfenicol i tetraciclina.

No biològic

- Balança amb precisió de mil·ligrams
- Espàtula
- Vials o tubs de vidre amb tap hermètic, per a volums de 5 a 15 mL
- Pipetes d'1 i 10 mL amb els pipetejadors corresponents
- Provetes de 250 mL
- Erlenmeyers de vidre *pyrex*
- Paper d'alumini
- Olla de pressió
- Guants per a aïllament tèrmic
- Guants de làtex o vinil
- Termòmetre
- Bec Bunsen (instal·lat en una superfície llisa i horitzontal)
- Plaques de Petri estèrils
- Nansa de nítró
- Retolador per a vidre

3.2. Reactius

- Almenys, un dels antibiòtics següents:
 - Ampicil·lina (Roche Diagnostics SL. Ref. 835242)
 - Kanamicina (Gibco/BRL Ref. 11815-024)
 - Cloramfenicol (Roche Diagnostics SL. Ref. 634433)
 - Tetraciclina (Roche Diagnostics SL. Ref. 109428)
- Aigua destil·lada
- Etanol absolut
- Clorur de sodi
- Triptona (Hispanlab/Pronadisa. Ref. 1612.00)
- Extracte de llevat (Hispanlab/Pronadisa. Ref. 1702.00)
- Agar bacteriològic (Hispanlab/Pronadisa. Ref. 11802.00)

3.3. Valoració de riscos

- Els antibiòtics són nocius. Eviteu la inhalació i el contacte amb la pell. Durant la pesada, treballeu amb guants de làtex o vinil.
- Feu servir els guants d'aïllament tèrmic per tal d'evitar cremades.
- L'etanol és inflamable. No l'aprobeu mai a les fonts de calor.
- Un cop acabat l'experiment heu de matar els bacteris. Cobriu la superfície de l'agar amb lleixiu (3-4 mm de profunditat) i deixeu-ho d'un dia per l'altre. Finalment, podeu llençar el líquid al desguàs i les plaques a les escombreries.

4. Procediment

4.1. Disseny experimental

Com a primera aproximació, es recomana fer un experiment simple amb un sol antibiòtic (ampicil·lina, per exemple). En aquest experiment, s'haurien de preparar dos medis de cultiu (un amb antibiòtic i l'altre sense) i s'haurien d'assajar dues soques d'*E. coli* (una resistent i l'altra no resistent o de control). Posteriorment, es podrien fer experiments més complexos,

utilitzant més d'un antibiòtic alhora (individualment o en combinació) i diferents soques d'*E. coli* portadores d'una o diverses resistències. Consulteu l'esquema I i la taula I per elaborar dissenys experimentals concrets. La preparació i l'execució de cada experiment poden ser dividides en les tres fases que són descrites a continuació.

4.2. Preparació de les solucions d'estoc d'antibiòtics

- 1) Poseu un vial de vidre a la balança de precisió i tareu a zero. Introduïu en el vial de 30 a 200 mg de l'antibiòtic que desitgeu (consulteu la taula I).
- 2) Calculeu el volum de dissolvent necessari per ajustar la concentració desitjada. Afegiu el dissolvent al vial.
- 3) Tanqueu-lo hermèticament i agiteu-lo fins que l'antibiòtic es dissolgui completament.
- 4) Feu servir la solució d'estoc immediatament o deseu-la en el congelador a -20°C .

Taula I. Antibiòtics*			
	Solució d'estoc		Medi de Cultiu Concentració
	Concentració	Dissolvent	
Ampicil·lina	40 mg/mL	Aigua destil·lada	100 µg/mL
Kanamicina	40 mg/mL	Aigua destil·lada	100 µg/mL
Cloramfenicol (alta concentració)	34 mg/mL	Etanol absolut	170 µg/mL
Cloramfenicol (baixa concentració)	6,8 mg/mL	Etanol absolut	17 µg/mL
Tetraciclina**	6 mg/mL	Etanol al 70 %	15 µg/mL

* Els antibiòtics no poden ser sotmesos a les condicions d'esterilització (alta temperatura i pressió), ja que es farien malbé. Per tant, han de ser afegits al medi després de l'esterilització, quan la temperatura del medi ha baixat a $50-55^{\circ}\text{C}$.

** La tetraciclina és sensible a la llum. La solució d'estoc d'aquest antibiòtic ha de ser protegida amb paper d'alumini. Les plaques que continguin tetraciclina s'han d'emmagatzemar i d'incubar sempre a les fosques

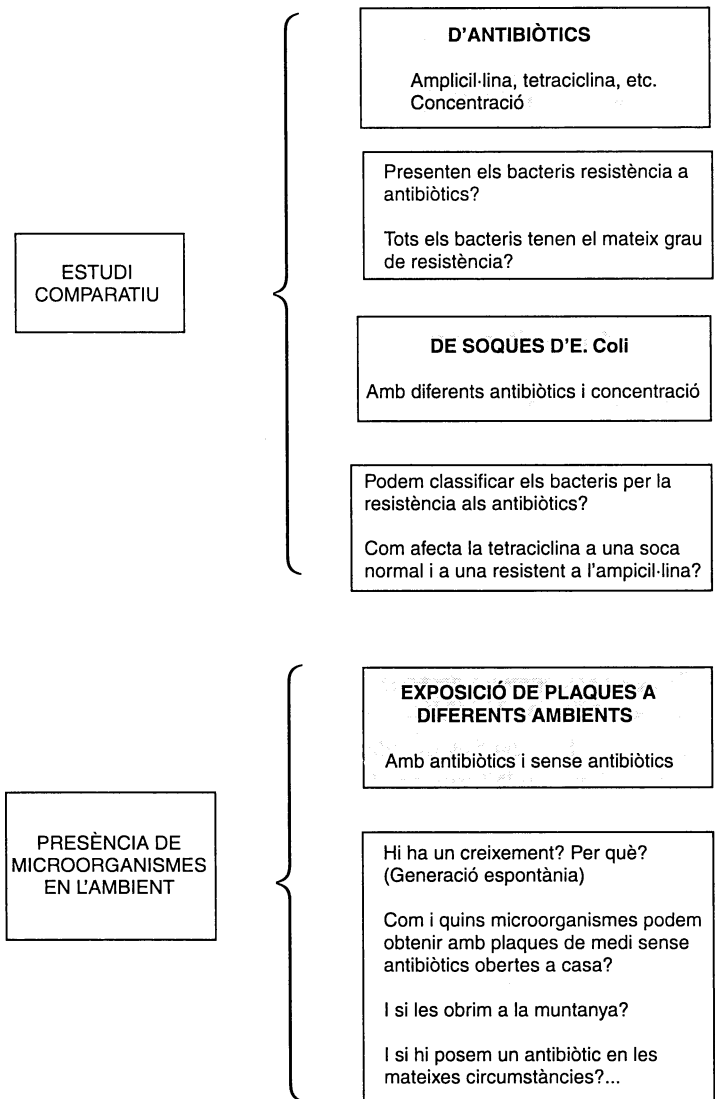


FIG. 2.1. Treballs de recerca relacionat amb "Combat als bacteris"

4.3. Preparació del medi de cultiu LB en plaques de Petri

- 5) Introduïu en un Erlenmeyer de 250 mL 2 g de triptona, 1 g d'extracte de llevat, 1 g de clorur de sodi i 3 g d'agar bacteriològic. Afegiu 200 ml d'aigua destil·lada. Aquestes quantitats poden ser canviades proporcionalment. Tapeu la boca de l'Erlenmeyer amb 4 capes de paper d'alumini.
- 6) Poseu l'Erlenmeyer dintre d'una olla de pressió que contingui una mica d'aigua (de 4 a 6 cm d'altura). Tanqueu l'olla i escalfeu-la a foc màxim fins que la pressió arribi al seu valor de treball. Abaixeu el foc al mínim i escalfeu-la en aquestes condicions durant 30 minuts. Apagueu el foc.
- 7) Obriu l'olla quan la pressió i la temperatura hagin disminuït suficientment. Afegiu aigua a l'olla perquè la temperatura baixi a uns 60°C (controleu-la amb el termòmetre). Espereu 15 minuts per tal que el medi de l'Erlenmeyer també es refredi. Metrestant, feu el pas següent.
- 8) Netejeu i desinfecteu (amb etanol) l'antosta de treball. Enceneu el bec Bunsen per crear un ambient d'esterilitat. A partir d'aquest moment, treballeu a les proximitats de la flama.
- 9) Traieu l'Erlenmeyer de l'olla quan la temperatura d'aquesta sigui d'uns 50-55°C. Afegiu-hi l'antibiòtic i torneu-la a tapar. Agiteu suaument fent cercles per distribuir l'antibiòtic homogèniament. Eviteu al màxim la formació de bombolles.
- 10) Vesseeu aproximadament 25 mL de medi a cada placa de Petri (uns 4 mm d'alçària de medi). Deixeu les plaques una mica obertes a les proximitats de la flama, durant un quart d'hora. Torneu a tancar les plaques i deseueu-les, convenientment etiquetades, a la nevera (4°C), fins que s'hagin de tornar a utilitzar.

4.4. Sembrada de les plaques i creixement dels bacteris

Treballeu a les proximitats del bec Bunsen

- 11) Flamejeu la nansa de nítró fins que es posi incandescent. Retireu la nansa de la flama i espereu mig minut perquè es refredi. Amb

la nansa estèril, agafeu una mostra de bacteris i distribuïu-la en el medi de la placa de Petri, a prop d'una vora.

- 12) Torneu a esterilitzar la nansa. Espereu que es refredi i escampeu els bacteris dipositats al medi fent traços que s'encreuin amb els traços fets anteriorment (sembla escocesa). D'aquesta manera s'aconsegueix la dispersió de les cèl·lules i l'aparició posterior de colònies aïllades. Tingueu en compte de no foradar el medi.
- 13) Incubeu les plaques en posició invertida d'l a 3 dies amb una temperatura d'entre 22 i 37°C. Com més pròxima a 37°C (temperatura òptima) sigui la temperatura d'incubació, més ràpid serà el creixement.

5. Resultats i discussió

S'ha d'observar la presència o absència de creixement en les distintes condicions experimentals. La comparació de les soques d'*E. coli* estudiades permetrà classificar-les, d'acord amb la seva resistència als antibiòtics.

Depenent de com s'hagi fet la distribució en plaques, apareixeran zones de cultiu continu o colònies ben separades. Cada colònia deriva d'una sola cèl·lula i, per tant, està formada per cèl·lules genèticament idèntiques (les mutacions són improbables). L'aspecte de les colònies és característic de cada espècie bacteriana. L'alumne ha de descriure el fenotip observat.

6. Conclusions

- *In vitro*, els antibiòtics són molt efectius com a inhibidors del creixement per a aquells bacteris que no porten el corresponent factor de resistència.
- Lligades al disseny experimental concret que s'hagi fet servir.
- Aspectes personals i d'aprofitament que hagi despertat l'elaboració d'aquest treball.
- ...

7. Bibliografia

- R. M. BERGOGLIO. *Antibióticos*. 4a edició. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, 1985.
- HAMMOND, S. M.; LAMBERT, P. A. *Antibióticos y acción antimicrobiana*. Barcelona: Editorial Omega, 1980 (Colección Cuadernos de Biología).
- GLASBY, J. S. *Enciclopedia de antibióticos*. Ac cop., 1978.
- *Enciclopèdia de Medicina i Salut*. Volum 7: *Malalties infeccionses, Sistema Inmunitari, Genètica*. Barcelona: Fundació Enciclopèdia Catalana, 1992.
- *Gran Enciclopedia de la Ciencia y de la Técnica*. Barcelona: Ed. Océano, 1982.
- Llibres de text de biologia (COU).

LA INTEL·LIGÈNCIA DE LES PLANTES

Alejandra Bruna

Mònica Morales

1. Objectius

Estudi de fenotips en *Arabidopsis thaliana*.

Possibles preguntes a desenvolupar en diferents treballs de recerca:

- Creix d'igual manera una planta en la llum que en la foscor?
- Varia el fenotip d'una planta diürna si creix en la foscor?
- El medi de cultiu afecta el creixement d'una planta?
- ...

2. Introducció

- Conceptes bàsics
 - Gen
 - Caràcter
 - *Locus*
 - Cromosoma
 - Al·lel
 - Genotip
 - Fenotip
- Què és el DNA?
 - Estructura i funció del DNA
 - Concepte de replicació, transcripció i traducció
- Com influeixen les condicions atmosfèriques en el desenvolupament d'*Arabidopsis thaliana*?

3. Materials i reactius

3.1. Materials

- Bec Bunsen
- Cristallitzador sense pic de vidre pyrex
- Pipeta Pasteur o comptagotes
- Paper de filtre
- Test
- Vareta de vidre
- Vas de precipitats
- Tubs d'assaig
- Paper de parafilm
- Morter
- Bany maria
- Centrífuga (opcional)
- Gasa estèril

3.2. Solucions

Solució de nutrients minerals

KNO ₃	5 mmol/L
K ₃ PO ₄ (pH 5,5)	2,5 mmol/L
MgSO ₄	2 mmol/L
Ca(NO ₃) ₂	2 mmol/L
FeNa. EDTA	50 mmol/L
Solució de micronutrients	0,1%

Solució de micronutrients

H ₃ BO ₃	70 mmol/L
MnCl ₂	14 mmol/L
CuSO ₄	500 mmol/L
ZnSO ₄	1 mmol/L
NaMoO ₄	200 mmol/L
NaCl	10 mmol/L
CoCl ₂	10 mmol/L

Tampó d'EX-DNA

Tris-HCl pH	100 mmol/L
EDTA	50 mmol/L
NaCl	500 mmol/L
β -mercaptoetanol	10 mmol/L

3.3. Reactius

- Agar-agar
- Torba *rubia* de *Sphagnum*
- Sorra rentada (granulometria 0/3 mm)
- Sacarosa
- Tritó X-100 o lleixiu
- SDS al 20 % o detergent
- Acetat de potassi 5 mol/l pH 4,8
- Isopropanol
- *Arabidopsis thaliana* varietat *Columbia*

3.4. Valoració de riscos

Les substàncies i preparats químics que són manipulats en un laboratori, que poden presentar perillositat, es poden agrupar en: substàncies asfixiants, explosives, comburents, inflamables, tòxiques, corrosives, irritants, perilloses per al medi ambient, carcinògenes, mutàgenes, teratògenes i al·lèrgiques.

En aquesta pràctica s'utilitzen alguns productes que presenten alguna d'aquestes característiques:

- β -mercaptoetanol: és una substància nociva per al cos humà i perillosa per al medi ambient. Per tant, cal evitar-ne la inhalació, la ingestió o la penetració cutània. També cal tenir en compte que la seva utilització suposa un risc per al medi ambient. S'aconsella treballar sota la campana.

- Les solucions concentrades d'àcids i àlcals són corrosives, com per exemple l'àcid bòric. Cal evitar-ne el contacte amb els teixits perquè pot tenir efectes destructius sobre ells.
- Isopropanol: és inflamable.

D'altra banda, s'han de tenir en compte certes mesures generals de seguretat al laboratori com és el fet de no olorar ni tastar cap dels productes utilitzats al laboratori, fer sota la campana tota reacció en la qual es desprenguin olors irritants, perilloses o desagradables, i avisar immediatament l'instructor en cas d'accident.

4. Procediment

Per al cultiu de plantes es poden seguir dues metodologies:

- a) Cultiu en terra
 - b) Cultiu en agar
- a) En el primer cas, es dipositen les llavors amb ajuda d'una pipeta Pasteur en un test amb torba de *Sphagnum* i arena rentada de riu en una proporció 4:1 i s'irriga periòdicament (un cop per setmana) amb una solució de nutrients minerals. En cas que no es disposi d'aquesta solució, es pot irrigar la planta amb aigua destil·lada, tot i que no és aconsellable. Durant la germinació i per tal de mantenir un alt grau d'humitat, els testos es cobreixen amb un plàstic, el qual es retira al cap de 10 dies aproximadament.
- b) Per al cultiu en agar, s'agafen les llavors i se sotmeten a un procés d'esterilització superficial tractant-les amb una solució d'hipoclorit sòdic al 5 % (lleixiu comercial) i tritó X-100 al 0,02 % durant 10 minuts, seguit de 3 rentades amb aigua destil·lada estèril. Un cop finalitzat el procés, es dipositen damunt un paper de filtre estèril i es distribueixen sobre el suport sòlid amb l'ajuda d'una pipeta Pasteur.

Suport sòlid: solució de nutrients minerals suplementada amb 1 % de sacarosa i 0,7 % d'agar. S'esterilitza mitjançant una olla de pres-

sió (de 20 a 30 minuts a 1,2 atm) i es reparteix en diferents cristal·litzadors estèrils, els quals s'han de tapar amb paper de plàstic per evitar possibles contaminacions.

Com que la germinació d'*Arabidopsis* és afavorida pels dies més freds de l'hivern, és necessari en ambdós casos un tractament previ de les llavors a 4°C durant 4-7 dies (vernalització).

4.1. Cultiu de plantes d'*Arabidopsis thaliana*

- 1) S'agafen 10 llavors i es cultiven separatament en un test amb terra, tal com s'ha explicat a l'apartat a.
- 2) Es deixen créixer a 22-24°C i se sotmeten a un fotoperíode de 16 h de llum i 8 h de foscor durant un mes o mes i mig.
- 3) Un cop les llavors estiguin formades, es tallen les plantes i es deixen a temperatura ambient fins que les llavors estiguin seques.
- 4) Es fan passar les llavors per un sedàs, es guarden en paper de filtre a la nevera durant el temps necessari i es fan servir com a estoc per a tots els experiments.

4.1.1. *Experiment núm. 1: per què diem que les plantes són intel·ligents?*

- 1) S'agafen 20 llavors i es reparteixen en dos cristal·litzadors diferents seguint el protocol de cultiu en agar explicat a l'apartat b.
- 2) Es deixen créixer durant 5-8 dies en dues condicions de llum diferents:
 - Un dels cristal·litzadors se sotmet a un fotoperíode de 16 h de llum i 8 h de foscor a una temperatura de 22-24°C.
 - L'altre cristal·litzador es deixa en la foscor i a la mateixa temperatura.

És important que les condicions de foscor siguin estrictes fins al final de l'experiment.

- 3) Quan hagin crescut les plàntules es diferenciarà el fenotip de la plàntula crescuda en la llum del de la crescuda en la foscor.
- 4) Dibuixeu i comenteu les diferències entre les plàntules crescudes en la llum i les crescudes en la foscor.

4.1.2. Experiment núm. 2: extracció de DNA de vegetals

El DNA genòmic s'obindrà a partir de les fulles de roseta d'*Arabidopsis*.

- 1) Tritureu 2-3 g de teixit totalment congelat (el rendiment habitual és de 15 mg de DNA per gram de teixit) en un morter fins que aconsegiu una pols fina; tot seguit transferiu-lo a un tub d'assaig.
- 2) Afegiu 15 mL de tampó EX-DNA i 1 mL d'SDS al 20 %. Tapeu el tub d'assaig amb paper de parafilm, agiteu-lo i incubeu-lo 10 minuts a 65°C.
- 3) Afegiu-hi 5 mL d'acetat potàssic 5 mol/L pH 4,8, agiteu-ho i incubeu-ho 20 minuts en gel.
- 4) Centrifugueu a màxima velocitat o opcionalment deixeu-ho sedimentar tota la nit a temperatura ambient.
- 5) Agafeu el sobrenedant i transferiu-lo a un tub d'assaig nou passant-lo a través d'una gasa estèril. Descarteu el sediment.
- 6) Afegiu-hi 10 mL d'isopropanol. Invertiu el tub diverses vegades fins a l'aparició d'un precipitat viscos que correspon al DNA genòmic.
- 7) El DNA genòmic format es pot pescar amb una vareta de vidre.

5. Resultats i discussió

5.1. Resultats

Les plàntules exhibeixen diferents fenotips segons creixin en la llum o en la foscor:

- *fenotip en llum*: les plàntules tenen hipocòtils poc elongats i cotilèdons grans i estesos.

- *fenotip en foscor*: les plàntules tenen hipocòtils llargs i cotilèdons petits i tancats.

Es pot observar que l'extracció del DNA es produeix en un medi salí i en presència d'isopropanol. Els filaments de DNA s'adhereixen a la vareta de vidre.

5.2. Discussió

Atesos els resultats obtinguts, i lligat amb el títol de la pràctica, *per què creieu que les plantes són intel·ligents?* Heu de pensar que en aquest cas tenim dues plantes portadores de la mateixa informació genètica que adopten morfologies diferents durant el seu desenvolupament. Com que la llum és necessària i indispensable per a la fotosíntesi i, per tant, per a la vida de les plantes, si fem créixer una planta en condicions de foscor possiblement morirà. Però abans de morir, lluita per la supervivència i, per tant, per trobar un raig de llum: per això allarga el seu hipocòtil. També manté els cotilèdons tancats perquè no li serviria de res mantenir-los grans i estesos. Aquestes diferències es basen en l'expressió diferencial dels gens d'un mateix organisme: d'acord amb les condicions ambientals, se n'activaran uns o altres segons la conveniència de la planta.

6. Conclusions

- Les condicions atmosfèriques (temperatura, llum, humitat, etc.) poden fer variar el comportament d'una planta, de manera que apareixen diferents fenotips segons els gens que s'expressen en les diferents condicions.
- Les plantes tenen intel·ligència, però una intel·ligència que delimitada per la dotació gènica.
- El DNA genòmic té una estructura i unes propietats que ens permeten observar-lo en forma de massa viscosa.

7. Bibliografia

- *Ciencias de la Naturaleza Botànica I i II*. Ed. Planeta.
- Walbot, Virginia; Holder, Nigel. *Developmental Biology*. Nova York: Random House, 1987.
- BALLESTEROS, Manuel. Seguretat i tècniques de laboratori. Ed. Teide. Barcelona, 1997.
- FONT I QUER, Pius. *Iniciació a la Botànica*. Ed. Fontalba. 1ª Ed. Castellano, 1982.
- Revistes de divulgació científica.
- ...

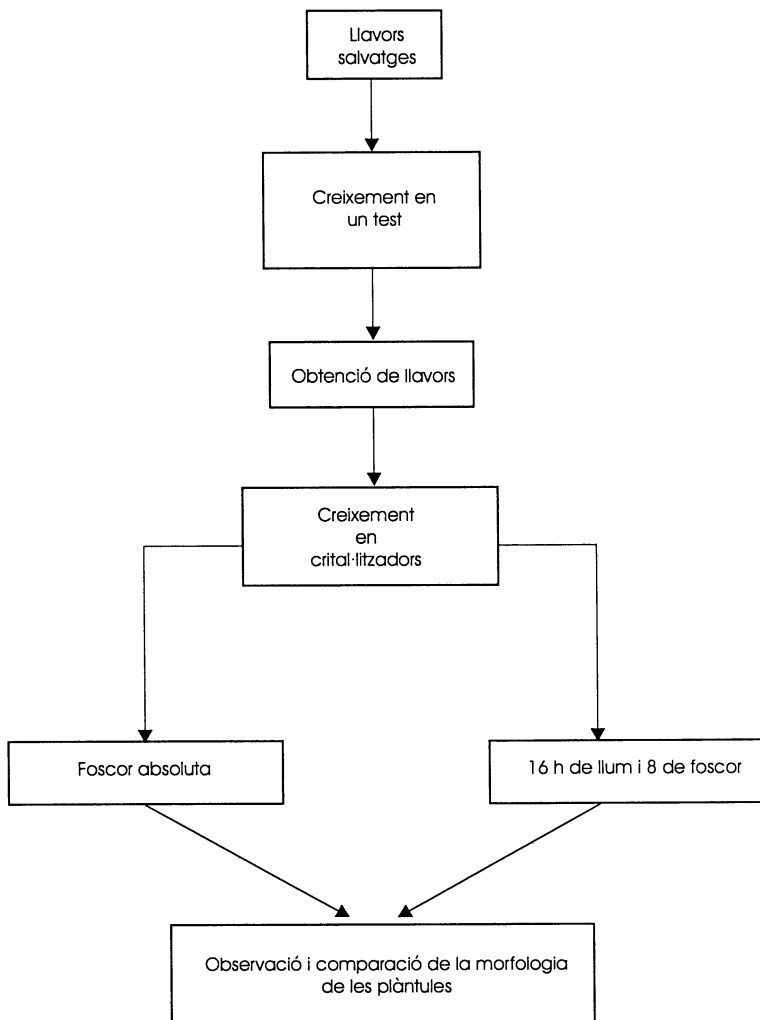


FIG. 3.1. *La intel·ligència de les plantes*

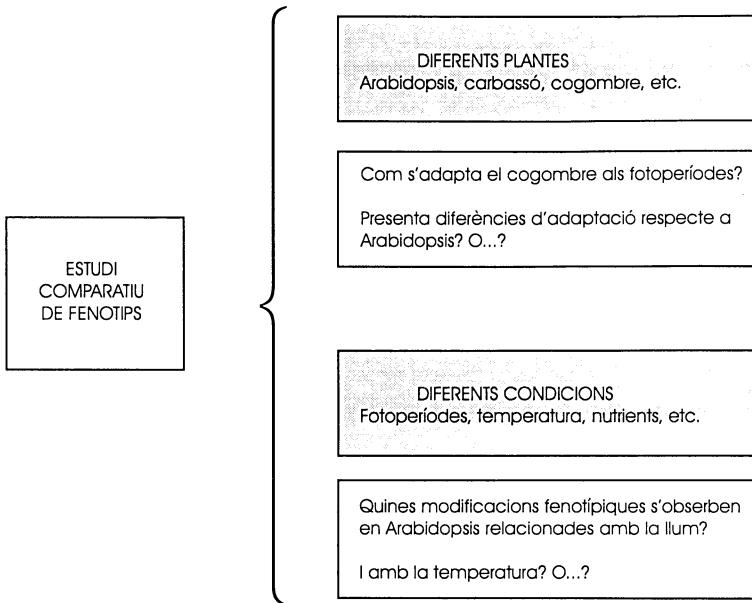


FIG. 3.2. Treballs de recerca relacionats amb la intel·ligència de les plantes.

1. Objectius

Cerca de nous gens o a partir d'un gen conegut d'una determinada espècie cercar els gens d'altres espècies a través d'Internet.

Possibles preguntes a desenvolupar en diferents treballs de recerca:

- *Quines poden ser les estructures d'una determinada proteïna a partir del seu cDNA?*
- *Quina similitud hi ha entre el gen de la proteïna X de ratolí i el de la mateixa proteïna humana?*
- ...

2. Introducció

- Dels gens a les proteïnes.
- Llibreries de cDNA (anex)
 - Bases de dades de seqüències de nucleòtids i d'aminoàcids.
 - Cerca d'EST corresponents als cDNAs que codifiquen per les proteïnes d'interès (anex)
- Selecció d'EST interessants corresponents a nous gens.
- ...

3. Material

- Ordinador PC (amb windows 95-98) o Macintosh connectat a xarxa.
- Software: Programa per tractament de text (MSWord de l'Office o similar) i navegador d'Internet (Windows Explorer o Netscape versió 4.0 o superior).

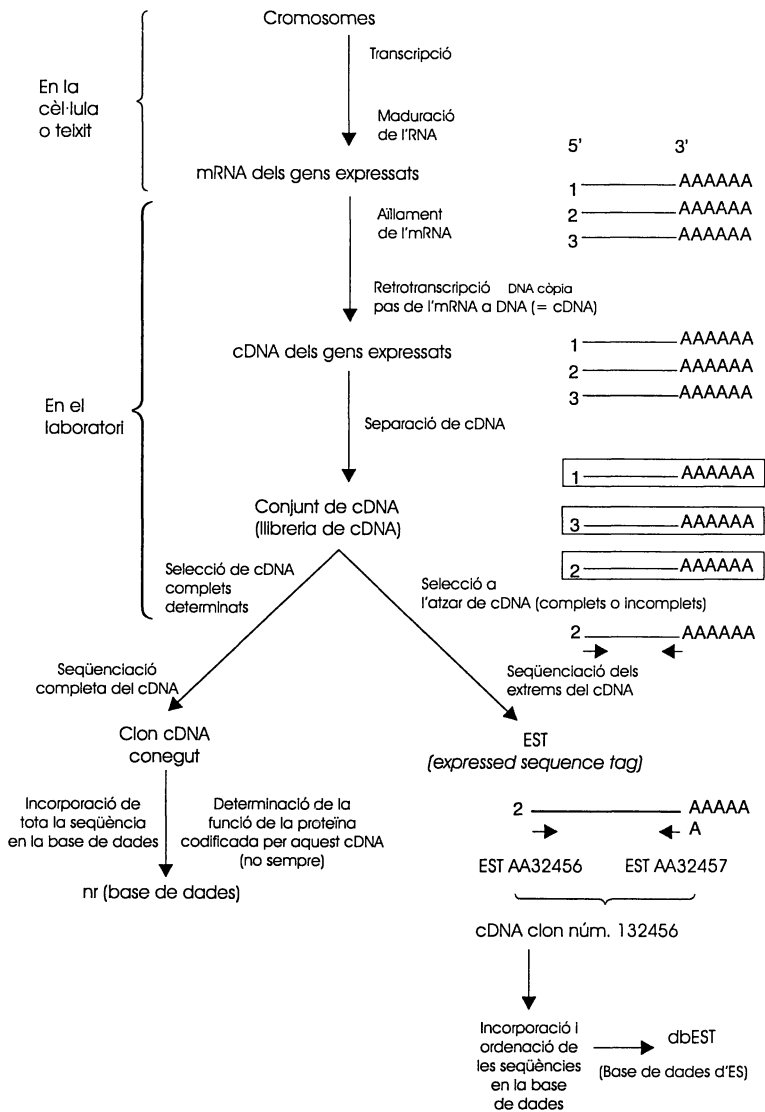


FIG. 4.1. Esquema de la construcció d'una biblioteca de cDNA.

(És recomanable que l'alumne tingui nocions bàsiques de l'ús de l'ordinador i de tractament de textos. També és necessari un nivell bàsic d'anglès)

4. Procediment

- 1) Escollir la família de proteïnes a analitzar, dependrà dels interessos de cada grup. A partir del programa GenBank es crea un document amb les seqüències de nucleòtids i d'aminoàcids de tots els membres. Com exemple prendrem la família de proteïnes humanes X (els seus membres seran X1, X2, etc.). Cada membre de la família que ja hagi estat seqüenciat tindrà assignat un número de entrada (*Accession number*). Es pot realitzar una cerca de les seqüències dels cDNAs per paraules claus. Si, per exemple, es vol aconseguir la seqüència de la Lactat deshidrogenasa humana, només cal buscar, a través del Query GenBank Database posant "*lactate dehydrogenase*". S'obté més d'una entrada d'aquesta proteïna i s'escull la "*complete cds*" (seqüència codificant de DNA complerta). Un cop es visualitza la matricula de la proteïna es fa *copiar-enganxar* de les seqüències de DNA i proteïna i es crea els nostres propis documents en un programa de tractaments de textos. També s'incorporen les seqüències d'altres espècies, ja que ens donaran informació a l'hora de fer el Multialineament.

(no heu d'escriure cap títol)

> hX1 (La h denota que és seqüència humana. Per a ratolí posem m i per a rata posem r. El programa de multialineaments reconeix el símbol > com a seqüència nova.)

atggtagctagctgacatgcatgcatgctgatgcagtc... (La seqüència podrà estar en qualsevol tipus de lletra i amb numeració - per si s'agafa del Genbank.)

> mX1

ttagatcggatcctctagtcgatcgatggctagatcg...

> hX2

ggattagccatagcttatagcccgatgcagatgc...

etc.

SeqDNA.doc (nom de l'arxiu de Word o Wordperfect). Fer el mateix per seqProt.doc

- 2) S'obre el programa de Multilineaments i es copien els documents creats en la finestra del programa. Farem "Run ClustalW" S'imprimeix el resultat i es cerquen els valors de coincidència entre parelles (grau d'identitat). Aquests graus d'identitat corresponen al percentatge de nucleòtids o aminoàcids iguals i en la mateixa posició entre dues seqüències. Dues proteïnes de la mateixa espècie, es consideren similars si el grau d'identitat es troba entre el 35 i el 90%. Per les mateixes proteïnes en espècies diferents, el grau d'identitat varia entre: el 70 i 85% si es compara humà amb rata o ratolí i entre el 85 i 95% si es compara ratolí amb rata.
- 3) En aquest punt, cal identificar totes les EST corresponents als gens que ja són coneguts (X1, X2, etc..). Per això, s'introdueix en el programa Unigene (humà, de ratolí o de rata, segons el cas que ens interressi) el número d'accés dels gens X1, X2, ... (cada un per separat). Aparèixer una llista d' EST (poden ser dues o tres-centes), s'ordenen i agrupen en base al gen que corresponguin en un altre document per utilitzar-les més tard. (es preferible ordenar-les alfabèticament amb el Word o Wordperfect). És convenient anotar el número d'accés de les ESTs (del tipus AA34256, AI546738 o bé T65437). Degut a que el programa Unigene pot no ser del tot complert per aquesta cerca, cal fer servir el programa BLAST per assegurar que s'han identificat totes les EST. Així, s'escriu el número d'accés del nostre gen (serà el "Query") en la finestra del programa BLAST i se seleccionen les següents opcions: *BLASTn* (en "program"); *human dbEST*, *mouse dbEST*, o *other EST* depenent de si es busca EST humanes, de ratolí o altres (rata) respectivament (en "database"); *Acc. number* (en "input data as"); i *200* (en "description" i "alignments").
- 4) Es selecciona "Submit". En uns segons (o minuts depenent de la saturació de la xarxa) s'obtenen els resultats: una llista d'EST trobades ordenades segons la identitat que guardin amb la seqüència enviada. Les primeres de la llista seran EST corresponents al nostre gen seguides d'ESTs corresponents als altres membres de la família. Després, apareixen les comparacions de seqüència entre les EST

de la llista i el *nostre gen* (com a “Query” es mostra la seqüència del *nostre gen* i com a “subject” la seqüència de l’EST trobada). Es seleccionen aquelles EST que presentin un 98-100% d’identitat amb el *nostre gen* en una regió superior als cinquanta nucleòtids. Afegirem a la llista d’EST totes aquestes (si és que n’hi ha alguna) que correspondran al *nostre gen* i que no havien aparegut amb el programa Unigene.

- 5) Per aquells que hagin escollit la cerca de gens d’altres espècies (mX2, per exemple) la tasca és molt més senzilla. Es tracta de fer un BLAST, com es descriu a dalt, amb el número d’accés de la seqüència X2 coneguda amb les següents opcions: *BLASTn* (en “program”); *human dbEST*, *mouse dbEST*, o *other EST* depenent de si estem buscant EST humanes, de ratolí o altres (rata) respectivament (en “database”); *Acc. number* (en “input data as”); i *200* (en “description” i “alignments”). Aquelles EST que apareguin en la llista i que presentin (mirant l’alineament) un tant per cent d’identitat corresponent a la identitat entre aquelles espècies (entre el 70 i 85% si comparem humà contra rata o ratolí i entre el 85 i 95% si comparem ratolí contra rata) les considerarem com a ESTs corresponents al mateix gen X2 però d’una altra espècie. Ara, amb el número d’accés d’aquestes ESTs, anirem al programa Unigene (humà, de ratolí o de rata) per aconseguir el màxim nombre d’ESTs. Amb les ESTs seleccionades el pas següent per a qualsevol grup interessat en aquest gen, fóra demanar aquestes ESTs al centre que les ha generat i seqüenciar-les completament.

5. Descripció dels programes

- 1) *Query GenBank Database*: Busca matrícules de gens o d’ESTs en el GenBank per paraules claus o números d’accés.
Adreça http://www2.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/query_form.html
- 2) *Multialineaments*: Compara dues o més seqüències entre elles.
ClustalW_mp Multiple Sequence Alignment
Adreça: <http://www2.ebi.ac.uk/clustalw/>

S'ha de copiar i enganxar el contingut dels arxius SeqDNA.doc o Seqprot.doc i pitjar “*run clustalw*”.

Resultats: el grau d'identitat ve donat per “*Sequences (1:2) Aligned. Score: XX* (és en tant per cent). Això vol dir que les seqüències 1 i 2 (especificades a dalt), un cop comparades, presenten un grau d'identitat del XX %.

Adreces alternatives:

<http://dot.imgen.bcm.tmc.edu:9331/multi-align/multi-align.html>

<http://www.clustalw.genome.ad.jp/>

- 3) *BLAST*: Busca a la base de dades totes aquelles seqüències semblants a la seqüència problema que vulguem. (Veure exemple de pàgina de resultats de *BLAST* més endavant)

Adreça: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/nph-newblast?form=1>

Per introduir les seqüències del nostre gen problema:

- Es pot introduir el número d'accés del gen (posarem en “*input data as*” la opció “*Accession or GI*”).
- Fer *copiar-enganxar* de la seqüència directament a la finestra (posarem en “*input data as*” la opció “*Sequence in FSATA format*”. S'accepta qualsevol format, encara que tingui números.

- 4) *Unigene*: Programa per construir *contigs*, és a dir, grups d'EST que pertanyen al mateix gen.

Adreça: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/Hs.Home.html>

Es pot escollir l'espècie amb la que treballar (humà, ratolí o rata). Simplement s'ha d'introduir el número d'accés de l'EST i pitjar “*Go*”. Apareixerà un *contig*, si es que existeix, del tipus Hs.124536 (per humans). Es pitja a sobra d'aquest per obtenir el llistat de les EST.

6. Bibliografia

- Llibres de text de Biologia.
- Llibres d'introducció a la Bioquímica.
- Llibres o revistes d'introducció a Internet
- Exemples de l'ús d'aquestes tècniques en els següents articles de revistes especialitzades:
 - TORRENTS, *et al.* (1998) *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 273, (49); 32437-32445
 - BANFI, *et al* (1998) *Trends in Genetics*, Vol 14 (2); 80-81.

Annex

Què se'n fa de les llibreries de cDNA? Principalment es fan dos usos:

- a) Identificació d'un cDNA d'interès i
 - b) selecció a l'atzar de cDNAs.
-
- a) La selecció específica de cDNA normalment la fan grups de recerca que ja tenen l'objectiu de trobar aquell gen en concret. Un cop trobat es seqüència completament i d'aquesta seqüència de nucleòtids se'n dedueix la seqüència d'aminoàcids de la proteïna resultant. Aquesta seqüència del cDNA (nucleòtids) de la proteïna resultant (aminoàcids en codis d'una lletra) juntament amb tota la informació sobre funció de la proteïna, localització cromosòmica del gen, etc., s'envia a una base de dades (GenBank o banc de gens al National Center for Biotechnology Information, NCBI). Amb aquesta informació, l'NCBI dona un número d'accés (*accession number*) a aquesta entrada i crea unes fitxes anomenades *matrícules* (una per cada cDNA trobat i analitzat) i les reuneix en una subbase de dades anomenada *nr* (*non redundant*);
 - b) L'altra tasca consisteix en la identificació a l'atzar de cDNAs d'una llibreria determinada. Aquesta tasca la duen a terme centres amb subvencions governamentals (com IMAGE, Merck, i d'altres) i consisteix en la selecció de diferents cDNAs i determinar la seqüència d'un o d'ambdós extrems del cDNA. Cada seqüència obtinguda s'anomena EST (*Expressed Sequence Tag*) i rep un número abans de ser introduïda en el GenBank, en una subbase de dades anomenada *dbEST* (*EST database*). Existeixen dbEST per EST provinents de llibreries de teixits humans, de ratolí i de rata, entre altres. Val a dir que, degut a que la selecció de cDNAs en aquest cas és a l'atzar, és molt probable que un mateix cDNA es seleccioni més d'una vegada donant lloc a que un mateix gen pugui estar representat per moltes (o per cap) ESTs trobades en el mateix o diferent teixit. Aquesta base de dades representa una eina molt important per la identificació de nous gens ja que inclou fragments de la majoria de

gens expressats (al voltant del 80% de tots els gens que es preveu que existeixen) amés de que l'accés és il·limitat i gratuït.

Com podem aprofitar la informació inclosa en aquestes bases de dades? Han aparegut una sèrie de programes accessibles il·limitada i gratuïtament a través de qualsevol navegador d'Internet (com el Netscape) que permeten cercar informació de totes les seqüències compreses en el GenBank (tant dels gens dels quals es coneix la seqüència completa com de les seqüències parcials o ESTs). Entre aquest programes els més útils són:

- 1) Query GenBank Database (es a dir, busca a la base de dades del banc de gens). Aquesta utilitat permet trobar, per paraules claus, aquelles matrícules d'interès;
- 2) BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) que permet, amb diferents opcions, identificar aquelles seqüències de nucleòtids o d'aminoàcids compreses en el GenBank que són idèntiques o semblants a la seqüència problema que nosaltres vulguem. És a dir troba gens o proteïnes semblants al teu;
- 3) EST Assembly machine (màquina d'ensamblatge d'EST). Aquests programes busquen i agrupen (com si fessin un trencaclosques) totes les EST que corresponen a un mateix gen i les ordena. Les més conegudes i emprades són Unigene , TIGEM i THC;
- 4) Programes per Multialineament de seqüències que comparen entre elles dues o més seqüències de nucleòtids o aminoàcids assenyalant aquells nucleòtids o aminoàcids coincidents en totes elles.

L'ús combinat d'aquests programes ens permetrien realitzar una cerca de nous gens a dos nivells:

- 1) És el cas en que coneixem la seqüència d'un gen determinat d'una espècie i vulguem obtenir la seqüència i el cDNA del mateix gen però d'espècie diferent. Actualment les espècies que estan més representades a nivell d'EST són l'home, el ratolí, la rata, la mosca del vinagre (*Drosophila*) i un cuc anomenat *C. elegans*. És a dir, si per exemple, tenim la seqüència humana del gen de l'enzim Lactat des-

hidrogenasa i volem obtenir la seqüència i el cDNA de la Lactat deshidrogenasa en ratolí o rata, farem servir aquestes eines per buscar ESTs de ratolí o de rata que presentin una semblança significativa a nivell de seqüència amb la seqüència humana que coneixem.

- 2) És el cas en que coneixem la seqüència d'un gen determinat de qualsevol espècie i vulguem veure si existeixen gens similars que codificarien per proteïnes amb funcions similars. Si un grup, per exemple, està estudiant els transportadors d'aminoàcids i descobreix un gen nou que codifica per un d'aquest transportadors, podrà analitzar la presència d'altres gens que codifiquin per proteïnes semblants, és a dir per proteïnes amb funcions similars.

MOSQUES I GENS

Àngel Baldán

Alícia Nadal

1. Objectius

Desenvolupament experimental de conceptes bàsics en la genètica de *Drosophila*.

Possibles preguntes a desenvolupar en diferents treballs de recerca:

- *Com preparar cromosomes politènics de *Pisum sp?**
- *Quins són els caràcters lligats al sexe en *Tribolium sp?**
- *Quins són els caràcters somàtics en *Tribolium sp?**
- ...

2. Introducció

- Genètica clàssica i lleis de Mendel
- Conceptes bàsics de Genètica
 - Gen
 - Caràcter
 - Cromosoma
 - Al·lel
 - Fenotip
 - Genotip
 - Homozigosi
 - Heterozigosi
 - Dominància
 - Recessivitat

- Experiments de Mendel
 - Llei de la Uniformitat
 - Llei de la Segregació
 - Llei de la Independència

- Teoria cromosòmica de l'herència
 - L'herència del sexe. Herència lligada al sexe
 - Les mutacions

- Genètica estructural
 - Prova de que el DNA és el portador de la informació genètica.
 - Estructura i funció del DNA
 - Duplicació i transcripció.
 - Traducció. El codi genètic

- Els gens com a portadors de la informació per un determinat caràcter.

3. *Materials i reactius*

3.1. *Materials*

- Soques de *Drosophila melanogaster*
 - normal (per ex. Oregón)
 - *ebony*
 - *yellow*
 - *forked*
 - *white*
 - *black*
 - *vestigial*
 - *stubble*

- Flascons de cultiu.
- Portaobjectes.
- Cubreobjectes.

- Agulles emmanegades.
- Lupa binocular.
- Fitxes de cartulina.
- Pinzells del nº 0.
- Got de precipitats.
- Bunsen.

3.2. Reactius

- Orceïna.
- Àcid acètic glacial.
- Àcid clorhídric.
- Éter etílic.
- Alcohol etílic.

3.3. Valoració de riscos

- *Éter*. Nociu, treballar amb les finestres obertes.
- *Àcid clorhídric i acètic*. Inflamables, irritants.
- *Bunsen*. Vigilar cremades.

4. Procediment

- 1) Anestèsia de *Drosophila*, identificació dels sexes i de diferents marcadors fenotípics

- Preparar l'eterificador i obrir-lo.

Compte amb l'éter! Seguiu les normes de seguretat

- Ràpidament fer un cop sec al pot de les mosques, obrir-lo i passar les mosques a l'eterificador.

Compte! No sobreanestesiari les mosques

- Tirar les mosques anestesiades sobre una cartulina blanca.
- Identificar el sexe fixant-se en la pigmentació de la part distal de l'abdomen (contínua en els mascles i discontinua en les femelles) o bé en la forma i el tamany (els mascles són més petits i tenen l'extrem de l'abdomen més arrodonit que les femelles).

Compte! No manipular-les massa temps o es despertaran

- Estudi de les diferents parts de la *Drosophila*.

2) Encreuaments experimentals

- Anestesiari les mosques seguint el protocol de l'apartat 1).
- Col·locar 3 femelles verges i 3 mascles en cada flascó. Fer sempre els encreuaments recíprocs.



Fenotip
normal

Fenotip
ebony (e)

Fenotip
yellow (y)

Encreuaments: ♂ normal x ♀ *ebony*
 ♂ *ebony* x ♀ normal
 ♂ normal x ♀ *yellow*
 ♂ *yellow* x ♀ normal

- Al cap d'una setmana es retiren els progenitors i s'observen les larves, que excaven galeries en el medi nutritiu.

Compte! La durada del cicle vital i de cada fase de desenvolupament depen de la temperatura de cultiu. Aquest protocol està desenvolupat considerant **20°C**

- Eliminar els insectes summergeint-los en el pot d'etanol.
- La setmana següent, les pupes que han anat apareixent en el paper i les parets eclosionen, i es poden observar els imags.
- Anotar els fenotips de la F₁ i deduir-ne els genotips.

- Creuar 3 femelles i 3 mascles d'aquesta F_1 i procedir com en el primer creuament.
- Eliminar la F_1 la setmana següent.
- Observar la F_2 una setmana després, anotar els fenotips i deduir-ne els genotips.

3) Preparació de cromosomes politènics de *Drosophila*

- Escollir una larva de tercer estadi ben desenvolupada
 - Compte!** Ha d'haver estat cultivada a baixa temperatura (10-12°C)
- Col·locar la larva sobre el porta i estirar suaument amb una llanceta les peces bucals.
- S'arrossegaran les glàndules salivals.
- Amb una agulla emmanegada, eliminar les restes de cossos grassos.
- Immediatament tenyir amb orceïna acètic-làctica.
 - Compte!** Seguiu les normes de seguretat
- Esperar 15-30 min.
- Fixar a la flama.
 - Compte!** Seguiu les normes de seguretat
- Deixar refredar.
- Fer *squash*.
- Observació al microscopi.

5. Resultats i discussió

5.1. Resultats

5.1.1. *normal x ebony* (encreuaments recíprocs)

Primera generació filial:

Freqüències fenotípiques
observades:

esperades: **totes normals**

Freqüències genotípiques

deduïdes:

esperades: **totes Aa**

Segona generació filial:

Freqüències fenotípiques

observades:

esperades: **3/4 Normals i 1/4 Ebony**

Freqüències genotípiques

deduïdes:

esperades: **1/4 AA, 1/2 Aa i 1/4 aa**

5.1.2. normal x yellow (encreuaments recíprocs)

mascle normal i femella yellow

Primera generació filial:

Freqüències fenotípiques

observades:

esperades: **femelles normals**

mascles yellow

Freqüències genotípiques

deduïdes:

esperades: **femelles Aa**

mascles aY

Segona generació filial:

Freqüències fenotípiques

observades:

esperades: **femelles 1/2 normal i 1/2 yellow**

mascles 1/2 normal i 1/2 yellow

Freqüències genotípiques

deduïdes:

esperades: **femelles 1/2 Aa i 1/2 aa**

mascles 1/2 AY i 1/2 aY

mascle yellow i femella normal

Primera generació filial:

Freqüències fenotípiques

observades:

esperades: **femelles normals**

mascles normals

Freqüències genotípiques

deduïdes:

esperades: **femelles Aa**

mascles AY

Segona generació filial:

Freqüències fenotípiques

observades:

esperades: **femelles normals**

mascles 1/2 normal i 1/2 yellow

Freqüències genotípiques

deduïdes:

esperades: **femelles 1/2 AA i 1/2 Aa**

mascles 1/2 AY i 1/2 aY

5.1.3. Preparació de cromosomes politènics

Número de cromosomes: 4

5.2. Discussió

- Les freqüències fenotípiques observades en cada generació filial ens permeten deduir els genotips.
- Podem comparar aquestes freqüències genotípiques observades amb les esperades d'acord amb les lleis de Mendel.
- Podem estimar si el caràcter estudiat és autosòmic o lligat al sexe.

- La preparació de cromosomes politènics ens permet definir el número de cromosomes de la mosca.

6. Conclusions

- Els encreuaments verifiquen les Lleis de Mendel
- El caràcter *ebony* és autosòmic i recessiu.
- El caràcter *yellow* està lligat al sexe i és recessiu.
- La *Drosophila* té 4 cromosomes.

7. Bibliografia

- Llibres de text, Biologia Batxillerat.
- *Pràcticas de biología Universidad de Barcelona.*
- Revistes de divulgació científica.

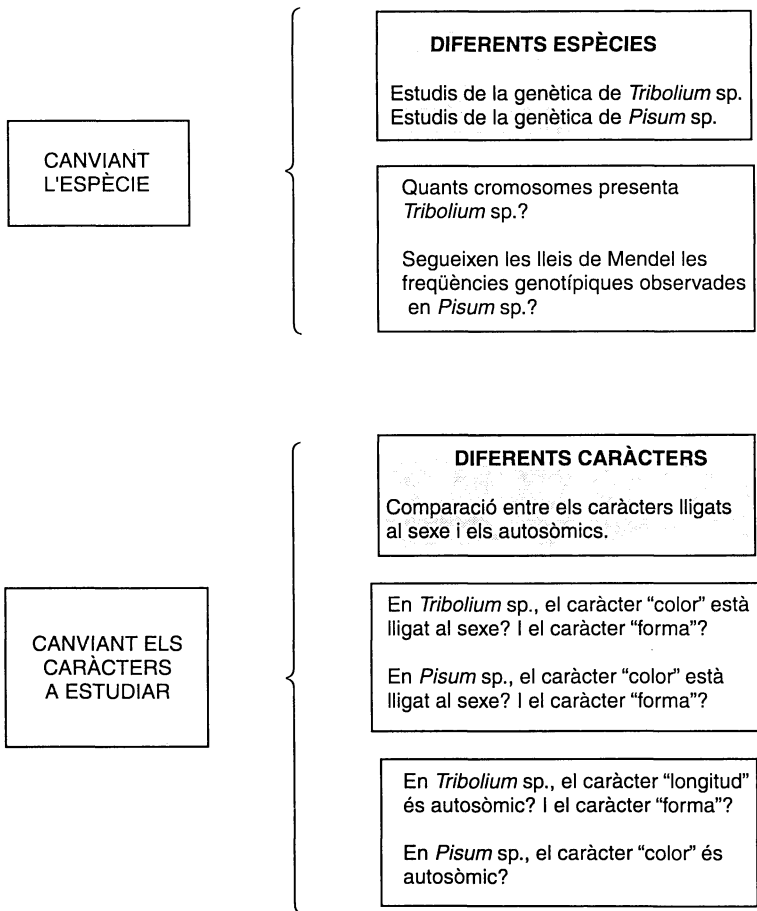


FIG. 5.1. Treballs de recerca relacionats amb mosques i gens

QUÈ MENGEM?

Antonio García

Fernando Postigo

1. Objectius

Determinació de nitrats i nitrits en carns i embotits.

Possibles preguntes a desenvolupar en diferents treballs de recerca:

- *Té la mateixa quantitat de nitrats la mortadella que el xoriço?*
- *Quina relació hi ha entre el preu d'un embotit i la proporció d'additius que presenta?*
- *En quines proporcions estan presents aquests additius en els diferents tubercles?*
- ...

2. Introducció

- Tipus d'additius en aliments en general.
- Tipus d'additius en les carns i els embotits:
 - Funcions
 - Toxicitat
- Nitrats
 - Funció com a additiu
 - Toxicitat
 - Aliments on es troben
- Mètodes qualitius per a la determinació de nitrats en:
 - carns
 - embotits

- Midó
 - Funcions
 - Sistemes naturals
 - Additiu en aliments
 - Localització en sistemes naturals
 - Estructura i composició
 - Aliments on es troba

- Mètodes qualitius per a la determinació del midó en:
 - carns
 - embotits

- Legislació sobre:
 - additius en carns i embotits
 - additius en aliments en general

- ...

3. *Materials i reactius*

3.1. Materials

- Erlenmeyers de 150 o 250 mL
- Provetes de 10 i 100 mL
- Vidres de rellotge
- Vasos de precipitats de 50 mL
- Bec Bunsen o placa calefactora
- Pipetes Pasteur
- Embut
- Balança
- Morter
- Paper de filtre
- Espàtula
- Vareta de vidre
- Pipetes d'1 o 2 mL

3.2. Reactius

- Líquid de Lugol (comercial)
 - Iode (I_2)
 - Iodur de potasi (KI)

- Midó soluble
- Àcid acètic glacial
- Mortadel·la de baixa qualitat
- Reactiu de Griess-Ilosway A
 - Àcid sulfanilic
 - Àcid acètic
 - Aigua destil·lada

- Reactiu de Griess-Ilosway B
 - 1-naftilamina
 - Àcid acètic
 - Aigua destil·lada

3.3. Valoració de riscos

- L'àcid acètic glacial és inflamable i corrosiu. S'ha de manipular en una vitrina o en un lloc ben airejat. En cas de contacte amb la pell, renteu la zona afectada amb una dissolució d'hidrogencarbonat de sodi. En cas de contacte amb els ulls, renteu la zona afectada amb aigua durant almenys uns 15 minuts. És convenient treballar amb guants i protecció per als ulls (ulleres de seguretat).
- L'àcid sulfanilic és nociu per inhalació, contacte amb la pell i ingestió. S'ha d'evitar el contacte amb els ulls i la pell. És aconsellable manipular el reactiu amb guants.
- La 1-naftilamina és nociva per ingestió. S'ha d'evitar el contacte amb la pell; és aconsellable manipular el reactiu amb guants.

4. Procediment

4.1. Obtenció de la mostra

Es pot fer servir una mostra de qualsevol preparat carni, un embotit o bé carn fresca. En aquest treball s'experimenta amb mortadella de baixa qualitat.

4.2. Preparació de la mostra

Es tallen 5 g de mostra en trossos petits i ben prims. Després es trituren en un morter o una batedora fins que s'obtingui una pasta. Se separen 2 alíquotes d'1 g cadascuna (una per determinar els nitrats i l'altra per al midó). Aquest gram de la pasta obtinguda es posa dins d'un vas de precipitats de 50 mL i s'hi afegeixen 10 mL d'aigua destil·lada. S'agita bé per homogeneïtzar la mescla amb una vareta de vidre durant uns 10 minuts. A continuació es filtra la mescla en un embut amb paper de filtre i en tots dos casos només s'empra el líquid filtrat.

4.3. Determinació de nitrats

Aquests reactius es poden comprar preparats o bé preparar-los en el mateix moment. És convenient que els reactius siguin nous, ja que la seva estabilitat no és gaire gran; és millor preparar-los en el mateix moment d'utilitzar-los. Si es volen preparar els reactius *in situ*, s'ha de disposar d'àcid sulfanílic i l-naftilamina sòlids; llavors en el tub d'assaig que conté 1 ml del líquid filtrat i que ha estat acidificat, s'afegeix una punta d'espàtula de l'àcid sulfanílic sòlid, i a continuació una altra punta d'espàtula d'l-naftilamina. S'agita el tub d'assaig.

Es fa un blanc per a cada determinació substituint el ml de líquid filtrat per 1 ml d'aigua destil·lada i se segueix tot el procediment.

4.4. Determinació de midó

Es pesa 1 g de midó soluble en un Erlenmeyer de 150 o 250 mL i s'hi afegeixen 20 mL d'aigua destil·lada. Després s'afegeixen uns 80 mL d'aigua destil·lada bullint, i s'escalfa la barreja en ebullició durant uns 5 minuts en una placa calefactora o un bec Bunsen. Aquesta dissolució de midó es prepara per veure què és el que passa si el preparat carni conté midó. En un tub d'assaig es poden posar uns 10 mL de la dissolució de midó (una vegada freda); a continuació s'afegeixen unes gotes de la dissolució de Lugol. La reacció s'ha de fer en fred ja que en calent no es produeix.

Es posa 1 mL del filtrat del preparat carni en un tub d'assaig i s'hi afegeixen unes gotes de la dissolució de Lugol; tot seguit, s'observa si hi ha un canvi de color.

També s'ha de fer un blanc fent reaccionar 1 mL d'aigua amb unes gotes de la dissolució de Lugol, amb la qual cosa no s'aprecia un canvi de color.

5. Resultats i discussió

- El blanc de l'aigua destil·lada acidificada amb els reactius de Griess-llosway dona un resultat negatiu ja que no s'observa l'aparició del color rosat o vermell. Com a conseqüència directa direm que l'aigua no conté nitrits.
- En fer reaccionar els reactius de Griess-llosway amb el filtrat obtingut de la mortadella, s'observa l'aparició del color rosat o vermell. Això indica que la carn conté nitrits.
- Quan es fa reaccionar la dissolució de midó amb el Lugol, s'observa l'aparició del color blau fosc o negre. Si no es disposa de midó soluble, es pot fer la prova afegint unes gotes de la dissolució de Lugol sobre un tros de patata.
- Quan fem el blanc amb el Lugol, no observem cap canvi de color; això vol dir que l'aigua destil·lada no conté midó. Els filtrats que

hem obtingut donen color en el cas que continguin midó i la procedència d'aquest midó és de la carn o embotit utilitzats i no de l'aigua emprada.

- En fer reaccionar la dissolució del preparat carní amb el Lugol, observem l'aparició del color blau fosc o negre; això significa que la mortadella conté midó.

6. Conclusions

- La finalitat d'aquest experiment és comprovar la presència o no d'aquests dos additius en carns o embotits. Aquesta determinació es basa en reaccions químiques, de manera que un canvi de color en la dissolució en confirma la seva presència.
- Nosaltres hem fet aquestes reaccions amb mortadella de baixa qualitat, i hem obtingut resultats positius en tots dos casos, llavors podem dir que aquesta mostra conté tots dos analits: midó i nitrits.
- En el cas de no observar-se un canvi de color en alguna d'aquestes proves, això no vol dir que la nostra mostra no contingui nitrits o midó, sinó que és possible que la concentració sigui tan baixa que no vegem el color que es forma. Llavors, en cas d'obtenir resultats negatius, el que es pot fer és repetir l'experiment; però amb més quantitat de mostra, o bé fer les dilucions amb menys quantitat d'aigua.
- El midó és un additiu que s'afegeix a la carn per donar-li una textura més compacta. Els nitrits s'utilitzen per proporcionar una coloració vermella, amb l'objectiu que tingui una aparença de carn fresca.

8. Bibliografia

- Llibres generals de química analítica.
- Llibres o manuals d'organismes oficials, com ara l'informe *Els additius alimentaris*. Generalitat de Catalunya, Departament de Sanitat i Seguretat Social. (Sèrie d'Higiene Alimentària).

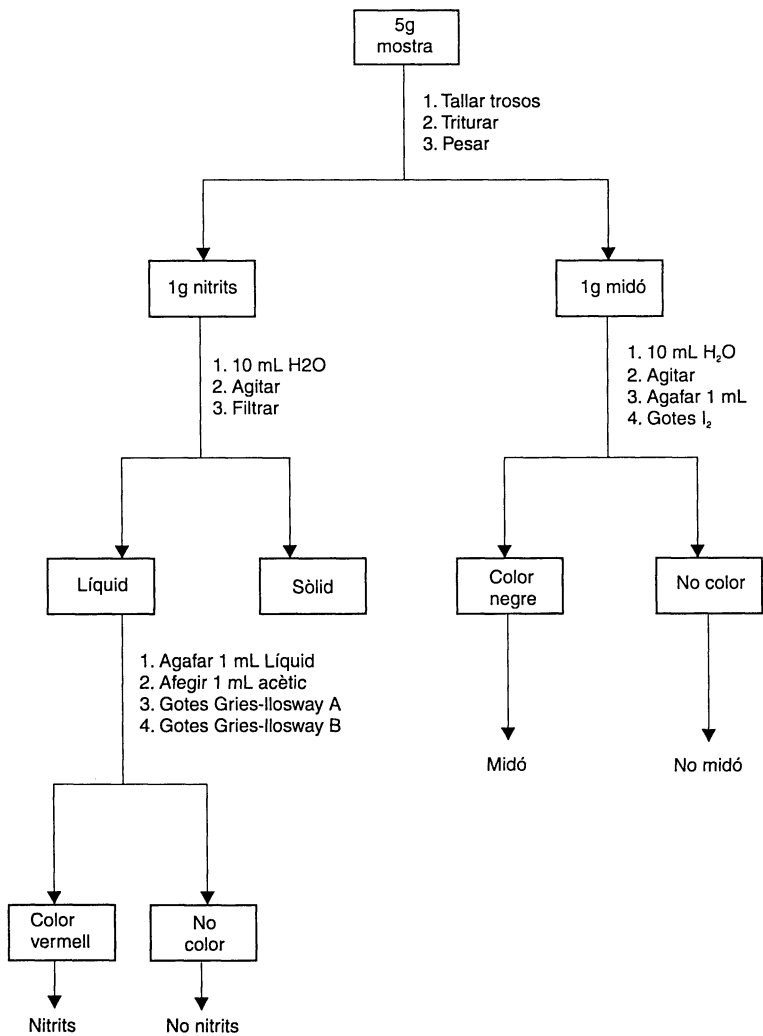


FIG. 6.1. Què mengem?

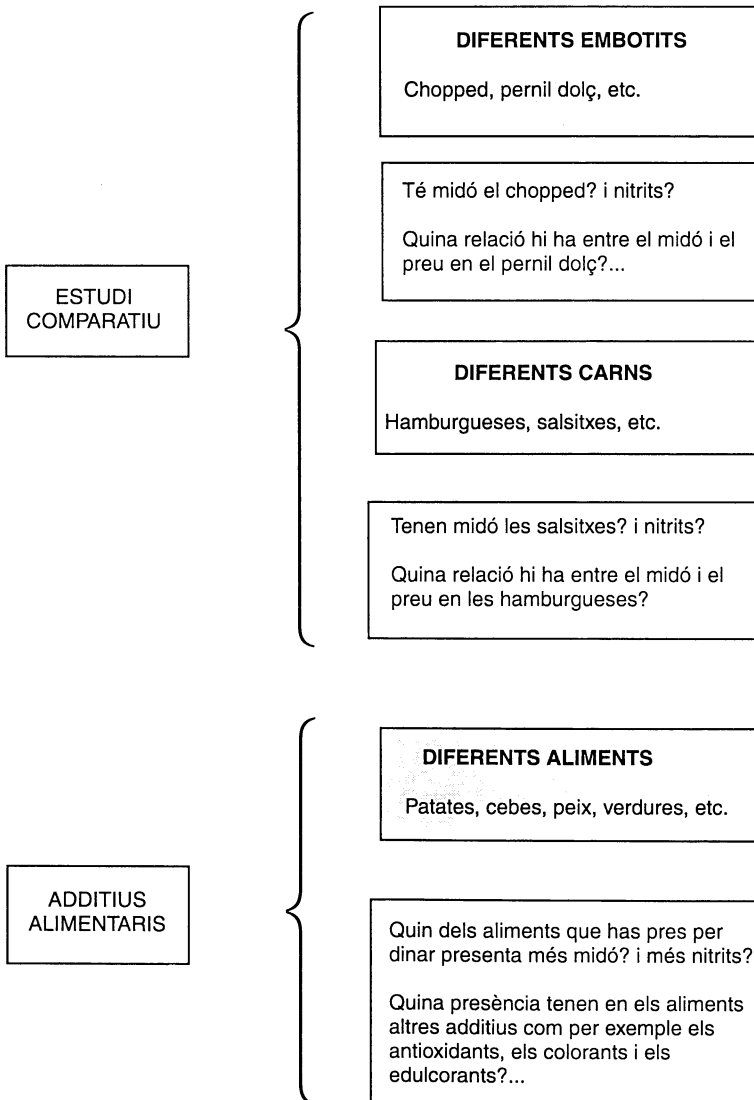


FIG. 6.2. Treballs de recerca relacionats amb què mengem?

DIETA I SALUT

Núria de la Iglesia

M. Carmen Muñoz

1. Objectius

Determinar una dieta equilibrada per a pacients amb diabetis, malaltia associada a l'alimentació.

Possibles preguntes a desenvolupar en diferents treballs de recerca:

- *Per què una alimentació alta en glucosa empitjora la diabetis?*
- *Determinació d'una dieta equilibrada per a l'arteriosclerosi.*
- *Comparació de les dietes estàndards d'un malalt diabètic i d'una persona sana.*
- ...

2. Introducció

- Què són els principis immediats i propietats
- Què són els hidrats de carboni i propietats
- Funció biològica dels hidrats de carboni
- Metabolisme dels hidrats de carboni
- Diabetis
 - Paper de la insulina
- Components restrictius d'una dieta

3. Materials

- Dieta ideal d'un pacient diabètic obtinguda a partir del tríptic sobre l'alimentació en la diabetis *mellitus* de l'Hospital de Bellvitge:

Distribució de nutrients:

Hidrats de carboni	54 % = 242 g
Proteïnes	14 % = 63 g
Greixos	32 % = 64 g

Repartiment d'hidrats de carboni per ingestió:

	% d'HC	grams d'HC
Esmorzar	15	36
Mig matí	15	36
Dinar	25	61
Berenar	10	24
Sopar	25	61
Ressopó	10	24

Dieta de 1800 kcal (adults):

	Quantitat	Hidrats de carboni
<i>Esmorzar:</i>		
Llet semidesnatada	150 cc	7,5 g
Pa o equivalent	30 g	15 g
Cafè	lliure	—
Fruita: taronja o equivalent	150 g	15 g
<i>Mig matí:</i>		
Pa o equivalent	30 g	15 g
Pernil o equivalent	30 g	—
Fruita: taronja o equivalent	200 g	20 g
Oli	5 g	—
<i>Berenar:</i>		
Llet semidesnatada	100 g	5 g
Pa o equivalent	40 g	20 g

Sopar:

Verdura controlada	200 g	14 g
Patata o equivalent	200 g	40 g
Peix o equivalent	80 g	—
Verdura no controlada	lliure	—
Fruita: taronja o equivalent	100 g	10 g
Oli	15 g	—

Ressopó:

Llet semidesnatada	150 g	7,5 g
Pa o equivalent	30 g	15 g

Taula per omplir:

Malaltia	Dieta	Causa	Tractament
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;">Diabetis mellitus</div>	Hidrats de carboni _____	<input checked="" type="checkbox"/>
	Proteïnes _____	<input checked="" type="checkbox"/>
	Lípids _____	<input checked="" type="checkbox"/>
	Vitamines _____	<input type="checkbox"/>
	Sals minerals i oligoelements _____	<input type="checkbox"/>

4. Procediment

- 1) Ompliu les taules adjuntes.
- 2) Ompliu les proporcions de principis immediats i calories de les diferents dietes.

Ompliu aquesta taula diàriament durant una setmana.

Dia:	Aliment	Pes	Calories	Composició de principis immediats (g):		
				H. carboni	Proteïnes	Lípids
Esmorzar						
Mig matí						
Dinar						
Berenar						
Sopar						
Ressopó						

5. Resultats i discussió

5.1. Resultats

Malaltia	Dieta	Causa	Tractament
Diabetis mellitus	Hidrats de carboni	<input checked="" type="checkbox"/> manca d'insulina	Ins. + dieta + exercici
	Proteïnes	<input checked="" type="checkbox"/> dany al ronyó	dieta controlada
	Lípids	<input checked="" type="checkbox"/> dany al fetge	dieta controlada
	Vitamines	<input type="checkbox"/>
	Sals minerals i oligoelements	<input type="checkbox"/>

Taula com a resum de tota la setmana

Dia:	Aliment	Pes	Calories
Mig matí			
Dinar			
Berenar			
Sopar			
Ressopó			

Distribució dels nutrients en %

Hidrats de carboni: _____ Proteïnes: _____ Lípids: _____

5.2. Discussió

- Una dieta estàndard (la de qualsevol alumne/a) té una proporció d'hidrats de carboni més elevada que la d'un diabètic, ja que aquests malalts tenen problemes per assimilar-los.
- La dieta d'un malalt diabètic té una proporció de proteïnes inferior a la d'un individu sa ja que el ronyó d'un diabètic no tolera una càrrega excessiva de proteïnes i això podria provocar complicacions a llarg termini si no se'n controla el consum.
- Un diabètic tampoc pot menjar greixos en excés perquè acumula greix al fetge amb una gran facilitat, cosa que podria acabar afectant-lo.
- *Lligada a la introducció específica de cada treball.*

6. Conclusions

- La diabetis *mellitus* és un clar exemple de malaltia relacionada amb l'alimentació. Una dieta mal controlada fa que l'individu afectat tingui uns nivells de glucosa a la sang més elevats del que és normal, cosa que provoca complicacions secundàries de la malaltia a llarg termini, com ara la ceguesa i la insuficiència renal. El control de la dieta les evita i fa augmentar l'esperança i la qualitat de vida del pacient.
- Aspectes personals d'aprofitament i d'interès que ha despertat l'elaboració d'aquest treball de recerca.
- *Lligada a la introducció específica de cada treball.*

7. Bibliografia

- TAYLOR, BARBARA. *Vivendo con Diabetes*. Ed. Atril, 1990.
- *Alimentación en la Diabetes Mellitus. Dieta de 1800 kcal*. Institut Català de la Salut; Ciutat Sanitària i Universitària de Bellvitge. [Tríptic].
- *El diabético insulino-dependiente. Información e instrucciones*. Novo Nordisk, 1995.
- *Autocontrol de la diabetes. Guía para el diabético*. Bayer. Diagnósticos Ames, 1996.
- *XVI Jornades d'Informació per a Diabètics*. Associació de Diabètics de Catalunya (ADC), 1996.

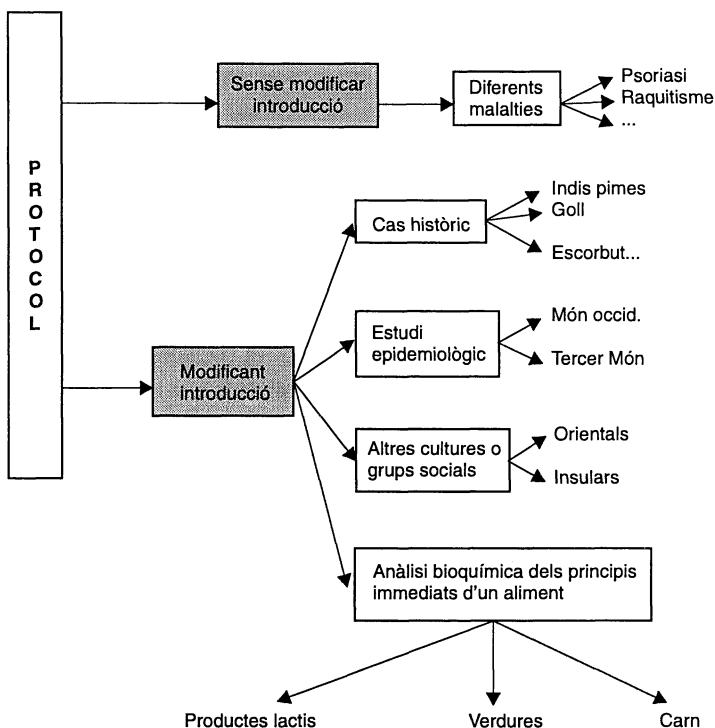


FIG. 7.1. Diferents treballs de recerca relacionats amb el mateix procediment.

LA CLOROFIL·LA, SEGUINT EL RASTRE DEL SOL

Emili Cid

Cristina Horcajada

1. Objectius

Estudi de la clorofil·la, la seva importància i les seves propietats.

Possibles preguntes a desenvolupar en diferents treballs de recerca:

- *Tenen els mateixos pigments les algues vermelles que les verdes?*
- *Com capta l'energia solar un líquen?*
- *Efectes de la substitució del catió magnesi pel Zn^{2+} en la clorofil·la .*
- ...

2. Introducció

- Cèl·lules vegetals
 - Diferències entre cèl·lules vegetals i animals
 - Orgànuls de les cèl·lules vegetals
- La fotosíntesi
 - Reacció
 - Transformació d'energia
 - Fase lluminosa i fase fosca
 - Producció d'oxigen
- Cloroplastidi
 - Orgànul vegetal
 - Membranes que el componen
 - Components
 - On es troba la clorofil·la dins del cloroplastidi?

- Clorofil·la: propietats
 - Ió central: magnesi
 - Anells pirròlics
 - Deslocalització d'electrons
 - Relació amb la funció fotosintètica: fotoreceptor
 - Tipus de clorofil·les i abundància relativa de cada tipus
- Funció biològica de la clorofil·la
 - Implicació en la captació de llum
 - Paper fonamental en la fotosíntesi
- Presència de la clorofil·la en:
 - vegetals
 - algues
 - bacteris
- Altres aspectes de la fotosíntesi: producció d'oxigen
 - Les plantes, pulmons terrestres
 - Etapa de la fotosíntesi en què es produeix oxigen
 - Importància de la producció d'oxigen

3. *Materials i reactius*

3.1. Material

- Vasos de precipitats
- Embut
- Morter i mà de morter
- Paper de filtre
- Vareta de vidre
- Pipetes i pipetejador
- Bany maria
- Làmpada de raigs ultraviolats
- Llana de vidre
- Suport i cèrcol
- Cristal·litzador
- Proveta

3.2. Reactius

- Espinacs i altres vegetals
- Acetona al 80 %
- Sorra de platja neta
- Àcid clorhídric 0,1 mol/l
- Sulfat de coure (II)
- Aigua destil·lada
- Alga d'aquari

3.3. Valoració de riscos

- Àcid clorhídric 0,1 mol/l → corrosiu. Cal evitar-ne el contacte amb la pell, els ulls i les mucoses. És recomanable de treballar sota la campana de gasos.
- Acetona al 80 % → inflamable. Cal allunyar-se de fonts d'ignició. És recomanable de treballar sota la campana de gasos.
- Sulfat de coure (II) → nociu. Cal evitar-ne la ingestió.
- Alga d'aquari → ecoperillosa. Si és una alga exòtica no s'ha d'alliberar a l'ambient. Deixeu-la assecar abans de llençar-la a les escombraries.

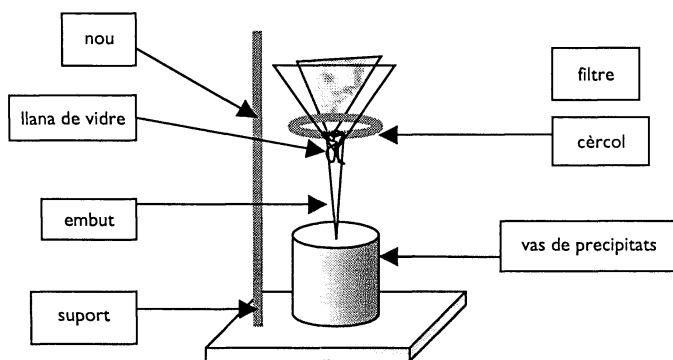
4. Procediment

4.1. Extracció i substitució de l'ió central de la clorofil·la

- 1) Talleu en trossos molt petits els espinacs.
- 2) Peseu amb la balança 20 g d'espinacs.

En aquest punt és molt important seguir el procediment de pesada: calibreu la balança, tareu prèviament el recipient que contindrà la mostra i, finalment, peseu la mostra.

- 3) En un morter, barregeu els trossets d'espínacs amb sorra de platja neta i amb acetona al 80 %, disgregueu amb la mà de morter amb moviments circulars.
- 4) Filtreu la solució i recolliu-la en un vas de precipitats. El procés de filtració es basarà a fer passar la solució per un embut de vidre, un filtre de paper i llana de vidre. El filtre es prepara retallant un cercle de paper de filtre i doblegant-lo per aconseguir un con de la mida aproximada de l'embut. Segons l'esquema:



En aquest punt, la clorofil·la ha quedat dissolta en la fase orgànica d'acetona, de forma impura (tenim barreja dels dos tipus de clorofil·les: *a* i *b*, a més d'altres pigments que es troben en menor proporció).

- 5) Observeu a sota de la llum visible: simplement es tracta d'anotar amb cura el color observat en la solució. Si es disposa d'una làmpada de raigs ultraviolats, observeu quin aspecte pren la solució i anoteu-ne el resultat.
- 6) Als 9 ml de l'extracte de clorofil·la, que haureu col·locat en un tub d'assaig gran, afegiu-hi 1 mL d'àcid clorhídric 0,1 N (la solució s'ha de preparar a partir d'una solució concentrada d'àcid clorhídric al 37 %).

Per accelerar el procés, escalfeu-ho uns minuts en un bany maria a 50°C.

- 7) En l'apartat anterior, amb el tractament amb àcid, hem eliminat l'ió central, el magnesi, i la clorofil·la s'ha transformat en feofitina. Quins canvis observeu en el color de la solució? I en exposar-la als raigs ultraviolats?
- 8) El pas següent es basa a introduir un ió de coure dins l'anell de feofitina: als 4 ml de la solució de feofitina, que transvassareu a un nou tub, hi afegiu 1 ml d'una solució saturada de sulfat de coure. S'ha d'escalfar en un bany d'aigua fins que la solució es torni totalment verda.

La solució de sulfat de coure saturada es prepara segons el que segueix: a uns 10 ml d'aigua desionitzada bullint (vigileu de no cremar-vos!), s'hi va afegint sulfat de coure sòlid i es mescla agitant amb una vareta de vidre. Se n'afegeix fins que ja no es dissol més i el sulfat de coure comença a precipitar; en aquest punt hem arribat a la saturació. Deixem que es refredi la solució i la filtrem (**no la filtreu fins que la solució sigui freda**).

- 9) Torneu a observar del visible i amb raigs ultraviolats i anoteu les noves propietats.

NOTA: si en algun dels passos la solució de pigment es torna tèrbola, convé tornar a filtrar-la.

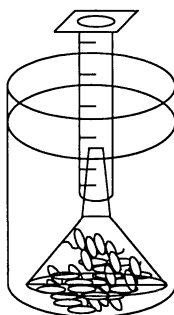
4.2. Formació d'oxigen a partir de la fotosíntesi

- 1) Peseu una quantitat d'algues suficient per omplir la base de l'embut. Seguiu el procediment del punt 2 de l'apartat 4.1.
- 2) Poseu l'alga al fons del vas de vidre i col·loqueu l'embut cap per avall, de tal manera que cobreixi l'alga.

És millor que l'aigua pugui passar del cristal·litzador a l'embut, per això és convenient facilitar-ho deixant un trosset d'alga fora de l'embut.

- 3) Aboqueu aigua dins del vas fins a arribar al nivell de l'extrem de l'embut. És necessari, doncs, usar un vas de parets altes. Finalment

ompliu d'aigua tota la proveta, tapeu-la amb la mà, invertiu-la i col·loqueu-la damunt l'embut amb cura. No ha de quedar gens d'aire a l'interior de la proveta. Vegeu l'esquema.



- 4) Deixeu el vas i el seu contingut exposat a diferents intensitats de la llum del sol (solana, mitja ombra, llum indirecta, etc.) i anoteu el volum d'oxigen acumulat cada mitja hora.
- 5) Calculeu i dibuixeu les gràfiques que relacionen temps amb volum d'oxigen. Calculeu la relació entre aquesta velocitat de producció i el pes de l'alga corresponent.

5. Resultats i discussió

5.1. Resultats

5.1.1. Extracció i substitució de l'ió central de la clorofil·la

Espècie	Visible	Ultraviolat
Clorofil·la-Mg	Verd	Vermell-rosa
Feofitina	Groc-marró	—
Clorofil·la-Cw	Verd blavós	—

5.1.2. Formació d'oxigen a partir de la fotosíntesi

No podem donar uns valors concrets ja que depenen en gran mesura de la intensitat de la radiació solar i de l'espècie escollida. Naturalment la producció d'oxigen ha d'augmentar en relació amb l'augment d'intensitat solar. Recomanem fer una prova abans de començar amb l'alga adquirida.

5.2. Discussió

- Hem pogut fer un seguiment visual de la substitució de l'ió magnesi, ió central de la clorofil·la, per un altre ió, el coure. Quan no hi tenim l'ió, perdem la coloració verda, mentre que quan introduïm el nou ió de coure la recuperem.
- Referit a la producció d'oxigen, els resultats depenen de les condicions en què han estat preses les mesures: segons la intensitat de la radiació solar, es produirà més o menys oxigen. Com més gran és la intensitat, més augmenta la producció d'oxigen com a resultat d'una major activitat fotosintètica.

6. Conclusions

- L'ió central de la clorofil·la, el magnesi, és imprescindible per a la coloració verda.
- Amb un tractament àcid i l'aplicació de calor, som capaços d'extreure l'ió metall de la cavitat que ocupa en la biomolècula.
També podem substituir-lo per un altre ió metàl·lic divalent com per exemple el zinc o el coure.
- L'estudi de la fotosíntesi en algues ens permet fer una quantificació del volum d'oxigen després per unitat de temps i relacionar-ho amb la irradiància solar.
- D'acord amb el desenvolupament de cada treball individual i basa-

des en altres qüestions, dubtes o comentaris que hagin sorgit durant l'elaboració del treball. Possibles solucions.

7. Bibliografia

- *Guia de Riesgos químicos*. Institut Nacional de Seguretat i Higiene en el Món Laboral, 1982.
- Llibres de text de biologia (COU, 2n batxillerat).
- Enciclopèdies temàtiques.
- *Investigación i ciencia, Mundo científico*.

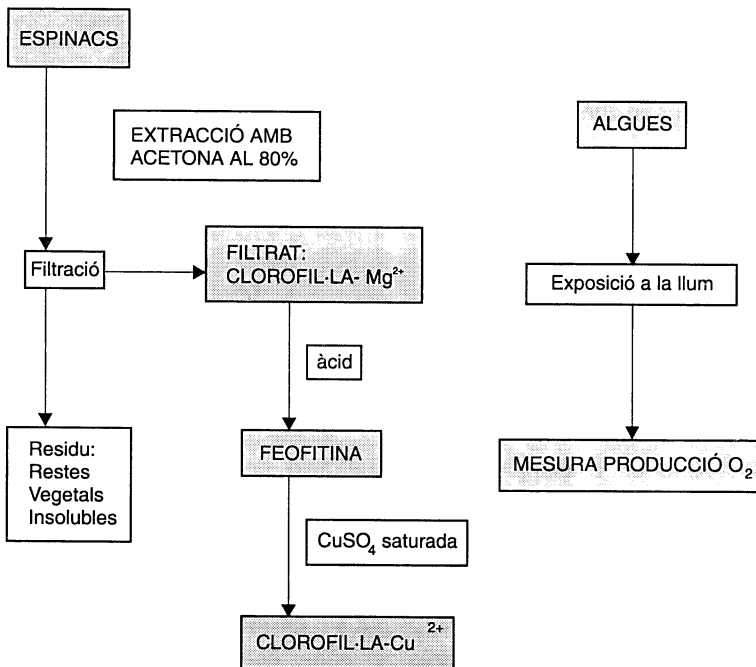


FIG. 8.1. La clorofila

**ESTUDI
COMPARATIU DE
LA CLOROFIL·LA**

ENTRE DIFERENTS VERDURES

Enciam, carxofes, mongetes verdes.

Té el mateix tipus de clorofil·la l'enciam que els espinacs?

I que les carxofes?...

EN DIFERENTS ÈPOQUES DE L'ANY

Comparació dels nivells de clorofil·la i d'altres pigments.

Quin és el pigment majoritari de la fulla de plataner a la tardor?

I a la primavera?

I a l'estiu?...

**IMPORTÀNCIA
DE
LA CLOROFIL·LA**

ECOLOGIA I SOCIETAT

Impacte ecològic dels organismes fotosintètics i aplicacions industrials de la clorofil·la.

Quin és l'impacte del fitoplàncton sobre la cadena alimentària?

Com s'aplica la clorofil·la a la indústria alimentària?

I als cosmètics, perfums, ets.?

Per què la clorofil·la és tan bon colorant?...

PROTEASES D'ORIGEN VEGETAL

Roger Gomis

1. Objectius

Proteases del kiwi: la seva activitat enzimàtica i com l'entorn afecta aquesta activitat.

Possibles preguntes a desenvolupar en diferents treballs de recerca:

- Quina activitat proteàsica té el kiwi?
- Com varia l'activitat proteàsica del kiwi a un pH àcid com el de l'estómac?
- Com actua la duresa de l'aigua sobre l'acció d'un detergent amb activitat proteàsica?
- ...

2. Introducció

- Què és una proteïna?
 - Què és un aminoàcid?
 - Què és l'enllaç peptídic?
- Què és un enzim?
 - Activitat enzimàtica
 - Dependència de l'activitat enzimàtica segons:
 - L'especificitat del substrat
 - Les propietats fisicoquímiques de l'ambient:
 - Influència del pH
 - Influència de la temperatura
 - Influència de la força iònica
 - Les proteases:
 - Què són?
 - Quina funció fan?
 - Quin és el seu mecanisme de reacció?

- Aplicacions industrials de les proteases
 - Detergents comercials
 - Producció de pinsos

3. *Material i reactius*

3.1. *Material*

- Termòmetre
- Cronòmetre
- Bany maria
- Pines
- Tubs d'assaig
- Morter
- Gasa filtrant

3.2. *Reactius*

- Kiwi o kiwis
- Negatius de fotografia
- Bany de gel
- HCl 1 mol/L

3.3. *Valoració de riscos*

- Precaució amb el bany d'aigua calenta quan es treballa a temperatures que poden causar cremades a la pell.
- L'àcid clorhídric (HCl) és corrosiu i cal manipular-lo acuradament.

4. *Procediment*

El protocol experimental és senzill i permet un ampli espectre de modificacions que augmenten la seva possible aplicació.

- 1) Preparació de la mostra de proteases. S'agafa la polpa d'un kiwi (el més madur possible) i es tritura amb l'ajut d'un morter. L'homogenat es filtra amb una gasa, se'n recull el filtrat en un tub d'assaig o recipient de vidre i es conserva en gel (4°C)

NOTA: cal una bona trituració física (fins i tot amb una batedora si és possible) per trencar la paret cel·lular vegetal de cel·lulosa i poder alliberar totes les proteases.

- 2) Preparació del substrat. Les proteases poden degradar les capes de gelatina (proteïna) que hi ha en un negatiu fotogràfic. Es tallen negatius de fotografia en quadrats d'1 x 1 cm. Cal assegurar-se que els quadrats siguin tots iguals per tal de poder comparar els resultats de les diferents mesures.
- 3) Es determina l'activitat de les proteases comparant la modificació de l'opacitat d'una pel·lícula fotogràfica. Cal escalfar un bany maria a 25°C (la temperatura s'ha de mantenir constant al llarg de tot el procés). Es preparen cinc tubs d'assaig en què es posa, amb l'ajut d'unes pinces, un quadrat de negatiu al fons de cadascun. S'afegeixen 5 mL d'aigua destil·lada al primer tub (control) i als altres 5 mL del filtrat de kiwi. S'incuba la barreja durant 1, 2, 3 i 12 h (o tota la nit) a 25°C.
- 4) Transcorreguts els temps indicats, s'atura la reacció submergint les pel·lícules en aigua destil·lada; finalment es deixen assecat (s'observa com disminueix l'opacitat de la pel·lícula respecte al temps d'incubació). S'estableix com a **unitat proteàsica** el temps que tarden 5 ml d'extracte de kiwi a degradar un cm² de negatiu deixant-lo totalment transparent. Tots els estudis es referiran a aquesta unitat.
- 5) Per estudiar com es modifica l'activitat proteàsica per canvis en la temperatura de l'entorn, es bullen durant 10 minuts 5 mL d'extracte de kiwi i, després de deixar-lo refredar, s'incuba 1 cm² de pel·lícula a 25°C durant el temps òptim i se'n mesura l'activitat proteàsica.
- 6) Es mesura el pH de l'extracte inicial de kiwi i, mitjançant HCl 1 mol/l, es porta fins al pH = 2; a continuació s'incuba 1 cm² de

pel·lícula a 25°C durant el temps òptim i se'n mesura l'activitat proteàsica.

Els resultats es poden plasmar en una gràfica on es relacioni, per exemple, la temperatura i l'efecte en la degradació.

5. Resultats i discussió

5.1. Resultats

Es mesura el grau de transparència del negatiu.

El valor de la **unitat proteàsica** obtinguda és de **4 h**.

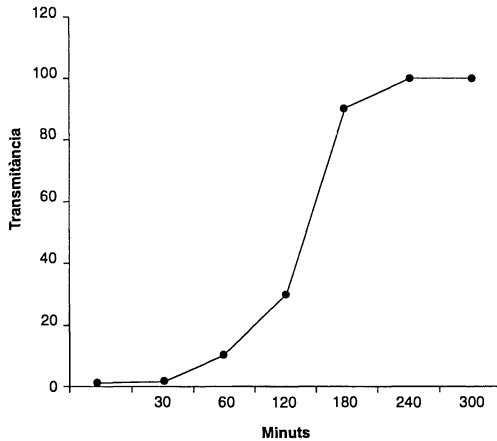


FIG. 9.1. Gràfica degradació vs. temps (0-12 o 24 h.)

5.2. Discussió

- El kiwi presenta a 25°C una activitat proteàsica notable que dependrà de la concentració de l'extracte emprat.

- Les proteases de kiwi s'inactiven per ebullició i també en medi àcid. Ambdues situacions provoquen la desnaturalització de la proteïna enzimàtica.
- Les proteases d'origen vegetal presenten un rang d'estabilitat relativament petit tant de temperatura com de pH; en canvi, altres proteases d'origen bacterià poden arribar a ser estables a temperatures superiors als 70°C, també les proteases dels detergents comercials per rentar la roba són actives a 70°C.
- Es pot usar com a substrat un drap tacat amb tomàquet i deixat assecar a l'aire. S'analitza la capacitat de la proteasa per degradar les proteïnes de la polpa del tomàquet que han quedat adherides al teixit.
- *Ligada a la introducció específica de cada treball.*
- ...

6. Conclusions

- Les proteases naturals tenen la capacitat de degradar una superfície proteica. Aquesta activitat enzimàtica varia segons les condicions ambientals.
- Molts llevataques porten proteases. Podem comprovar que la base de molts productes industrials té els seus precursors a la natura.
- ...

7. Bibliografia

- Instituto Nacional de Seguridad y higiene en el mundo laboral. *Guía de riesgos químicos*. Barcelona: NIOHS/OSHA, 1982.
- Llibres de text de biologia (2n batxillerat i COU).
- Bioquímica general.

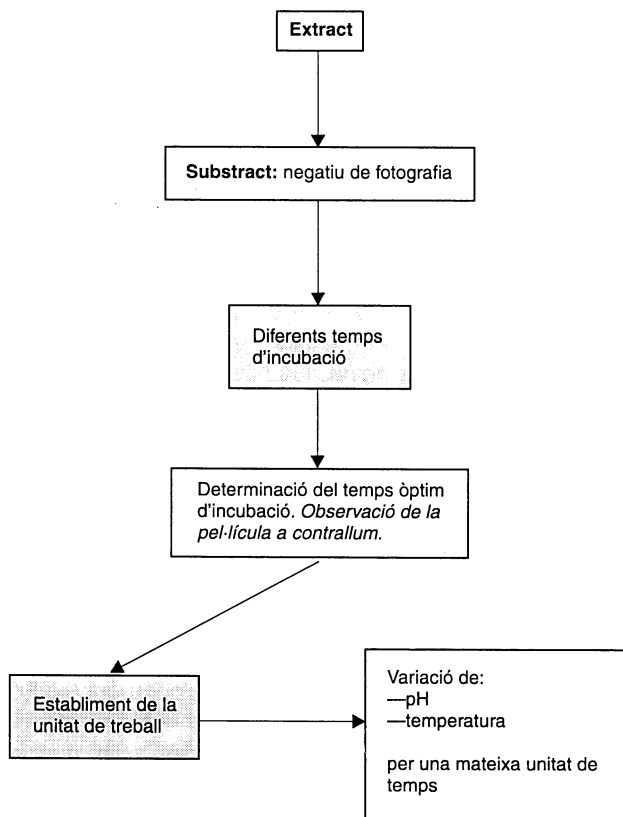


FIG. 9.2. *Proteases d'origen vegetal*

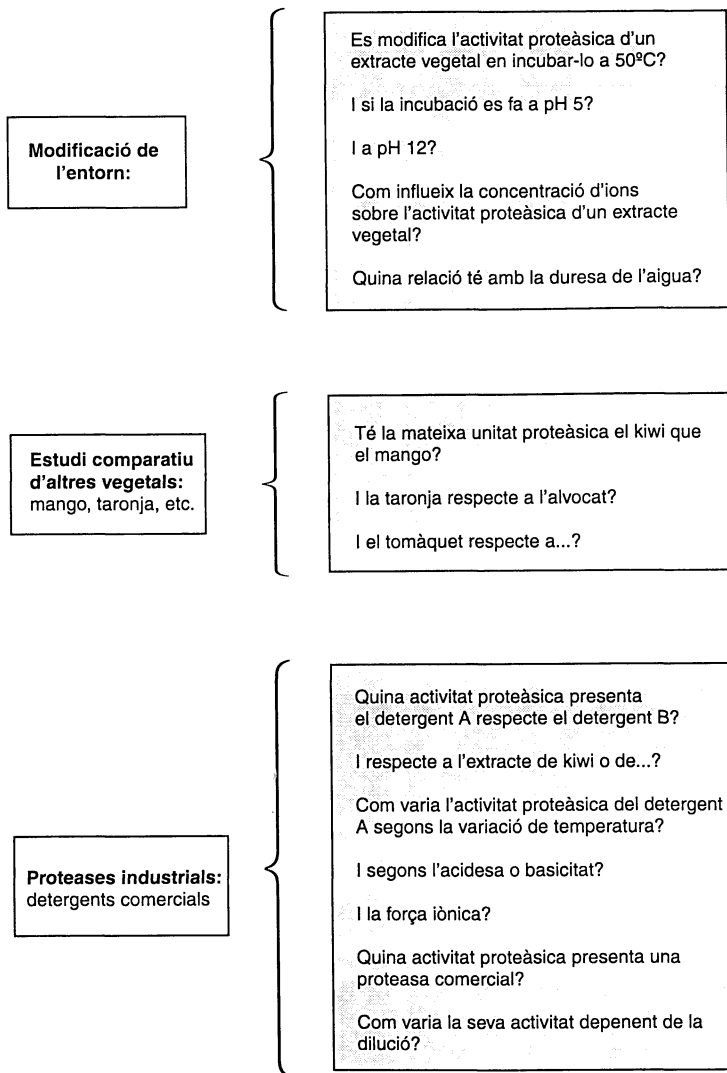


FIG. 9.3. Treballs de recerca relacionats amb proteases d'origen vegetal

EL SABÓ I LA NETEJA

Fernando Postigo
Antonio García

1. Objectius

Preparació d'un sabó mitjançant la reacció de saponificació i estudi de les seves propietats.

Possibles preguntes a desenvolupar en diferents treballs de recerca:

- *Quines propietats presenta un sabó d'oli de sèsam?*
- *Com afecta la duresa de l'aigua la capacitat de neteja d'un sabó?*
- *Quines diferències de composició i capacitat de neteja hi ha entre un sabó i un detergent?*
- ...

2. Introducció

- Lípids: concepte i propietats
- Clasificació dels lípids
 - Àcids grassos
 - saturats
 - insaturats
- Funció dels lípids i localització en sistemes naturals
- Concepte de solubilitat i precipitació
- Obtenció i utilitats d'olis vegetals

- Reacció de saponificació

- Sabons
 - Concepte
 - Propietats
 - Funcions
 - Altres tipus de substàncies netejadores

- Duresa de l'aigua
 - Concepte
 - Característiques i propietats
 - Ions afectats

- Caràcter amfipàtic dels sabons

3. *Materials i reactius*

3.1. *Reactius*

- Aigua destil·lada
- Hidròxid de sodi en lleties (20 g)
- Clorur de calci
- Residus d'oli d'oliva fregit (100 mL) de 0,4°

3.2. *Materials*

- Balança
- Vasos de precipitats de 250 i 500 mL
- Tubs d'assaig
- Vareta de vidre
- Espàtula
- Embuts
- Llana de vidre o cotó

- Paper de filtre
- Provetes de 10 i 100 mL
- Bec Bunsen o placa calefactora
- Pipetes graduades d'1,2 o 5 mL
- Pipetes Pasteur
- Erlenmeyers de 250 mL
- Vials

3.3. Valoració de riscos

- La reacció de saponificació és molt exotèrmica, és a dir, durant aquest procés es desprèn molta calor i per això és necessari treballar amb molt de compte i, si es pot, amb ulleres de seguretat.
- Les dissolucions d'hidròxid de sodi són molt corrosives, sobretot si es treballa en calent. En cas de contacte amb la pell, pot provocar cremades greus; és per això que s'aconsella netejar-se amb molta aigua i una solució d'àcid bòric o acètic a l'1 %.
- El clorur de calci és irritant.

4. Procediment

4.1. Preparació del sabó

- 1) El sabó es prepara a partir d'un greix o d'un oli mitjançant una reacció de saponificació; es fa reaccionar l'oli d'oliva amb una base, com per exemple l'hidròxid sòdic, i el producte resultant és el sabó.
- 2) Es fan servir 100 ml de residus d'oli d'oliva de 0,4° reutilitzat sis cops per fregir patates. Si l'oli està molt brut, s'ha de filtrar per eliminar-ne les partícules sòlides. Es pot filtrar amb un embut, i llana de vidre o cotó; i el filtrat es recull en un vas de precipitat d'uns 250 ml. Necessitarem aproximadament uns 100 ml d'oli filtrat i net.
- 3) Es prepara una dissolució de NaOH (20 g de NaOH amb 800 mL

- de H_2O). S'ha d'anar amb molt de compte ja que la dissolució és molt exotèrmica i es desprèn molta calor.
- 4) S'aboca la dissolució d'hidròxid de sodi dins el vas que conté l'oli filtrat; s'escalfa la barreja durant uns 10-20 minuts en un bany maria i s'agita fins a la formació d'una pasta d'un color groc marronós, que és el sabó. Aquest sabó és la sal sòdica dels àcids grassos que formen l'oli. Té un caràcter amfipàtic, ja que una part de la molècula és apolar i l'altra és polar.
 - 5) Es deixa reposar 10 min i s'observen tres fases: la inferior correspon a la glicerina que s'ha alliberat en la reacció de saponificació (líquid incolor); la següent és el sabó, un sòlid groc marronós, i la superior és l'oli que no ha reaccionat. Es deixa reposar 24 h per augmentar el rendiment de la reacció, es filtra la barreja amb un embut i paper de filtre. En el líquid filtrat queden la glicerina i l'oli i, en el paper de filtre queda el sabó, que es renta dues vegades amb uns 15 mL d'aigua destil·lada.
 - 6) Per donar forma al sabó es posa en un recipient determinat i es deixa assecat durant 24 h a l'aire. Això es fa per eliminar l'aigua i perquè el sabó quedi més compacte i més dur. Si es vol que el sabó estigui perfumat es poden afegir unes gotes de colònia abans que s'assequi. Si s'utilitza oli de coco, en comptes d'oli d'oliva, el sabó ja té un aroma natural.

4.2. Estudi de les propietats del sabó en presència d'ions Ca^{2+}

- 1) S'agafa un tros de sabó (2 g) i es dissol en 100 mL d'aigua destil·lada; s'ha de remenar bé amb una vareta de vidre i filtrar-ho si es considera pertinent.
- 2) S'agafen 0,3 g de clorur de calci i es dissolen en 10 mL d'aigua destil·lada.
- 3) A dos tubs amb 5 mL de la dissolució de sabó cadascun s'afegeixen unes gotes d'aigua destil·lada al primer (control) i unes gotes de la dissolució de clorur de calci al segon. S'observen les diferències.
- 4) Per estudiar com aquestes diferències afecten la capacitat de neteja del sabó agafem tres tubs d'assaig amb 1 ml d'oli filtrat a cadascun.

En el primer, s'afegeixen 5 ml d'aigua destil·lada; en el segon, 5 ml de dissolució de sabó i, en el tercer, 5 ml de dissolució de sabó i unes gotes de solució de clorur de calci. S'agiten i es deixen reposar uns minuts; a continuació s'observen els canvis produïts.

5. Resultats i discussió

- El sabó preparat en el laboratori es fa a partir d'oli d'oliva fregit. Depenent de la qualitat de l'oli i dels cops que ha estat reutilitzat, el resultat pot variar. En les condicions experimentals descrites es poden diferenciar tres fases, però pot passar que es formin només dues fases (el rendiment de la reacció de saponificació ha estat òptim). A la fase superior s'obtindrà una pasta de color groc marronós. El nombre d'insaturacions dels olis afecta l'obtenció el sabó.
- En cas de tenir greixos animals, com per exemple la mantega de porc, serà necessari primer de tot fondre'ls i treballar en calent.
- Les dissolucions de sabó en contacte amb olis, formen emulsions. El fenomen que té lloc és producte del caràcter amfipàtic del sabó: la part apolar interacciona amb l'oli i la part polar interacciona amb l'aigua.
- L'addició d'ions Ca^{2+} fa precipitar les respectives sals dels àcids grassos. S'observa la formació d'un precipitat blanc. Quan el sabó precipita, perd la capacitat de neteja ja que no pot interaccionar amb l'oli per formar l'emulsió i l'oli sura.
- L'aigua en contacte amb l'oli no forma emulsió; el resultat és la formació de dues fases a causa de les diferents densitats.
- ...

6. Conclusions

- La reacció de preparació del sabó és fàcil de dur a terme i sol donar resultats bons. S'ha d'anar molt amb compte amb les indicacions de seguretat, ja que es treballa en calent i amb bases fortes.
- Si el medi aquós en què es fa la neteja té una duresa elevada, la capacitat

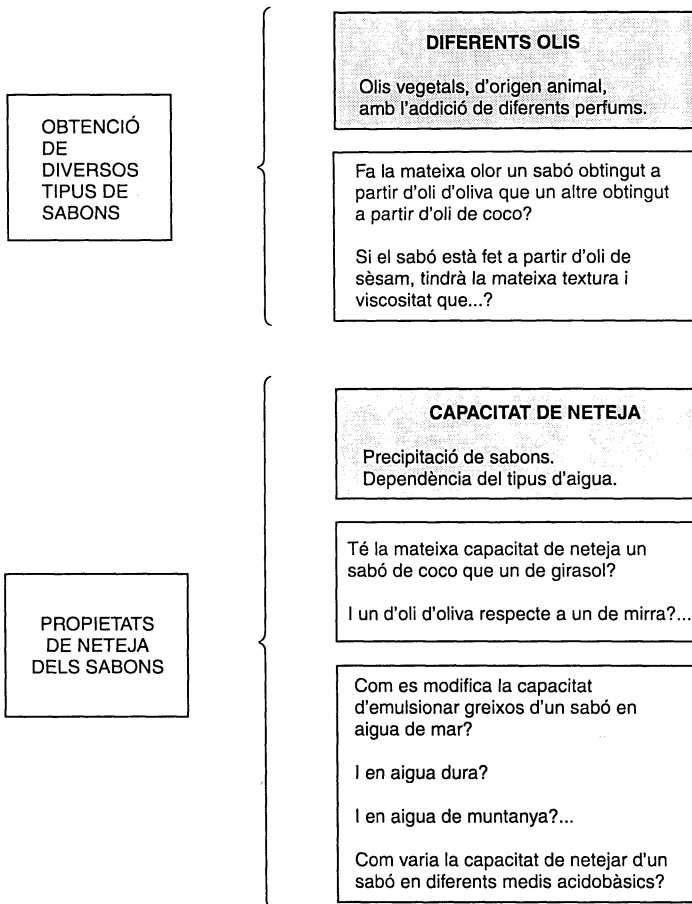


FIG. 10.2. Treballs de recerca relacionats amb el sabó i la neteja.

CROMATOGRAFIA DE LÍPIDS*

Josep M. Fernández-Novell

Roser Fusté

1. Objectius

Anàlisi qualitativa dels lípids que constitueixen l'alvocat mitjançant una cromatografia en capa prima.

Possibles preguntes a desenvolupar en diferents treballs de recerca:

- *Per què uns lípids es mouen de manera diferent que uns altres?*
- *Per què un lípid es mou de manera diferent segons l'eluent emprat?*
- *Com es relacionen els lípids presents en aquesta fruita i la seva funció fisiològica com a lípids de membranes o de reserva?*
- *L'alvocat i el beicon estan constituïts pels mateixos lípids?*
- ...

2. Introducció

- **Funció biològica dels lípids**
- **Classificació dels lípids**
 - Àcids grassos
 - Fosfolípids
 - Esteroides, colesterol
 - ...

* Adaptació de Pràctiques de Bioquímica del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat de Barcelona

- Cromatografia en capa prima
 - Fonaments teòrics
 - Solubilitat i repartició entre diferents eluents
 - Rf
 - ...
 - Tècnica
 - Plaques preparades i cromatofolis
 - Aplicació de les mostres
 - Patrons
 - Desenvolupament de la cromatografia
 - Revelatge i conservació
 - ...

3. *Material i reactius*

3.1. Material

- Extracte lipídic d'alvocat
- Plaques de cromatografia de silicagel
- Tancs per a cromatografia
- Vasos de precipitats
- Capil·lars
- Llapis, regle i tisores
- Guants de plàstic i pinces

3.2. Reactius

- Cloroform
- Metanol
- Aigua destil·lada
- Fosfatidilcolina 10 mg/mL en cloroform
- Colesterol 10 mg/mL en cloroform
- Àcid palmític 10 mg/mL en cloroform
- Tripalmitina 10 mg/mL en cloroform
- Palmitat de colesterol 10 mg/mL en cloroform
- Iode (escates)

3.3. Valoració de riscos

- El cloroform és nociu i inflamable.
- El metanol és tòxic i inflamable.
- Els vapors de iode són tòxics i per això és recomanable desenvolupar tot aquest treball de recerca a la vitrina de gasos.

4. Procediment

- 1) Preparació de 100 mL d'eluent, que serà una mescla de cloroform, metanol i aigua en la proporció en volum de 69 de cloroform, 27 de metanol i 4 d'aigua.
- 2) Preparació de l'extracte lipídic d'alvocat. Es pot obtenir seguint el protocol descrit al treball *Greix a la carta* o amb altres procediments d'extracció general de lípids.
- 3) Preparació i saturació de la cambra cromatogràfica. Cal recobrir interiorment les parets laterals i la del darrera amb paper de filtre per aconseguir una bona saturació de la cambra en posar-hi eluent.
- 4) Activació de la placa de capa prima de silicagel posant-la durant 1-2 hores a l'estufa. En les plaques comercials no és necessari aquest pas.

Compte: no toqueu amb els dits la part de silicagel, empreu pinces i els guants de plàstic.

- 5) Dibuix de la línia d'origen a uns 2 cm del marge inferior de la placa i sobre aquesta unes marques equidistants a uns 2 cm del marge dret i esquerre, respectivament, de la placa i entre ambdues tantes marques equidistants entre elles com patrons i mostres es facin separar en la cromatografia. Tot això amb línies i marques molt suaus fetes amb un llapis i un regle.
- 6) Aplicació sobre la placa de 10 μ L de cada mostra i de cada patró en l'ordre que prèviament hem decidit. Aquestes aplicacions mitjançant capil·lars (un de diferent per a cada patró i també un de diferent per a cada mostra) s'han de fer lentament i procurant que el diàmetre de la taca no sobrepassi els 5 mm; això s'aconsegueix fent una petita aplicació i deixant-la assecar i així successivament fins haver aplicat els 10 μ L pertinents.

- 7) Desenvolupament de la cromatografia posant amb cura la cromatoplaca dins del tanc ja saturat. L'eluent no pot mullar directament les taques dels patrons ni les mostres (les dissoldria i no es produiria una bona separació). Es deixa desenvolupar la cromatografia fins que el front de l'eluent arriba a 1-2 cm del marge superior. Llavors es treu ràpidament la placa del tanc i es marca amb un llapis fins on ha arribat el front i es deixa assecar a la vitrina de gasos (si no es marca, un cop seca la placa, és del tot impossible saber fins on ha arribat el front i, per tant, serà impossible calcular els Rf característics de cada taca després del revelatge).
- 8) Revelatge dels lípids patrons i dels que formen part de les mostres en posar la placa ja assecada dins un altre tanc de cromatografia amb escates de iode. Els vapors de iode, que són tòxics, revelen els lípids i, així, quan ja es veuen les taques, es treu la cromatoplaca i amb un llapis ràpidament es dibuixen les taques (com que el iode s'evapora de la placa, després de 10 minuts ja no es veuen les taques). Es deixa la placa una estona a la vitrina de gasos.
- 9) Càlcul dels Rf que identifiquen cada patró i cada lípid de les mostres. L'Rf és la relació entre el recorregut de la taca (distància de l'origen fins al centre geomètric de la taca) i el recorregut del front (distància de l'origen fins al front). El valor Rf en una cromatografia amb un determinat eluent és una característica de cada lípid.

5. Resultats i discussió

5.1. Resultats

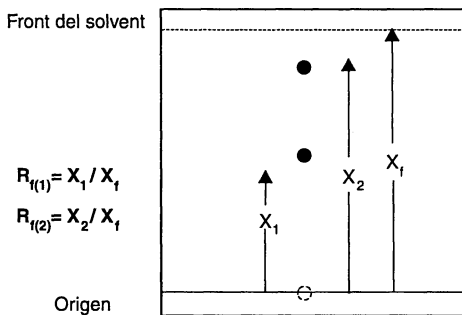


FIG. 11.1. "Cromatografia de lípids".

Valors del Rf obtinguts amb l'eluent constituït per clorofom, metanol i aigua.

	FC	C	TP	PC	AP
Rf	0,2	0,78	0,96	0,96	0,76
Rf mostra	x		x	x	

FC: Fosfatidilcolina
C: Colesterol
TP: Tripalmitina
PC: Palmitat de colesterol
AP: Àcid palmític

5.2. Discussió

- Els lípids són substàncies només solubles en dissolvents orgànics. Tot i això, amb la tècnica de la cromatografia en capa prima, s'observa una bona separació dels lípids integrants de la mostra. Aquesta separació és deguda al diferent coeficient de repartiment de cada lípid entre l'aigua de la placa de silicagel i l'eluent.
- S'observa que amb l'eluent emprat els patrons colesterol i àcid palmític, d'una banda, i tripalmitina i palmitat de colesterol, de l'altra, no es poden diferenciar pels seus Rf. Si es modifica la composició iònica de l'eluent (un eluent més apolar) es poden trobar condicions en què aquests patrons quedin clarament diferenciats.
- Cal tenir present que la quantitat de greix en l'alvocat depèn de la zona de la fruita que s'hagi extret.
- *Lligada a la introducció específica de cada treball.*
- ...

6. Conclusions

- L'alvocat no té colesterol ni àcid palmític que es pugui detectar per la tècnica de la cromatografia en capa prima.

- L'alvocat presenta fosfolípids i èsters d'àcids grassos.
- *Lligada a la introducció específica de cada treball.*
- ...

7. Bibliografia

- Llibres de text de biologia (2n de batxillerat i COU).
- Abbott, D.; Andrews, R. S. *Introducció a la cromatografia*. Ed. Alhambra, 1973.
- Christie, W. W. *Lipid Analysis*. 2a edició. Pergamon Press, 1982.
- Enciclopèdies temàtiques.
- Revistes de divulgació científica.
- ...

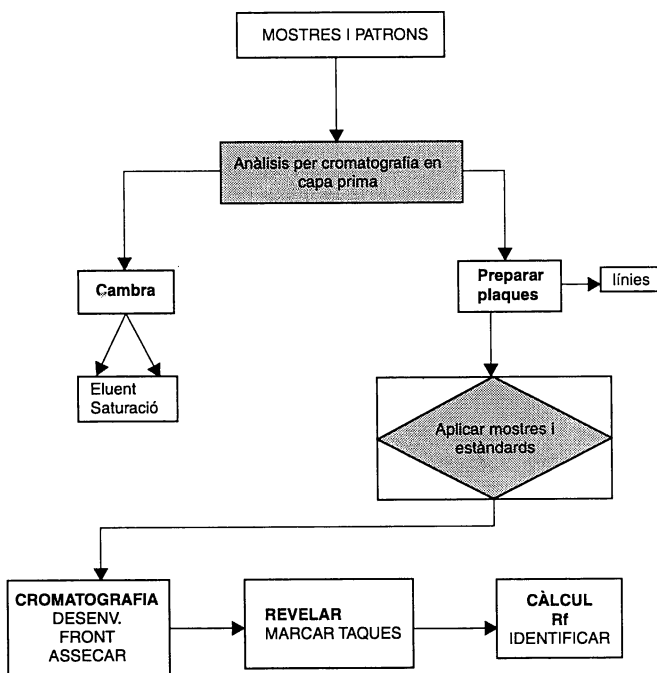


FIG. 11.2. Cromatografia de lípids.

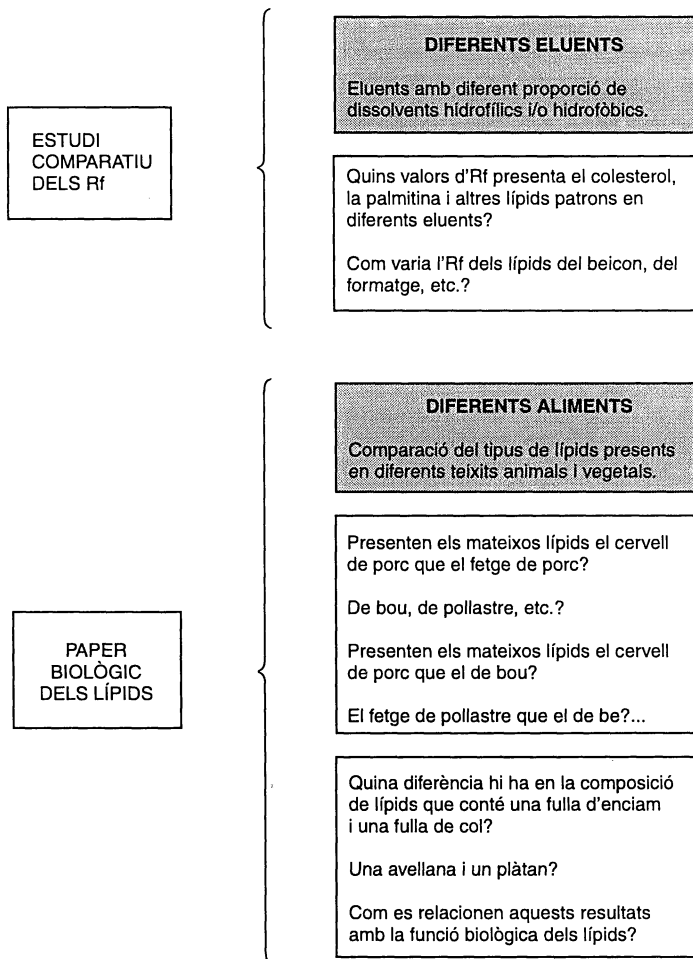


FIG. 11.3. Treballs de recerca relacionats amb cromatografia de lípids.

La seguretat en el laboratori

La seguretat en el laboratori es divideix en tres apartats: la seguretat personal (el comportament de cada alumne/a dins el laboratori); la seguretat relacionada amb l'experiment (les mesures especials de cada experiment en particular) i el tractament dels residus i les deixalles.

La seguretat personal

S'aconsella:

- portar bata i ulleres de seguretat;
- recollir-se els cabells llargs;
- no tastar mai un producte químic ni tocar-se els ulls o la boca amb les mans mentre es fa un experiment;
- rentar-se les mans amb sabó després de tocar qualsevol producte químic;
- tenir les mans sempre netes i eixutes i no tocar mai amb les mans humides cap instal·lació o aparell elèctric;
- no menjar, ni beure, ni fumar en el laboratori.

La seguretat relacionada amb l'experiment

- Abans de començar l'experiment cal assegurar-se que s'ha entès el protocol, tot el que cal fer i el perquè.
- Cal comprovar tot el material necessari i que tot estigui en ordre. Si l'alumnat té dubtes haurà de consultar el professorat.
- De l'etiqueta dels productes emprats s'extraurà tota la informació, especialment el tipus de perillositat que comporta el seu maneig.
- No s'han d'emprar altres productes o utilitatge que no corresponguin a l'experiment en qüestió. I no s'han de desenvolupar nous experiments si el professorat no n'està al corrent.

- L'utilatge ha d'estar ben net; si no, cal netejar-lo abans de començar l'experiment.
- Per pesar els productes o substàncies cal utilitzar el vidre de rellotge, un paper, etc.; mai no s'ha de pesar directament sobre la balança.
- El vidre es trenca fàcilment i pot ser origen de ferides. Quan està calent té el mateix aspecte que quan està fred.
- Tots els endolls del laboratori tenen indicat el seu voltatge; per tant, sempre cal comprovar, abans de connectar, que és l'adequat.
- En cas d'avaria en aparells connectats a la xarxa elèctrica, s'han de desconectar abans d'iniciar qualsevol investigació de les causes.
- En acabar la pràctica, cal netejar i ordenar tot el material. També s'ha de comprovar que tot quedi en ordre i desconectar els aparells elèctrics.
- ...

Tractament de residus i deixalles

Els residus són potencialment perillosos en la mesura que poden desencadenar reaccions imprevisibles. La solució no consisteix a llençar-los al desguàs de la pica o al cubell de les escombraries, ja que les conseqüències podrien ser greus: poden fer malbé les canonades del desguàs, produir reaccions secundàries, contaminacions, etc. És per això que:

- Els residus sòlids no es llençen a les aigüeres. L'aigua és un dels reactius més importants i versàtils i un medi en el qual moltes reaccions es desenvolupen amb rapidesa. Cal dipositar-los en bosses, caixes o recipients destinats a aquest efecte, i separar sempre el vidre de les altres substàncies. Si hi ha sòlids incompatibles no poden estar en el mateix recipient.
- Els residus dels àcids es dipositen en recipients separats. Aquests residus es barregen, sempre a la vitrina de gasos, amb NaHCO_3 sec (bicarbonat de sodi) i després es dilueixen amb aigua, a poc a poc. Finalment es llencen al desguàs i es deixa que l'aixeta de l'aigua ragi considerablement durant una estona.
- Els residus de les bases es dipositen en un altre recipient, es neutralitzen amb H_2SO_4 diluït (àcid sulfúric) fins a un pH de 7; a continuació es dilueixen amb aigua i es llencen al desguàs, igual que els àcids.