



UNIVERSITAT DE VIC
UNIVERSITAT CENTRAL
DE CATALUNYA

Treball de Fi de Grau

*Estudi de la toxicitat de nano-partícules
en els rius utilitzant *Hydropsyche
exocellata* (O. Trichoptera) com a
organisme model.*

Daniel Torres Garcia

Grau en Biologia

Tutor: Miguel Cañedo-Argüelles Iglesias

Vic, Juny de 2016



DADES DEL TREBALL

Títol del treball: *Estudi de la toxicitat de nano-partícules en els rius utilitzant a Hydropsyche exocellata (O. Trichoptera) com a organisme model.*

Autor: Daniel Torres Garcia

Tutor: Miguel Cañedo-Argüelles Iglesias

Grup de recerca: Biodiversitat, Ecologia, Tecnologia i Gestió Ambiental (BETA)

Data d'entrega: 2 de Juny de 2016

Grau: Biologia

RESUM:

Paraules clau: ENPs, nTiO₂, ROS, *Hydropsyche exocellata*

Les nano-partícules manufacturades (*Engineered Nanoparticles*; ENPs) representen un estat intermedi de la matèria amb importants aplicacions innovadores degut a les seves propietats físiques i químiques en aquests nivells de la matèria i la seva capacitat de reaccionar amb importants biomolècules. Actualment, la indústria nano-tecnològica treballa per a diversos camps com per exemple la medicina, la indústria farmacèutica, la fabricació de tecnologies electròniques, etc. El problema recau en que els residus generats d'aquesta indústria podrien acabar als rius donat que no hi ha un tractament específic per a les ENPs a les plantes de tractament d'aigües residuals i la informació sobre els efectes que poden provocar als organismes aquàtics és escassa. Per aquest motiu, l'objectiu d'aquest Treball de Fi de Grau ha estat el d'avaluar els efectes que produeix la nano-partícula de diòxid de titani (*Nanosized Titanium Dioxide*; nTiO₂) sobre una població de larves aquàtiques de l'espècie de tricòpter *Hydropsyche exocellata*. En l'experiment dut a terme es va exposar una població de *H. exocellata* a diversos tractaments de nTiO₂ (control; 0,5; 1,0; 5; 10 i 50 mg/l) durant 2 setmanes. Els individus sotmesos a una concentració de 50 mg/l de nTiO₂ es van mostrar significativament més estressats que la població del tractament control, que es va traduir en un augment en la locomoció per ventilar les seves brànquies i en un augment de la peroxidació lipídica que podria indicar estrès oxidatiu a nivell cel·lular per la capacitat del nTiO₂ de produir espècies químiques reactives de l'oxigen (*Reactive Oxygen Species*; ROS). El temps d'exposició també va provocar un efecte d'estrès sobre la població de *H. exocellata* donat que els individus es van trobar significativament més estressats al cap de 2 setmanes d'experiment. Altrament, la mortalitat més elevada es va produir en el tractament de 50 mg/l de nTiO₂ amb un 55,56% dels individus morts, el que podria significar que hem trobat concentracions òptimes per *H. exocellata* i que es trobarien per sota d'aquests 50 mg/l. Finalment, concloem que una concentració de 50 mg/l de nTiO₂ podria provocar un efecte tòxic a l'espècie *H. exocellata*, que inclús concentracions més petites podrien ser tòxiques per altres espècies d'invertebrats aquàtics més sensibles a la contaminació, així que es necessita una normativa que proposi concentracions límit de ENPs i processos per eliminar-les en les plantes de tractament d'aigües residuals per protegir la biodiversitat aquàtica.

ABSTRACT:

Engineered nanoparticles (ENPs) represent an intermediate state of matter with important innovative applications due to its physical and chemical properties at this level of matter and their ability to react with important biomolecules. Nowadays, the nanotechnology industry is working in different fields as medicine, pharmaceutical industry, electronics, etc. The main problem is based on waste productions from this industry, which could reach to the aquatic environment of rivers because there is currently no special treatment to remove the ENPs from water and there is a lack of knowledge about how will affect the ENPs to the aquatic organisms. For this reason, the aim of this present work was to assess the effects of the Nanosized Titanium Dioxide (nTiO₂) on a population of the caddisfly larvae *Hydropsyche exocellata* (O. Trichoptera). In this experiment, individuals were exposed to different concentrations of nTiO₂ (control; 0,5; 1,0; 5; 10 and 50 mg/l) during 2 weeks. The larvae exposed to 50 mg/l of nTiO₂ were significantly more stressed than the control treatment. This was related to an increase in locomotion in order to facilitate the O₂ uptake to their gills, and an increased levels of lipid peroxidation that could indicate an oxidative stress at the cellular level because of the ability of the nTiO₂ to generate Reactive Oxygen Species (ROS). Moreover, the treatment effect was time-dependent, with toxicity showing higher levels of stress after 2 weeks of experiment. At the same time, the highest mortality was observed in the 50 mg/l of nTiO₂ treatment with a 55,56% of the dead individuals. This result could indicate that we found optimal concentrations for *H. exocellata* that could be placed below 50 mg/l of nTiO₂. Finally, we concluded that a concentration of 50 mg/l could trigger a toxic effect to the caddisfly larvae *H. exocellata*, even lower concentrations could be harmful to more susceptible aquatic species to contamination. So it is necessary a legislation that limits the concentrations of ENPs in the aquatic environment and processes to remove them in wastewater treatment plants to protect the aquatic biodiversity.

ÍNDIX

1. INTRODUCCIÓ.....	pàg. 4
1.1. Les nano-partícules i la nano-tecnologia.....	pàg. 4
1.2. Principals característiques i propietats de les nano-partícules.....	pàg. 5
1.3. Classificació de les nano-partícules i sectors industrials que les fabriquen.....	pàg. 6
1.4. Marc regulatori actual de les ENPs.....	pàg. 8
1.5. Problemàtiques de les nano-partícules al medi aquàtic.....	pàg. 10
1.6. Efectes provocats de les nano-partícules sobre els organismes i la fauna aquàtica.....	pàg. 13
1.7. Els biomarcadors com a indicadors del risc per als organismes aquàtics.....	pàg. 14
1.8. L'espècie <i>Hydropsyche exocellata</i> com a organisme model sota els efectes del nTiO ₂	pàg. 16
2. HIPÒTESI I OBJECTIU DEL TREBALL	pàg. 21
3. MATERIAL I METODOLOGIA.....	pàg. 22
3.1. Recollida de les mostres.....	pàg. 22
3.2. Síntesi i caracterització del nTiO ₂	pàg. 23
3.3. Disseny experimental i funcionament dels aquaris.....	pàg. 25
3.4. Preparació de la solució de nTiO ₂ i dels tractaments.....	pàg. 26
3.5. Test de moviment.....	pàg. 27
3.6. Test de construcció de les xarxes.....	pàg. 27
3.7. Test de mortalitat.....	pàg. 28
3.8. Biomarcadors.....	pàg. 29
3.9. Tractament de les dades i anàlisi estadístic.....	pàg. 31
4. RESULTATS.....	pàg. 32
4.1. Test de moviment.....	pàg. 32
4.2. Test de construcció de les xarxes.....	pàg. 33
4.3. Test de mortalitat.....	pàg. 33
4.4. Biomarcadors.....	pàg. 34
5. DISCUSSIÓ DE RESULTATS.....	pàg. 42
5.1. Efectes subletals.....	pàg. 42
5.2. Efectes letals.....	pàg. 47
6. CONCLUSIONS.....	pàg. 49
7. BIBLIOGRAFIA.....	pàg. 50
8. ANNEX.....	pàg. 58

1. INTRODUCCIÓ

1.1. Les nano-partícules i la nano-tecnologia

Les nano-partícules, o comunament anomenats nano-materials, són l'objecte d'estudi de la nano-tecnologia, una nova branca de la ciència que, durant els últims anys, s'ha dedicat a estudiar les propietats i l'estructura de la matèria a nivell atòmic, molecular i supra-molecular (Moore, 2007). L'objectiu de la nano-tecnologia és el de sintetitzar, modificar i manipular la matèria a aquest nivell, i tractar d'enllaçar punts entre altres camps com poden ser la medicina, la indústria farmacèutica, i la fabricació de tecnologies electròniques i de les telecomunicacions (Gross, 1999; Kim *et al.*, 2005; Perkel, 2004; Royal Society and the Royal Academy of Engineering, 2004).

Les nano-partícules produïdes pel sector de la indústria nano-tecnològica representen un estat supra-molecular intermedi de la matèria (Hoet *et al.*, 2004). A banda de la mida de les partícules (de l'ordre dels 100 nm o inferior; **Fig. 1**), que li proporciona una elevada superfície en relació al seu volum, presenten certes propietats de biocompatibilitat de les seves superfícies amb els teixits dels organismes que va en funció de la càrrega transportada per les partícules i de la seva reactivitat química (Moore, 2007). Es preveu que en un futur, la nano-tecnologia i la biotecnologia convergiran per treballar junts en sistemes i dispositius a nano-escala que utilitzin principis biològics, donat que molts dels components de les cèl·lules són constituïts a aquest mateix nivell d'organització de la matèria (**Fig. 1**) com ara ribosomes, transportadors de membrana, receptors i sistemes de senyalització cel·lular (Moore, 2002; Perkel, 2004).

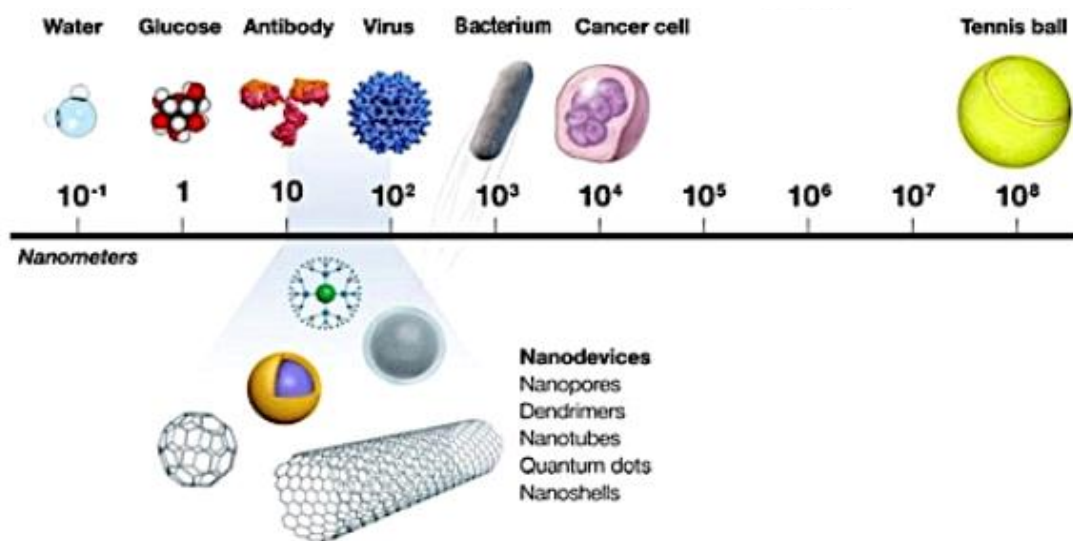


Fig. 1: Representació a l'escala nano-mètrica de la mida dels nano-materials respecte a altres objectes. Extret de: "Nanopartículas magnéticas inmovilizadas en la membrana celular a través de química <<click>> bioortogonal". García (2015).

D'altra banda, l'ús de nano-materials que fa la indústria nano-tecnològica en la fabricació de béns de consum s'ha incrementat de forma significativa durant la passada dècada, arribant fins a uns 1300 productes referenciats (Dobias & Bernier-Latmani, 2013) en el que s'inclouen nombroses categories de productes com: electrodomèstics, tèxtils, electrònics, materials de construcció, salut, *fitness*, etc (Dobias & Bernier-Latmani, 2013). Molts d'aquests nano-materials (que contenen nano-partícules) que es troben en productes d'ús quotidià, com detergents i pintures, no reben actualment el tractament adequat en les plantes de tractament d'aigües residuals i acaben abocant-se als sistemes fluvials. No obstant, degut a la relativa novetat d'aquesta tecnologia hi ha pocs treballs que hagin avaluat els riscos per als sistemes biològics; i les preocupacions sobre l'ús dels productes de la nano-tecnologia apareixen cada cop més freqüentment en públic i en els mitjans de comunicació (Moore, 2007).

Els estudis eco-toxicològics que s'han dut a terme fins a l'actualitat es refereixen a la producció de nano-materials com a *Engineered nanomaterials* (ENMs; Sholz & Nowack, 2009) o nano-partícules com a *Engineered nanoparticles* (ENPs; Dobias & Latmani, 2013; Zhu *et al.*, 2010; Baun *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2012). Tots dos usos del terme fan referència al mateix nivell d'organització i escala, de 1 a 100 nm (**Fig. 1**), amb una petita diferència, quan es refereixen als nano-materials es parla d'un material amb més d'una dimensió externa i amb una estructura interna conformada a nano-escala; en canvi, si es refereixen concretament a les nano-partícules es refereixen a partícules amb una o més dimensions de l'ordre dels 100 nm o menys.

1.2. Principals característiques i propietats de les nano-partícules.

El rang de la nano-escala és des del nivell atòmic, del voltant de 0,2 nm fins als 100 nm. Dintre d'aquest rang els materials poden tenir propietats molt diferents, tant per un augment substancial de la superfície en relació amb el seu volum, com pels efectes quàntics que tenen lloc en aquestes dimensions, el que comporta canvis significatius en les seves propietats físiques (Instituto Riojano de Salud Laboral, 2011). Entre els efectes més importants que fan referència a la seva mida s'hi destaca el confinament dels electrons, que en nano-partícules metàl·liques i semi-conductores té interessants implicacions, com els efectes quàntics en el material i que es poden percebre a través de les seves propietats magnètiques i/o de conducció electrònica. És per aquest motiu que a aquest tipus de partícules se les ha conegut també com a punts quàntics.

Altrament, les nano-partícules presenten certes propietats degudes a la relació existent entre el nombre d'àtoms superficials i la mida de la partícula que és de caràcter exponencial. Per això, les propietats relacionades amb la superfície, com les elèctriques, mecàniques, magnètiques, òptiques o químiques dels nano-materials són diferents a les dels mateixos materials a una escala no nano-mètrica. Degut a que els àtoms de superfície de les nano-partícules es troben menys "entrellaçats" entre ells que la resta dels seus àtoms, i la seva esfera de coordinació es troba incompleta, s'incrementa l'energia lliure superficial, afectant a la seva temperatura de fusió i la reactivitat química (Wang, 1998). Com a exemple, s'ha documentat que la temperatura de fusió de nano-partícules de Pt es redueix de 1773°C en un sòlid volumètric a 600°C en nano-partícules de 8 nm de mitjana (Wang, 1998).

Pel que fa a la relació que s'estableix entre el volum i la superfície de les nano-partícules, aquestes es veuen afectades freqüentment per la seva reactivitat i la seva toxicitat que augmenten considerablement (donat que el nombre d'àtoms en contacte amb la superfície és major; Instituto Riojano de Salud Laboral, 2011). Sí, a més, la superfície d'una partícula s'ha modificat per a aconseguir un determinat comportament, això pot donar lloc a interaccions amb importants molècules biològiques (Ma & Lin, 2013; Alkilany & Murphy, 2010; Neal, 2008), com per exemple catalitzadors de reaccions, en els quals s'ha demostrat que augmenta enormement el poder catalític d'una substància, ja que augmenta la superfície disponible per a que es produeixi la reacció. Totes aquestes propietats és important conèixer-les per a entendre, preveure i gestionar el risc important que presenten per a les persones i el medi ambient.

1.3. Classificació de les nano-partícules i sectors industrials que les fabriquen.

Les nano-partícules es troben agrupades en 4 grups principals de nano-materials segons la majoria de les classificacions establertes:

1. Materials de base de carboni: amb formes esfèriques, el·lipsoïdals o tubulars. Les seves propietats fonamentals són el seu pes reduït i l'augment en la seva duresa, elasticitat i conductivitat elèctrica.
2. Materials de base metàl·lica: que són principalment quantum dots (punts quàntics o transistors d'un sol electró), o bé, nano-partícules d'or, plata o de metalls reactius com el diòxid de titani (TiO₂) entre altres.

3. Dendrimers: són polímers nano-mètrics construïts en forma d'arbre en el que les ramificacions es desenvolupen a partir d'altres i així successivament; les terminacions de cada cadena en ramificacions es poden dissenyar per a executar funcions químiques específiques (una propietat útil per als processos catalítics).
4. Composites: fan una combinació entre certes nano-partícules amb d'altres o amb materials de dimensions superiors; el cas de les argiles nano-estructurades és un exemple del seu ús extens.

Les nano-partícules que actualment provoquen un major impacte sobre la fauna aquàtica, són els materials de base de carboni i metàl·lica donada la seva elevada capacitat per a reaccionar amb compostos biològics i la elevada permeabilitat a través de les membranes cel·lulars. Hi ha estudis recents que indiquen que el risc per als organismes aquàtics prové principalment d'aquests nano-materials, dels quals citen principalment el nano-TiO₂, nano-ZnO, nano-Ag i nano-tubs de carboni com a nano-materials amb un potent efecte ecotoxicològic per als invertebrats aquàtics (Gottschalk *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2010; Dobias & Bernier-Latmani, 2013).

Hi ha diferents sectors industrials (**Taula 1**) que actualment es troben desenvolupant nous productes basats en la utilització dels nano-materials i les nano-partícules. Clarament, la indústria nano-tecnològica es troba en plena expansió cap a diferents àmbits industrials, i és evident que en un futur s'haurà de poder desenvolupar una línia estratègica per gestionar els possibles residus produïts per aquesta nova tecnologia.

Taula 1: Aplicacions que utilitzen la nano-tecnologia, per sector d'activitat industrial. Extret de "La seguridad y salud en la exposición a nanopartículas". Instituto Riojano de Salud Laboral (2011).

SECTOR D'ACTIVITAT	EXEMPLES D'APLICACIONS ACTUALS I PROPOSTES
Automoció, aeronàutica	Materials reforçats, més lleugers; pintures més brillants, amb efectes de color, resistents a esgarrapades, anticorrosius i antiincrustants; additius per al dièsel que permeten una millora en la combustió; neumàtics més duradors i reciclables.
Electrònica i comunicació	Memòries d'elevada densitat i processadors miniaturitzats, cèl·lules solars, tecnologia sense fil i pantalles planes.
Química i materials	Pintures d'anticorrosius i ignífugues, catalitzadors, tèxtils amb recobriments antibacterians i ultra resistents. Materials més lleugers i resistents.
Farmàcia, biomedicina i biotecnologia	Medicaments a mesura alliberats en òrgans específics, kits d'autodiagnosi, biosensors, pròtesis i implants.
Cosmètics	Crems solars transparents, nano-esferes amb antioxidants.

Salut	Dispositius de diagnosi i detecció miniaturitzats, destrucció de tumors per aplicació de calor, teràpia gènica, micro-cirurgia i medicina reparadora: nano-implants i pròtesis i membranes per a diàlisi
Energia	Generació d'energia fotovoltaica, nous tipus de bateries i materials aïllants més eficaços.
Medi Ambient i ecologia	Disminució de les emissions de CO ₂ , producció d'aigua ultra pura a partir d'aigua de mar , pesticides i fertilitzants més eficaços i menys virulents i sensors per a la neteja del medi ambient.
Defensa	Sistemes de vigilància miniaturitzats i sistemes d'orientació més eficaços.
Alimentació	Envasos amb propietats antimicrobianes, detecció de contaminants patògens, envasos interactius amb sensors, alliberació de forma controlada de nous aromes o sabors mitjançant nano-càpsules, conservants més eficaços, potenciadors de sabor, etc.

Per exemple, els nano-materials que es troben compostos per nano-Ag (*silver nanoparticles* o AgNPs en la seva abreviatura) es troben en una gran varietat de productes de consum. La fabricació de AgNPS s'utilitza per les seves característiques antimicrobianes (Dobias & Bernier-Latmani, 2013) a la indústria tèxtil (Nowack, 2010), envasos d'aliments i altres articles on l'activitat antimicrobiana són desitjables. Altres indústries que utilitzen AgNPs també són l'electrònica i la fotogràfica (Nowack, 2010). En el cas dels nano-materials formats per nano-partícules de TiO₂ (*Nanosized Titanium Dioxide* o nTiO₂) són utilitzats en la fabricació de protectors solars, cosmètics, pintures i recobriments. Aquests nano-materials representen només una petita part de tots els que s'estan utilitzant en la fabricació de productes dels diferents sectors esmentats anteriorment.

1.4. Marc regulatori actual de les ENPs.

A nivell europeu, la regulació en l'ús de les ENPs pels diferents sectors de la indústria nanotecnològica es basa en garantir la salut humana i la seguretat ambiental. La Comissió Europea va publicar un dictamen l'any 2006, no vinculant, anomenat Adequació de les Metodologies Actuals a l'Hora d'Avaluar els Risc Potencials Derivats de Productes Manufacturats o Adventicis de les Nanotecnologies (SCENIHR /002/05); elaborat per la Comitiva Científica de Riscos Sanitaris Emergents i Recentment Identificats (CCRSERI). Aquest document comprenia els marcs de regulació de la UE aplicables als nano-materials (substàncies químiques, protecció dels treballadors, legislació ambiental, legislació específica dels productes, etc.).

L'objectiu d'aquest dictamen va ser analitzar, i si correspon, proposar adaptacions a la legislació de la UE en els sectors més importants; així ho reflexa en el Pla d'Acció que la Comissió Europea va firmar l'any 2007. Malgrat tot, la comissió va posar de manifest en el Pla d'Acció que era necessari abordar gran part de l'absència de coneixement (com concentracions tòxiques) amb la finalitat de la implementació i l'adaptació dels "documents probatoris".

En el Pla d'Acció sobre Nano-ciències i Nano-Tecnologies (N&N) es va establir que la Comissió Europea proposaria reforçar la investigació i el desenvolupament en matèria de N&N per portar a terme estratègies o programes d'investigació dissenyats per abordar els aspectes de regulació de cara a la salut humana i/o a la seguretat ambiental dels nano-materials, a través d'estudis toxicològics i eco-toxicològics. Així com també mitjançant la creació de les metodologies i la instrumentació adequades per a monitoritzar i minimitzar l'exposició en els llocs de treball.

En el reglament (CE) 1907/2006 que la comissió va elaborar l'any 2006 en relació al Registre, l'Avaluació, l'Autorització i la Restricció de les Substàncies Químiques i Preparats (REACH) no va ser específic per als nano-materials però regulava la seva entrada al mercat, les classificava i obligava a les autoritats competents a requerir més informació sobre aspectes de seguretat, salut, propietats fisicoquímiques i medi ambient. Des de llavors, les accions portades a terme per la UE han estat el de crear magatzems de nano-materials que siguin representatius i rellevants, incloent dintre de la definició de nano-materials alguns compostos específics (en concret: diòxid de titani, sílice, òxid de zinc, cèria, nano-plata, nano-argiles i nano-tubs de carboni) i repartir vials pels territoris comunitaris. Amb tot, encara la Comissió Europea no ha establert una regulació vinculant específica per als límits permesos en l'ús i abocament de nano-materials al medi ambient fins que no s'identifiquin els seus efectes en els ecosistemes aquàtics.

A nivell de l'Estat Espanyol, es va desenvolupar la Plataforma Española de Nanotecnología (NanoSpain), pertanyent al Ministerio de Ciencia e Innovación amb la col·laboració de més de 41 empreses i 2000 investigadors. D'aquesta plataforma es va crear al 2008 una base de dades, amb suport de la UE, crítica i fonamental sobre l'impacte en la seguretat, la salut i el medi ambient de les nano-partícules (NHCED, 2008).

1.5. Problemàtiques de les nano-partícules al medi aquàtic.

1.5.1. *Les nano-partícules als ecosistemes aquàtics*

Els productes industrials i els seus residus acostumen a acabar als ecosistemes aquàtics (és a dir, a rius, llacs, estuaris i aigües costaneres), a excepció d'aquelles aigües que són tractades prèviament per les plantes d'aigües residuals i espais aquàtics que s'inclouen dintre d'àrees protegides (Moore, 2006). És inevitable pensar que la indústria nano-tecnològica no aboqui els seus residus als espais fluvials (Moore, 2006), com la majoria de sectors industrials, però aquesta nova tecnologia és diferent; degut principalment a la seva innovadora expansió per diferents sectors, l'augment del seu ús, l'absència de coneixement sobre com evitar que les ENPs provinents de la indústria arribin als espais fluvials i els efectes que poden provocar a la vida aquàtica. El problema a l'actualitat recau en que les plantes de tractament d'aigües residuals no estan dissenyades per eliminar les ENPs, així que malgrat l'aigua sigui tractada a les depuradores, segurament continuarà tenint ENPs dissoltes. A més el problema s'agreuja perquè les produccions de nano-materials constituïts per ENPs s'estan començant a comercialitzar a gran escala i ja hi ha estudis que indiquen que en algunes de les zones més industrialitzades del planeta, concretament a Europa i Amèrica, els efluents de plantes d'aigües residuals presenten unes concentracions de TiO_2 de l'ordre de $3,47 \mu\text{g/l}$ i d'uns $0,015 \mu\text{g/l}$ als cursos fluvials com a valors centrals (Sholz & Nowack, 2009). Altres ENPs, com les de Ag, han estat detectades a unes concentracions de $42,5 \text{ ng/l}$ en efluents de plantes de tractament d'aigües residuals i d'uns $0,76 \text{ ng/l}$ als cursos fluvials (Sholz & Nowack, 2009).

A l'actualitat, aquestes concentracions no són alarmants, però si aquestes produccions continuen a l'alça, la concentració d'aquests compostos metàl·lics continuarà augmentant; i fins al moment, no es coneixen quins poden ser els efectes sobre la fauna aquàtica degut a la seva propietat de biocompatibilitat amb els teixits orgànics. En conseqüència, això implica que en un futur s'hagin de desenvolupar procediments d'avaluació de riscos eficaços vigents tant aviat com sigui possible per fer front a perills potencials per a la vida aquàtica (Moore, 2006).

1.5.2. Absorció de les nano-partícules i biodisponibilitat als ecosistemes aquàtics.

L'absorció de les ENPs de la biota aquàtica és una de les principals preocupacions. Les ENPs a l'ambient aquàtic entren en forma de partícules re-suspeses i són assimilades pels organismes planctònics, com poden ser el zooplàncton i les algues microscòpiques, com també invertebrats aquàtics del sediment (**Fig. 2**) que les assimilen per diferents vies d'entrada (Baun *et al.*, 2008). Les possibles vies d'entrada inclouen la ingesta directa o a través dels òrgans olfactivs, per l'exoesquelet, o bé, pel contacte de l'aigua amb la superfície de l'epiteli que recobreix les seves brànquies (Moore, 2006). Una vegada que les ENPs són absorbides per les algues i els invertebrats aquàtics, la problemàtica més important és la bioacumulació en els teixits i les cèl·lules d'aquests grups, provocant que les ENPs passin a altres nivells de la cadena tròfica i un greu problema eco-toxicològic. La majoria d'estudis han utilitzat a *Daphnia magna* (una espècie d'invertebrat aquàtic pertanyent al subfilum dels Crustacis; i la família dels Dàfnids) com a organisme model, el qual és important tenir-lo en consideració pel seu important paper com a organisme filtrador de grans volums d'aigua en comparació a la seva mida corporal (Baun *et al.*, 2008); facilitant així els estudis que volen mostrar els efectes de les ENPs sobre els invertebrats aquàtics. Els crustacis planctònics, com els de la família dels Dàfnids, són un grup d'organismes important per a qualsevol xarxa tròfica aquàtica, ja que són generalment els organismes que enllacen els productors primaris, com les espècies d'algues; i els consumidors secundaris, com les espècies de peixos (Baun *et al.*, 2008).

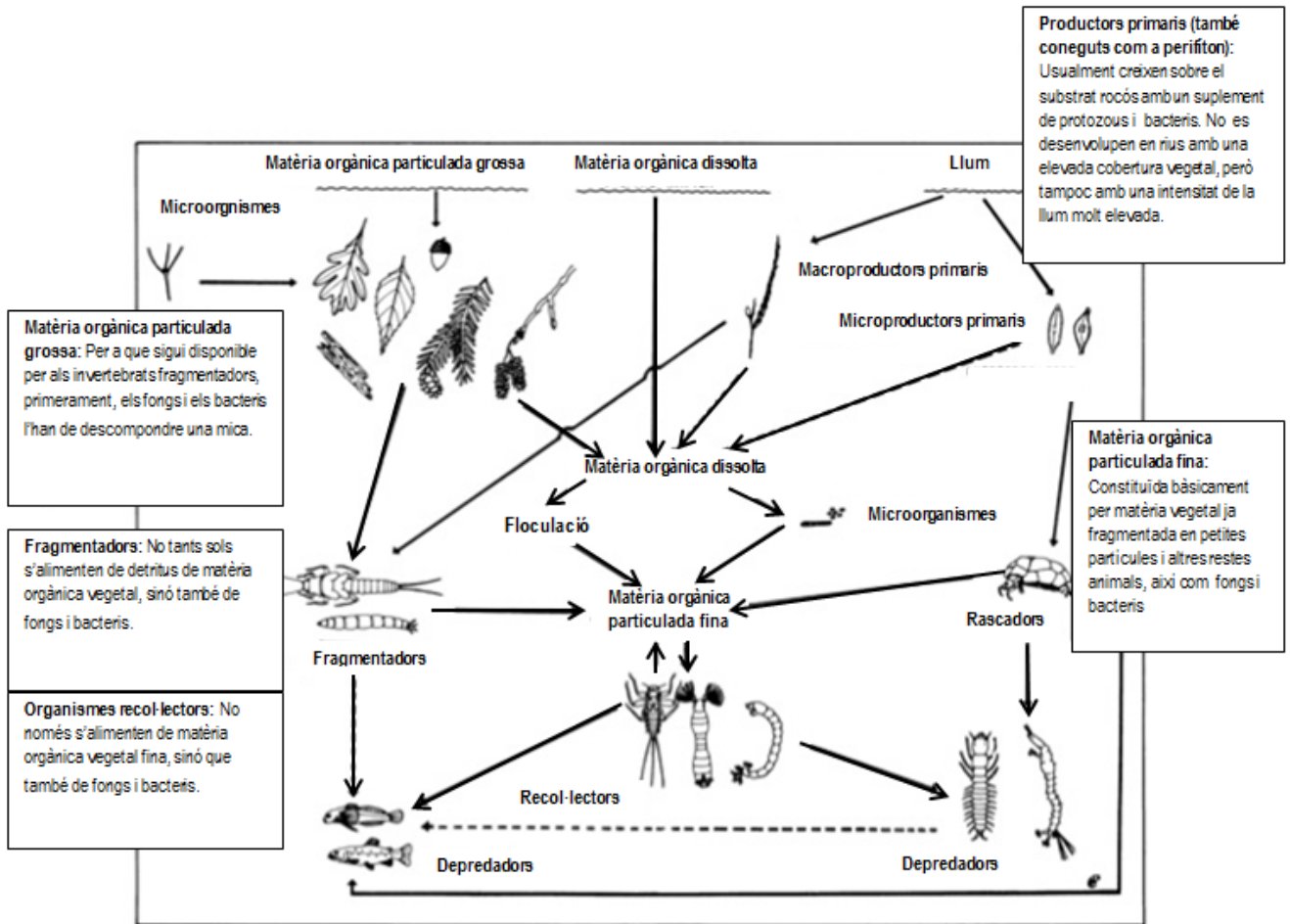


Fig. 2: Representació gràfica d'una xarxa tròfica d'un sistema fluvial. En l'esquema s'hi destaquen els diferents grups funcionals d'invertebrats aquàtics que contínuament van re-utilitzant la matèria orgànica i la fan assimilable per a altres grups d'organismes. Adaptat de: Cummins (1973).

Els invertebrats aquàtics (com a grup funcional d'organismes) participen en tots els processos ecològics dels sistemes aquàtics (Hanson, *et al.*, 2010). Energèticament, les xarxes tròfiques aquàtiques (Fig. 2) es basen en el material autòcton produït per les algues, o bé, pel material al·lòcton que entra en el sistema aquàtic des de l'exterior (Hanson, *et al.*, 2010). Encara que en realitat són ecosistemes on hi intervenen molts tipus d'organismes diferents que conviuen en un mateix espai i que contínuament van reciclant la matèria orgànica per fer-la assimilable per a altres grups d'organismes. Els invertebrats controlen la producció primària consumint grans quantitats d'algues (Fig. 2), però també s'alimenten d'altres microorganismes associats al perifiton dels rius (Allan & Castillo, 2007). Altres organismes s'alimenten del material al·lòcton que entra al riu, com la fullaraca. D'aquesta manera, els invertebrats aquàtics fragmentadors degraden la matèria orgànica al·lòctona a materials orgànics de mida petita i assimilable per a altres organismes, com els recol·lectors i filtradors (Allan & Castillo, 2007).

Els invertebrats filtradors, alhora, remouen les partícules fines (sèston) de l'aigua i les fan més denses, d'aquesta manera són aprofitades per altre grup d'invertebrats (Hanson, *et al.*, 2010). D'altra banda, moltes espècies d'invertebrats aquàtics serveixen d'aliment per als peixos (Nakano, 1999; **Fig. 2**), com per a animals terrestres com aràcnids, aus i rat-penats (Hanson, *et al.*, 2010) o inclús aus aquàtiques. D'aquí parteix la importància d'estudiar els invertebrats aquàtics com a grup ecològic davant les principals amenaces pels impactes antropogènics, com en el cas de les ENPs. A nivell global, els ecosistemes aquàtics ja es troben severament amenaçats per pressions antròpiques i actualment s'està observant una reducció dràstica de la biodiversitat aquàtica. D'aquesta manera, no ens podem permetre el luxe d'ignorar el risc que pot suposar la contaminació per nano-partícules.

1.6. Efectes provocats de les nano-partícules sobre els organismes i la fauna aquàtica.

Un agent tòxic és aquell compost que pot produir una resposta adversa (efecte) en un sistema biològic, que danya greument la seva estructura o funció, i inclús, produint la mort de l'organisme (Rand & Petrocelli, 1985). En canvi, la toxicitat és una propietat relativa d'una substància química que fa referència al seu potencial de produir efectes nocius en un organisme viu. Aquest últim va en funció de la concentració i del temps d'exposició a la substància química (Rand & Petrocelli, 1985). Les ENPs són agents tòxics que provoquen una certa toxicitat a les espècies aquàtiques de qualsevol sistema fluvial on siguin abocades, entre els quals s'hi destaquen dos tipus de respostes de la fauna aquàtica a la seva exposició, les que són pròpiament visibles a nivell de l'individu i les que són a nivell cel·lular.

1.6.1. Efectes letals i subletals en l'individu

En relació als efectes que poden provocar sobre el nivell individual, alguns estudis han testat els efectes de les ENPs en l'espècie *D. magna*. En el cas de Zhu *et al.* (2010) mostra com una exposició d'unes 48 hores a 50 i 100 mg/l de nTiO₂, provoca efectes subletals lleus com la immobilització del 100% dels individus i uns nivells de mortalitat no significatius. Però si l'exposició a les mateixes concentracions de nTiO₂ es prolonguen a les 72 hores, els efectes letals i subletals són encara més perjudicials sobre *D. magna*, en aquest cas, la prolongació en el temps provoca que la mortalitat ascendeixi fins al 100% dels individus. Els nivells de mortalitat apareixen també amb l'exposició a les concentracions més baixes, de

l'ordre de 0,1 mg/l. Una exposició crònica de nTiO₂ durant 21 dies sobre *D. magna*, Zhu *et al.* (2010) demostra que, inclús, unes concentracions baixes de 0,1 mg/l durant aquest període de temps li provoca efectes subletals considerables, com la disminució del nombre d'individus a la descendència i la inhibició del creixement i la reproducció de la població. L'estudi també indica que la concentració necessària per a que la mortalitat ascendeixi al 50% dels individus de la població (LC₅₀) es situa en 2,62 mg/l de nTiO₂ sota una exposició crònica. Aquests resultats posen de manifest que l'exposició a nTiO₂, especialment durant llargs períodes de temps, pot exercir impactes negatius a les poblacions dels organismes aquàtics (Zhu *et al.*, 2010).

1.6.2. Efectes a nivell cel·lular

A nivell cel·lular, les ENPs entren via endocitosis (Moore, 2006). Dintre de les cèl·lules, per l'elevada superfície que presenten les ENPs respecte al seu volum, poden reaccionar amb d'altres molècules produint radicals lliures d'oxigen. Aquestes espècies químiques són altament oxidants i poden danyar el DNA, les proteïnes i les membranes cel·lulars (Brown *et al.*, 2001). Les cèl·lules utilitzen diferents vies metabòliques per eliminar els radicals lliures d'oxigen que les ENPs generen, donat que alguns metabòlits cel·lulars reaccionen fent una biotransformació d'aquests radicals. Són aquests metabòlits els que es poden analitzar i que s'anomenen biomarcadors. La informació donada pels biomarcadors és molt útil alhora de determinar si l'organisme es troba sota els efectes de qualsevol estrès ambiental com pot ser en aquest cas, el de la contaminació de l'hàbitat on viu per la presència de ENPs.

1.7. Els biomarcadors com a indicadors del risc per als organismes aquàtics.

L'ús de biomarcadors ens permet estudiar quines són les respostes a qualsevol canvi ambiental que provoquen un estrès als organismes i és mesurat a nivell intracel·lular, indicant una desviació en el normal funcionament cel·lular i que no pot ser detectat observant l'organisme en sí mateix (Van der Oost *et al.*, 2003).

Els organismes que es troben constantment exposats a agents contaminants potencialment tòxics presenten mecanismes de defensa contra aquests compostos, de tal manera que hi ha una impressionant varietat d'enzims i vies de biotransformacions involucrades en la desintoxicació i la seva eliminació. Els biomarcadors poden proporcionar eines per avaluar

l'absorció, la biodisponibilitat i els efectes nocius de les ENPs en el medi aquàtic, com ja es fa amb d'altres agents contaminants químics més convencionals (Deplege *et al.*, 1993; Galloway *et al.*, 2002, 2004; Livingstone *et al.*, 2000; Lowe *et al.*, 1995a,b; Moore *et al.*, 2004; Wells *et al.*, 2001).

L'absorció dels agents contaminants (o xenobiòtics) als organismes és obstruïda per les barreres biològiques, com el teixit epitelial i també les membranes cel·lulars (**Fig. 3**). D'altra banda, molts agents contaminants orgànics són substàncies lipofíliques (**Fig. 3**). Aquesta característica els permet travessar les membranes cel·lulars més fàcilment i ser distribuïts per tot l'organisme, malgrat que és important tenir en consideració la naturalesa química del contaminant en qüestió. El metabolisme clàssic d'aquests xenobiòtics és dividit en quatre fases: la fase 0, la fase I, la fase II i la fase III (**Fig. 3**). La fase 0 i III es troben involucrades en l'entrada i la sortida respectivament de xenobiòtics a les cèl·lules mitjançant transportadors de membrana (**Fig. 3**). En canvi, la fase I i II són les encarregades de la biotransformació que dona com a resultat la transformació dels agents contaminants en compostos solubles i que minimitzen la seva reactivitat amb d'altres molècules orgàniques (**Fig. 3**).

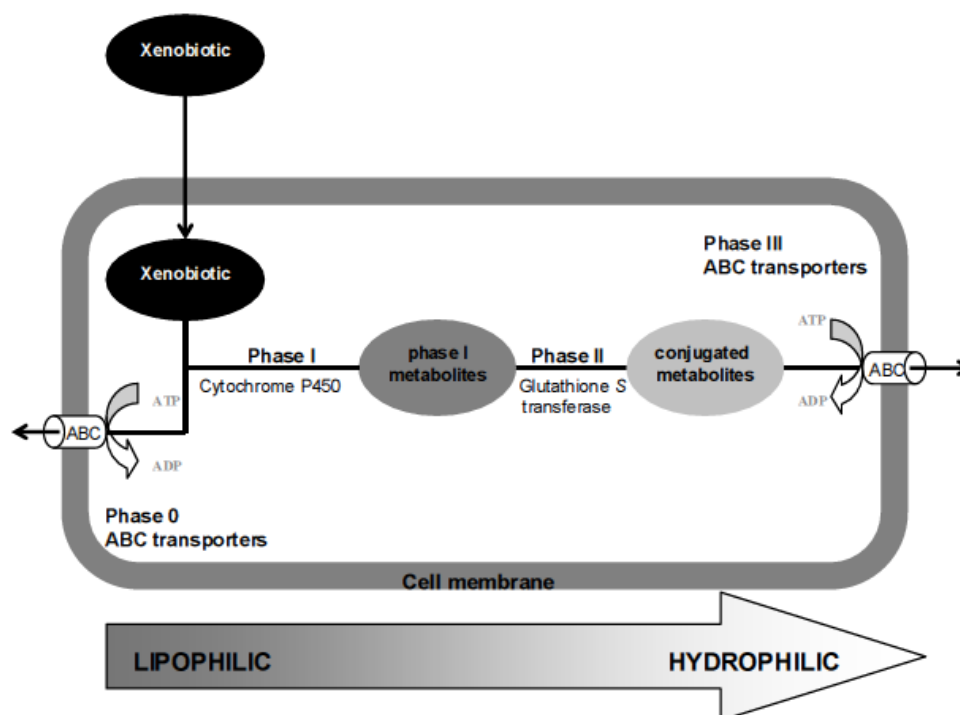


Fig. 3: Esquema on s'indiquen les 4 fases del metabolisme genèric dels agents contaminants (o xenobiòtics) una vegada entren dintre de la cèl·lula. Les cèl·lules intenten eliminar les substàncies alienes mitjançant la biotransformació dels agents contaminants amb l'ús d'enzims que són utilitzats com a biomarcadors per a l'avaluació de la toxicitat d'agents contaminants en el medi aquàtic. Extret de "Functional characterization and expression of molluscan detoxification enzymes and transporters involved in dietary allelochemical resistance". Whalen (2008).

No obstant, com en d'altres agents contaminants, és probable trobar biomarcadors per a les ENPs, que siguin genèrics, com és en el cas del dany oxidatiu; on el metabolisme aeròbic dels agents contaminants és energèticament costós i requereix grans quantitats d'oxigen, que reacciona produint espècies químiques reactives de l'oxigen (o ROS, de l'anglès *Reactive Oxygen Species*; Livingstone, 1991). Són uns potents agents oxidants, capaços de reaccionar amb importants complexos macromoleculars de les cèl·lules, que condueix a la inactivació d'enzims, la peroxidació dels lípids, danys en el DNA i les proteïnes i la mort cel·lular (Winston & Di Giulio, 1991).

Els mecanismes de defensa contra el poder oxidatiu que produeixen els agents contaminants són més elevats en els teixits on es donen a terme les funcions relacionades amb el processament dels nutrients (Livingstone, 2003). En una cèl·lula amb un correcte funcionament, les ROS i els seus productes són eliminats pels seus mecanismes anti-oxidatius. Dintre d'aquests mecanismes anti-oxidatius s'inclouen eliminadors de radicals lliures de baix pes molecular: com la vitamina C, la glutatona reduïda (GSH), carotenoides, etc; i els enzims antioxidants específics: com la superòxid dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) i la glutatona peroxidasa (GPx).

1.8. L'espècie *Hydropsyche exocellata* com a organisme model sota els efectes del nTiO₂

Per avaluar la toxicitat de les ENPs en aquest treball hem escollit l'espècie *Hydropsyche exocellata*, una espècie d'invertebrat aquàtic que pertany a l'ordre dels tricòpters (**Taula 2**). Aquesta espècie s'ha utilitzat en estudis anteriors perquè és resistent a les condicions del laboratori, és molt abundant als rius mediterranis i també és fàcilment manipulable. A més per al nostre interès, ja s'ha utilitzat en estudis de toxicitat, com per exemple, en l'efecte tòxic que produeixen alguns metalls que són presents a algunes zones concretes del riu Llobregat, i la seva susceptibilitat a produir un estrès oxidatiu a les larves de *H. exocellata* (Barata *et al.*, 2005; Damásio *et al.*, 2011). D'altra banda, i gràcies a l'estudi de toxicitat de sals de Sala *et al.* (2015), es coneixen canvis (observables i mesurables) en el comportament d'aquesta espècie quan està sotmesa a un estrès ambiental per la presència d'un agent contaminant a les aigües que habita, i que s'anomenen efectes subletals. Els efectes subletals que coneixem inclouen la freqüència de les contraccions abdominals i la irregularitat de les xarxes que construeixen les larves per a capturar l'aliment. Tots dos són efectes totalment comparables amb altres estudis de toxicitat.

1.8.1. Morfologia i característiques de l'espècie

Aquesta espècie de tricòpter és un macroinvertebrat aquàtic que en el seu estat larvari (**Fig. 4**) presenta unes dimensions considerables segons la fase de desenvolupament larvari en la que es trobi; fet que ens permet identificar-lo fàcilment sota les roques dels cursos fluvials catalans perquè els seus cossos són grans i corbats (**Fig. 4**). Durant el seu estat larvari, el cos presenta la part dorsal totalment esclerosada, tant sols els grups que pertanyen a les famílies *Hydropsychidae* (**Taula 2**) i *Hydroptilidae* comparteixen aquesta característica dintre de l'ordre *Trichoptera* (**Taula 2**). Aquesta característica combinada amb la presència de les brànquies (**Fig. 4B**) que s'estenen de forma ramificada i que es prolonguen a partir de la superfície ventral, fa diferenciar la família *Hydropsychidae* de la resta de tricòpters. A la part anal tenen uns pseudopodis (**Fig. 4A**) amb una mena d'urpes que li serveixen per agarrar-se al substrat rocós dels rius que és on es troben majoritàriament vivint.



Fig. 4: Fotografia d'un individu de l'espècie *Hydropsyche exocellata* al laboratori. Es pot observar la morfologia característica d'aquesta espècie: (A) els pseudopodis situats a l'extrem del seu cos i les "urpes" a l'extrem d'aquests i (B) les brànquies ramificades que li surten de la part ventral. Font: Elaboració pròpia.

Taula 2: Classificació de l'espècie *Hydropsyche exocellata*. Font: Elaboració pròpia.

Regne:	Animalia
Fílum:	Arthropoda
Classe:	Insecta
Ordre:	Trichoptera
Subordre:	Annulipalpia
Superfamília:	Hydropsychoidea
Família:	Hydropsychidae
Subfamília:	Hydropsychinae
Gènere:	Hydropsyche
Espècie:	<i>Hydropsyche exocellata</i>

1.8.2. Ecologia de l'espècie

Durant l'etapa larvària, el gènere *Hydropsyche* viu a les aigües dolces dels rius, com la majoria de les larves de l'ordre *Trichoptera*. Construeixen els seus caus mitjançant restes de fragments vegetals i minerals, on en un extrem dels seus caus, preparen unes xarxes de seda fina, similar a la que construeixen les larves de l'ordre *Lepidoptera*, i que els hi serveix per a capturar algues, detritus i petits invertebrats. Depenent de l'aliment que les larves vulguin atrapar, les xarxes presenten diferents formes i mides de malla (Tachet *et al.*, 1992). Degut a aquesta tècnica, el gènere *Hydropsyche* necessita viure sota la influència de les corrents d'aigua per a que les xarxes atrapin el seu aliment. És també una espècie clau en els ecosistemes fluvials, ja que s'alimenta, com ja s'ha esmentat prèviament, d'algues (productors primaris que formen part del fitoplàncton), detritus i d'altres invertebrats més petits (que formen part del zooplàncton) i els seus depredadors són altres invertebrats i peixos (Vieira, 1999).

1.8.3. Estudis previs amb *H. exocellata*

H. exocellata té un cicle vital variable amb dues generacions per any (Bonada, 2003) i per tant, els individus de l'últim estadi es poden observar al llarg de tot l'any. Les larves s'han considerat com un grup apropiat per avaluar la qualitat de les aigües (Resh, 1992), i biomonitoritzar la contaminació dels agents metàl·lics presents a les aigües per la seva habilitat de bioacumular metalls (Cain & Luoma,

1998; Cain *et al.*, 2004; David 2003; Evans *et al.*, 2002). A més, les larves s'alimenten de les algues i detritus, per la qual cosa actuen com a organismes clau, transferint l'energia dels productors primaris als grups d'invertebrats i vertebrats depredadors (Resh, 1992). Així, els nivells de contaminants i els seus efectes toxicològics en aquests organismes són probablement transferits a través de la xarxa tròfica dels rius en termes de contaminació i transferència d'aliment a altres nivells tròfics, respectivament (Baird & Burton, 2001).

Per aquests motius hem escollit *H. exocellata* com a organisme model. Com a exemple concret en l'ús d'aquesta espècie, es va realitzar un estudi per avaluar els efectes subletals de l'elevada salinitat del medi (Sala *et al.*, 2015). En l'estudi sobre salinitat amb *H. exocellata* es demostrava que hi ha poblacions més tolerants que d'altres a la contaminació en base al seu historial d'exposició a la salinitat (és a dir, les que provenien de rius més contaminats eren més resistents a la contaminació; Sala *et al.*, 2015). Per tant, ens trobem davant d'una espècie idònia per a estudis de resistència a la toxicitat d'agents contaminants en el laboratori, que ens pot ser molt útil alhora de valorar els efectes subletals de les ENPs.

1.8.4. *Estudis previs amb nTiO₂*

La nano-partícula en qüestió que ha estat escollida per elaborar aquest treball és el nTiO₂; donat que ja ha estat utilitzada per a avaluar els efectes que poden provocar en altre espècie d'invertebrat aquàtic, *Daphnia magna*, dels quals se sap que li provoca efectes letals i subletals per d'altres estudis realitzats anteriorment (Zhu *et al.*, 2010; Hund-Rinke & Simon, 2006; Lovern *et al.*, 2007; Lovern & Klaper, 2006; Adams *et al.*, 2006; Rosenkranz *et al.*, 2007). Però altres estudis mostren com el nTiO₂ provoca efectes també en els peixos, com en el cas de l'espècie *Danio rerio* (conegut com a "zebra fish"), un organisme model utilitzat per la comunitat científica; donat que el seu genoma es troba totalment seqüenciat, les seves fases de desenvolupament embrionari són ràpides i fàcilment observables (Dahm, 2006) i ha estat utilitzat per avaluar els efectes eco-toxicològics d'agents contaminants. Concretament, el nTiO₂ en *D. rerio* produeix efectes d'estrès oxidatiu, que sota l'exposició a la radiació solar, augmenta el nombre d'espècies químiques reactives de l'oxigen (ROS); inclús quan les concentracions de nTiO₂ són baixes (Faria *et al.*, 2013). Això indica que no només el nTiO₂ pot provocar un efecte toxicològic a la fauna aquàtica per la seva propietat d'interactuar amb les molècules biològiques, sinó que també, sota condicions d'elevada radiació solar,

pot provocar un efecte fototòxic (Faria *et al.*, 2013) i augmentar la seva capacitat de reacció amb l'oxigen, produint ROS, i en definitiva, augmentar l'efecte tòxic per a la fauna aquàtica.

D'altra banda, el nTiO₂ forma agregacions amb les espècies planctòniques (d'algues i cladòcers) dificultant així el seu creixement i la seva reproducció a concentracions superiors als 10 mg/l (Campos *et al.*, 2013). Això provoca un efecte directe en la quantitat d'aliment disponible per a les espècies de nivells superiors de la xarxa tròfica (Campos, *et al.*, 2013). El que implica, que és important tenir en consideració els paràmetres de concentració de nTiO₂ i els nivells tròfics alhora d'avaluar els efectes de nTiO₂, perquè hi ha una relació directa entre la formació d'aquests agregats i la taxa d'esgotament d'aliment (Campos *et al.*, 2013).

Per últim, s'ha escollit el nTiO₂ perquè és relativament fàcil de produir mitjançant diverses tècniques instrumentals en un laboratori dedicat a la síntesi de nano-materials i les quantitats necessàries per avaluar els efectes sobre *H. exocellata* són de l'ordre de pocs mil·ligrams. Amb tot això es fa rellevància en la utilització d'aquesta nano-partícula com a model per avaluar els seus efectes en un laboratori.

2. HIPÒTESI I OBJECTIU DEL TREBALL

El present treball té per objectiu principal avaluar la toxicitat de les nano-partícules per als invertebrats aquàtics i observar els seus efectes letals i subletals utilitzant l'espècie *Hydropsyche exocellata* (O. Trichoptera).

Els efectes subletals que es van analitzar durant l'estudi van ser: la mesura de la freqüència de les contraccions abdominals (moviment), anomalies en la construcció de les seves xarxes i l'ús de biomarcadors. Altrament, també es va analitzar la mortalitat per comparar amb altres estudis de toxicitat de nano-partícules.

Hipòtesi: La nostra hipòtesi de partida és que el nTiO₂ provocarà un efecte tòxic sobre les larves de *H. exocellata*, i que aquest efecte serà depenent de la concentració de nTiO₂ a l'aigua. Durant el procediment experimental esperem observar efectes subletals tals com l'augment en la freqüència de les contraccions abdominals, l'augment en la irregularitat en la construcció de les seves xarxes i l'augment en els nivells de biomarcadors subjectes a un estrès oxidatiu. Al incrementar tant la concentració com el temps d'exposició al nTiO₂ podríem provocar efectes letals en els individus.

3. MATERIAL I METODOLOGIA

3.1. Recollida de les mostres

Les mostres de *Hydropsyche exocellata* van ser recollides a l'espai fluvial de l'illa de Gallifa. Aquesta illa fluvial que forma el riu Ter al seu pas pel terme municipal de les Masies de Voltregà forma un espai adequat per al desenvolupament d'una diversitat d'ambients (prats inundables, aiguamolls, platges de sorra i còdols, etc.) i d'espècies pròpies dels rius mediterranis. Entre els quals hi destaquen espècies d'aus aquàtiques, micro-mamífers, peixos i invertebrats aquàtics i terrestres.

Per capturar els *Hydropsyche* es va procedir a l'aixecament de còdols del riu. Aquesta espècie viu sota els còdols i en zones concretes amb una corrent suficient com per a que els individus puguin atrapar el seu aliment (algues, detritus i petits invertebrats) amb la construcció de les seves xarxes. Amb l'ajuda d'unes pinces s'agafaven els individus dels còdols i es col·locaven en safates per seleccionar-los segons la seva mida; preferiblement es seleccionaven les larves en 4^a (i última) fase de desenvolupament ja que són menys susceptibles a la contaminació, més resistents al trasllat i a les condicions del laboratori. Aquells individus que no eren seleccionats (ja sigui perquè no arribaven a la fase 4 o perquè no eren realment l'espècie desitjada) eren retornats al riu. Una vegada que eren seleccionats es procedia a introduir els *Hydropsyche* en ampolles de 5 litres de capacitat amb l'aigua del riu, així les condicions de l'aigua eren les mateixes que les de l'hàbitat on vivien. A més era necessari recollir més de 24 litres d'aigua de riu per omplir posteriorment els aquaris (cal recordar que la capacitat de cada aquari és d'uns 4 litres i que es necessitava omplir 6 aquaris diferents).

Al laboratori, primerament es van omplir tots els aquaris amb els 4 litres d'aigua de riu (amb l'ajuda del material volumètric) i després es van col·locar els 10 individus a cadascun, així cada tractament comptava com a mínim de 10 rèpliques. Per a que els *Hydropsyche* s'adaptessin a les condicions del laboratori es van deixar reposar una setmana sense l'adició de les nano-partícules. Al llarg dels experiments també era necessari reomplir els aquaris amb les algues que recobreixen els còdols dels rius, per tal de subministrar l'aliment que requereixen els *Hydropsyche*. Per a fer això es procedia a un rascat (amb l'ajuda d'unes pinces) de la superfície dels còdols per extreure les algues, tot abocant-les a la zona de la bomba hidràulica dels aquaris per a que després de passar-hi quedessin repartides de forma homogènia per tota la seva superfície.

3.2. Síntesi i caracterització del nTiO₂

La síntesi i la caracterització del nTiO₂ no la vam efectuar nosaltres, sinó que les van fer investigadors de la Universitat Autònoma de Barcelona que van seguir el següent procés experimental per sintetitzar-les i caracteritzar-les:

3.2.1. Síntesi de nTiO₂

Les nano-partícules de TiO₂ van ser sintetitzades seguint la metodologia *sol-gel hydrothermal method*. Aquesta metodologia permet obtenir nano-partícules altament poroses. Per a la seva síntesi es necessari els reactius que es detallen a continuació:

- Titanium (IV) butoxide (97%)
- 1-butanol (99,9%)
- Pluronic P123
- Nitric Acid (69%)

Els passos seguits per a la seva obtenció van ser els que es detallen a continuació, seguint la metodologia descrita per Pol *et al.* (2016):

Els 7 ml de Titanium (IV) butoxide es van dissoldre en 40 ml de 1-butanol. Aquesta barreja es va afegir gota a gota sobre 60 ml d'aigua destil·lada a pH=2 (prèviament ajustat amb l'àcid nítric). La dissolució resultant es va mantenir en agitació durant unes 20 h a temperatura ambient. A la suspensió obtinguda es va realitzar un *hydrothermal treatment* en un recipient de plàstic a una temperatura de 80°C durant 2 h. Després, es van dissoldre 2,5 g de Pluronic P123 *triblock copolymer* en 40 ml d'aigua destil·lada i la dissolució resultant es va afegir gota a gota sobre la dissolució de Titanium (IV) butoxide, la qual va ser prèviament refredada a 45°C. Després la barreja es va agitar a aquesta temperatura durant 2 h i seguidament es va realitzar un segon *hydrothermal treatment* en el recipient de plàstic a 80°C durant 20 h. La pols resultant es va recuperar per evaporació a 60°C. Finalment, el producte (nTiO₂) es va obtenir per calcificació en un forn a 450°C durant 4 h, procés en el qual es va eliminar el P123.

3.2.2. Caracterització del $n\text{TiO}_2$ obtingut

Les nano-partícules de TiO_2 obtingudes van ser caracteritzades primer per HRTEM (Microscopia electrònica de transmissió d'elevada resolució, Jeol-JEM 2011, a 200 kV i amb el detector EDX) amb l'objectiu de veure la seva morfologia i poder determinar la distribució de mida obtinguda en la seva síntesis. Les imatges que es mostren a continuació (**Fig. 5**) són les obtingudes amb TEM a diferents resolucions.

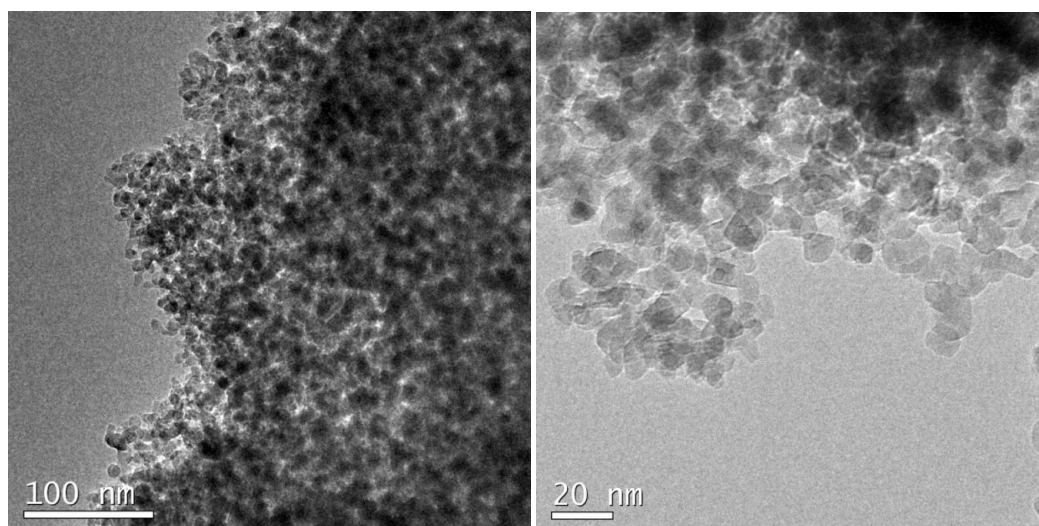
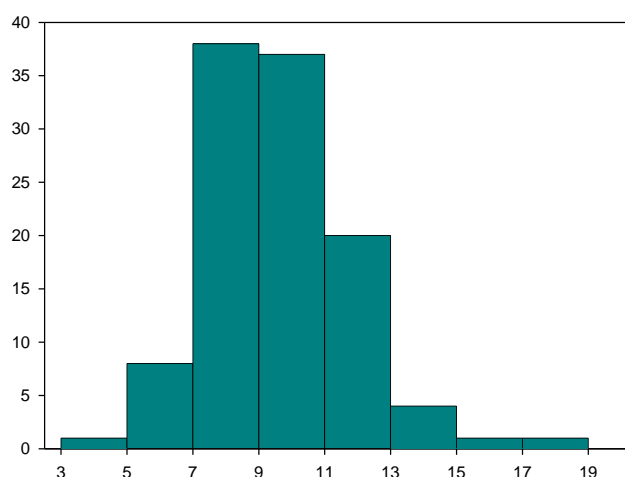


Fig. 5: Imatges obtingudes de les nano-partícules de TiO_2 per TEM. En la imatge es pot observar com les nano-partícules són bastant homogènies i que a priori presenten una mida semblant.

La distribució de mides obtingudes és la que es representa a continuació (**Fig. 6**). Per a obtenir la distribució es va realitzar el comptatge d'aproximadament 115 nano-partícules de TiO_2 . El conjunt de nano-partícules es troba entre els 5 i els 19 nm de diàmetre de partícula. La mitjana de diàmetre és d'un $9,80 \pm 2$ nm (la mediana es troba en 9,37 nm).

Fig. 6: Gràfic que mostra la distribució en la mida del diàmetre de les nano-partícules de TiO_2 . A l'eix X es mostra la distribució de la mida del diàmetre de nano-partícula en nm. A l'eix Y es mostra el nombre de nano-partícules amb el mateix diàmetre.



3.3. Disseny experimental i funcionament dels aquaris.

L'experiment es va dividir en un total de 6 tractaments diferents, seguint la metodologia de l'estudi anterior de Zhu *et al.*, (2010) (en el que s'utilitzen 7 concentracions diferents de nTiO₂: 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 50 i 100 mg/l més un grup control), però es va decidir prescindir de la concentració mínima de 0,1 mg/l de nTiO₂ utilitzada per l'anterior estudi (Zhu *et al.*, 2010) i de la concentració més elevada de 100 mg/l perquè aquesta provocava una mortalitat del 100% dels individus de *D. magna* en 72 hores d'exposició (una mortalitat que no seria útil alhora de determinar els possibles efectes subletals del nTiO₂ sobre la població de *H. exocellata*). Per tant, aquestes dues concentracions, situades a dos extrems, no es van acabar utilitzant. A més, només es disposava d'un total de 7 aquaris amb bombes hidràuliques en correcte funcionament. Finalment, i amb tot l'exposat anteriorment es va decidir utilitzar unes concentracions definitives de nTiO₂ de 0,5; 1; 5; 10 i 50 mg/l més 1 grup control al llarg d'unes 3 setmanes.

Cada aquari (**Fig. 7**) constava d'un volum d'uns 4 litres de capacitat d'aigua de riu amb una concentració concreta de nTiO₂ dissolta en l'aigua. Altrament, a cada aquari s'hi dipositaven un total de 10 individus de l'espècie *H. exocellata*. L'objectiu dels aquaris va ser el de generar un microcosmos que sigui equiparable a l'hàbitat i a les condicions de corrents dels rius on el gènere *Hydropsyche* acostuma a viure. Per a fer això es van dissenyar els aquaris de tal manera que, aproximadament $\frac{3}{4}$ parts de la seva superfície eren recoberts per un substrat sorrenc (**Fig. 7B**; que es mantenia enganxat a la superfície de l'aquari gràcies a cola industrial, que a la vegada es trobava sobre una làmina de material impermeable). El material sorrenc dels aquaris permetia als individus d'aquesta espècie construir els seus caus. Aquesta superfície dels aquaris es trobava totalment tancada gràcies a una xarxa de material plàstic (**Fig. 7E**) que evitava que els *Hydropsyche* marxessin i pogués entrar a la zona de la bomba hidràulica (**Fig. 7C**). Sobre el substrat sorrenc, a més es van col·locar bastons de fusta d'1 cm de llargària (**Fig. 7D**) que els hi servia per a construir les seves xarxes i atrapar l'aliment gràcies a la corrent generada per les bombes hidràuliques (**Fig. 7A**) dels aquaris per on circula l'aigua. Les bombes hidràuliques funcionaven gràcies al subministrament elèctric i l'aigua circulava a partir de tubs de material plàstic que era transportada des d'un extrem de l'aquari fins a l'altre, on els tubs quedaven foradats i l'aigua sortia a l'exterior (**Fig. 7F**) a una baixa pressió i velocitat, generant una làmina d'aigua amb una certa corrent que travessava tota la superfície sorrenca, fins que precipitava a la zona de la bomba hidràulica on tornava a ser reconduïda. A més, els aquaris es mantenien dintre d'una càmera on es controlava la temperatura per a que fos òptima per als individus de l'espècie *H. exocellata* i en condicions de foscor.

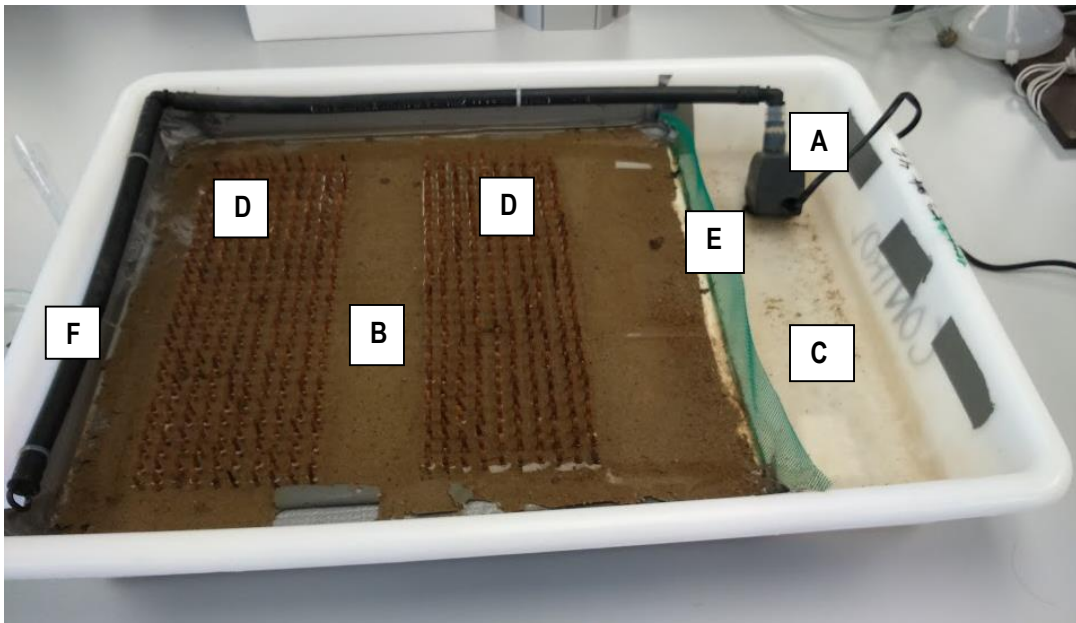


Fig. 7: Fotografia feta al laboratori d'un dels aquaris. A la fotografia s'hi destaquen diverses parts dels aquaris: (A) bomba hidràulica; (B) superfície de sorra; (C) zona de la bomba hidràulica; (D) bastons; (E) xarxa de material plàstic; (F) zona de sortida de l'aigua. Font: Elaboració pròpia.

3.4. Preparació de la solució de nTiO₂ i dels tractaments.

Cada tractament constava d'una concentració de nTiO₂ determinada, per la qual cosa es va preparar una solució inicial de nTiO₂ i aigua destil·lada que va ser utilitzada per agafar diferents volums de la solució. La concentració d'aquesta solució va ser de 700 mg/l de nTiO₂ donat que la quantitat necessària destinada per a tots els tractaments era de 666 mg tal i com s'indica en la taula següent (**Taula 3**):

Taula 3: Taula on s'indica el volum necessari de la solució de 700 mg/l de nTiO₂ per a preparar cada tractament. S'ha de destacar que la quantitat necessària en grams de nTiO₂ era en realitat la concentració final multiplicada per 4, ja que la capacitat dels aquaris era d'uns 4 litres i el nTiO₂ s'havia de dissoldre tenint la mateixa concentració que la concentració final. Font: Elaboració pròpia.

Tractament	Concentració final (mg/l)	Quantitat necessària (g)	Volum necessari (ml)
Control	0	0	0
2	0,5	2	2,86
3	1	4	5,71
4	5	20	28,57
5	10	40	57,14
6	50	200	286,00
Total	-	666	380,21

Per preparar la solució va ser necessari pesar els 700 mg de nTiO₂ amb l'ajuda d'una balança analítica per després abocar els grams mesurats en un matràs aforat i enrassat amb 1 litre d'aigua destil·lada. Seguidament la solució va ser dissolta amb un agitador magnètic per finalment agafar amb l'ajuda de buretes de diferents capacitats, el volum necessari per a cada tractament. El volum de la solució primerament va ser abocat en un vas de precipitats i després a la part dels aquaris on es situava la bomba hidràulica, d'aquesta manera ens asseguràvem que el nTiO₂ quedava homogèniament repartit per la superfície de l'aquari després de passar per la bomba hidràulica.

3.5. Test de moviment.

El test de moviment consistia en comptabilitzar el nombre de contraccions abdominals (estrès) dels individus de *H. exocellata* una vegada sotmesos als diferents tractaments de nTiO₂. El test es feia dos cops per setmana de tal manera que es podia enregistrar una certa evolució en els tractaments segons el temps d'exposició al nTiO₂. De cada tractament es van mesurar les contraccions abdominals de 4 individus escollits a l'atzar. El test consistia en col·locar els individus sobre plaques de petri amb l'aigua del tractament al que pertanyien i es comptabilitzava el nombre de contraccions abdominals durant uns 10 segons (amb l'ajuda d'un cronòmetre).

3.6. Test de construcció de les xarxes.

Les xarxes que els individus de *H. exocellata* van construir van ser fotografiades abans i després de l'aplicació dels tractaments de nano-partícules, així va ser possible la comparació de la irregularitat de les seves xarxes entre un medi sense l'agent contaminant i un altre que després esdevé tòxic. Per tractar les fotografies de cada xarxa, les imatges van ser retallades (eliminant el soroll de fons) per al posterior càlcul de la seva irregularitat (relacionada amb els valors d'entropia de les xarxes). A l'hora de calcular el grau de desordre de les xarxes es va utilitzar el programa informàtic Matlab, que gràcies a un algoritme proporcionat per Sala *et al.* (2015) es podia obtenir el valor de l'entropia de cada xarxa analitzada.

La regularitat de les xarxes es va analitzar utilitzant el nombre de coeficients necessaris per representar el 90% de l'energia total. Una imatge que presenta molta regularitat és representada per pocs coeficients (amb molta energia cadascun; Sala *et al.*, 2015) mentre que si és més irregular necessitarà de més coeficients (amb menys energia cadascun; Sala *et al.*, 2015). Es tracta d'una base de senyals, com més regularitat té la imatge menys

senyals seran necessaris, però hi haurà una major repetició d'aquestes (Sala *et al.*, 2015). Del punt anterior es dedueix que si totes les transformacions tenen la mateixa energia total, la suma dels coeficients és la mateixa, ja que es normalitza (Sala *et al.*, 2015). Si es comprova quants coeficients representen el 90% de l'energia total, en el cas de les imatges més regulars, aquest nombre serà menor. Així doncs, aquest és el criteri per comparar la regularitat de les xarxes.

3.7. Test de mortalitat.

El test de mortalitat consistia en comptabilitzar el nombre d'individus morts a un cert temps d'exposició al nTiO₂, d'aquesta manera i igual que en el cas del test de moviment, es podia observar l'evolució de la mortalitat al llarg del temps d'exposició. El test de mortalitat també es feia dos cops per setmana. De cada tractament es comptabilitzaven els individus vius i els individus morts i s'expressava la mortalitat en %. El càlcul de la mortalitat queda expressada en la següent fórmula:

$$\text{Mortalitat} = [(\text{Nombre d'individus vius} - \text{Nombre d'individus morts}) / \text{Nombre d'individus vius}] \times 100$$

Amb la primera població de *Hydropsyche exocellata* es va poder realitzar el test de moviment que va durar unes 2 setmanes, malgrat que les dades de l'últim dia (dia 5) no es van anotar per causa de l'elevada mortalitat en tots els tractaments. La causa d'aquesta mortalitat va ser deguda per l'elevada pèrdua d'aigua dels aquaris (per fuites d'aigua) i el trencament d'1 bomba hidràulica. Les safates on es va detectar les fuites d'aigua van ser substituïdes per d'altres en millor estat. Com que el test de construcció de les xarxes i l'anàlisi dels biomarcadors no es van poder realitzar amb aquesta primera població va ser necessari tornar a recollir mostres a l'illa fluvial de Gallifa per continuar l'experiment amb l'anàlisi dels biomarcadors i les fotografies de les xarxes.

Aquesta segona població de larves també es trobaven en la 4^a fase de desenvolupament (inclús havien individus formant la crisàlide) i va servir per allargar la durada de l'experiment 1 setmana més per al posterior anàlisi dels biomarcadors i les fotografies de les xarxes. Aquest segon experiment va seguir el mateix disseny experimental explicat prèviament a la metodologia. En el cas de l'anàlisi dels biomarcadors i el test de construcció de les xarxes cal destacar que sempre és millor una exposició de temps reduït a l'agent contaminant que una exposició massa llarga, donat que el que es pretenia era provocar un estrès als individus i no pas una certa mortalitat.

3.8. Biomarcadors.

Per tal d'avaluar els efectes subletals a nivell cel·lular que provoca el nTiO₂ sobre la població de *Hydropsyche exocellata* es van utilitzar un total de 5 biomarcadors diferents que analitzen l'estrès oxidatiu subjecte de la contaminació ambiental que provoquen la majoria d'agents contaminants. Els 5 biomarcadors que es van analitzar són: la peroxidació dels lípids (LPO; Esterbauer *et al.*, 1991; **Taula 4**), la catalasa (CAT; Aebi., 1974; Beutler, 1975; **Taula 4**), la superòxid dismutasa (SOD; McCord & Fridovich, 1969; **Taula 4**), el lactat deshidrogenasa (LDH; **Taula 4**) i la glutatona-S-transferasa (GST; Habig & Jakoby, 1981; **Taula 4**). Els protocols dels 5 biomarcadors assajats (així com els seus procediments experimentals realitzats per a aquest experiment en concret), es troben detalladament explicats en l'annex d'aquest treball. Abans de procedir amb l'anàlisi dels 5 biomarcadors, les mostres de cada tractament van ser homogeneïtzades en "pools" de 2 individus (formant 6 replicats per cada tractament) amb *homogenization buffer* (Phosphate buffer 100 mM; pH=7,4; 4°C; 150 ml KCl i 1 mM EDTA). Tots els replicats dels teixits homogeneïtzats van ser al·lotats (10 µl per a la quantificació de proteïna, 100 µl per a LPO, 20 µl per a CAT, 50 µl per a LDH+GST i 20 µl per a SOD) i emmagatzemats a -80°C per als posteriors assaigs. La quantificació de proteïnes es va realitzar prèviament a l'anàlisi dels 5 biomarcadors mitjançant el mètode de Bradford (1976); per tal de saber exactament la quantitat de proteïna present en els posteriors assaigs i la quantitat de *homogenization buffer* necessari per diluir les mostres a 0,5 mg de proteïna/ml (concentració òptima per als assaigs de CAT, GST i LDH) i a 0,1 mg de proteïna/ml per a la concentració òptima de l'assaig de la SOD.

Taula 4: Inventari i descripció del mecanisme d'acció dels biomarcadors analitzats. Font: Elaboració pròpia.

Biomarcador	Descripció general
Peroxidació de lípids (LPO)	Indica dany oxidatiu a nivell cel·lular (estrès oxidatiu) degut a la producció en excés de les ROS.
Catalasa (CAT)	Enzim antioxidant que catalitza el H ₂ O ₂ en H ₂ O i O ₂ .
Superòxid dismutasa (SOD)	Enzim antioxidant que catalitza la dismutació del ió superòxid (O ₂ ⁻) en H ₂ O ₂ i O ₂ .
Lactat deshidrogenasa (LDH)	Indica toxicitat en general.
Glutatona-S-transferasa (GST)	Participa en la fase II del metabolisme de desintoxicació; s'uneix als metabòlits resultants de la fase I, fent-los més hidrofílics per ajudar-los a excretar de les cèl·lules.

El malondialdehid (MDA) és un producte natural generat per la peroxidació dels lípids. Per aquest motiu, la peroxidació lipídica es va calcular en MDA equivalent (nmol/g teixit) i els resultats obtinguts del corresponent assaig es van tractar amb Rstudio.

La catalasa (CAT) és un enzim antioxidant present als peroxisomes de les cèl·lules amb capacitat per trencar la molècula d'aigua oxigenada (H_2O_2) en aigua (H_2O) i oxigen (O_2). En aquest assaig es va quantificar l'activitat d'aquest enzim mitjançant el consum de H_2O_2 a 240 nm al llarg d'1 minut de reacció i amb la quantitat de proteïna present durant l'experiment. Els resultats obtinguts d'aquesta quantificació es van calcular utilitzant el coeficient d'extinció molar de la CAT ($40 M^{-1} cm^{-1}$) i les dades obtingudes van ser tractades també amb Rstudio. La superòxid dismutasa és també un enzim amb activitat antioxidant que és capaç de reduir l'ió superòxid (O_2^-) en O_2 i H_2O_2 la qual és subseqüentment catalitzada per l'enzim catalasa (CAT). L'activitat de la SOD va ser determinada en aquest assaig calculant el grau d'inhibició de la reducció del citocrom c per l' O_2^- a una absorptància de 550 nm juntament amb la concentració de proteïna present durant l'assaig. Els resultats d'aquesta quantificació es van mesurar en U/mg de proteïna i les dades obtingudes es van tractar amb Rstudio (com en els casos anteriors). Cal dir que l'assaig de la SOD no la vam fer nosaltres, sinó que la van realitzar investigadors del departament de química ambiental del CSIC.

El lactat deshidrogenasa (LDH) és un enzim que és capaç de reduir la molècula de piruvat i transformar-la en lactat utilitzant el coenzim NADH que s'oxida donant com a resultat NAD^+ . L'activitat de la LDH va ser mesurada en nmol/min/mg de proteïna, donat que durant l'assaig es va mesurar el consum del coenzim NADH a una absorptància de 340nm durant 5 minuts de reacció, per després calcular l'activitat de la LDH pel seu factor d'extinció molar ($6,3 mM^{-1} cm^{-1}$) i la concentració de proteïna present durant l'assaig. Els resultats obtinguts d'aquesta quantificació es van tractar amb el programa estadístic Rstudio com en els anteriors casos.

La glutatona-S-transferasa (GST) és un enzim que participa en el procés de biotransformació II, capaç conjuguar molècules amb càrrega polar amb els productes de la biotransformació I, fent-los molt més hidrofílics per facilitar la seva excreció de les cèl·lules. En aquest cas, l'activitat de la GST va ser mesurada en nmol/min/mg proteïna, ja que durant el procediment experimental es va mesurar la formació de la GST conjugada amb 1-clor-2,4-dinitrobenzè (CDNB) a una absorptància de 340 nm al llarg de 5 minuts de reacció. L'activitat de la GST va ser determinada calculant amb el seu valor d'extinció molar ($9,6 mM^{-1} cm^{-1}$) i la concentració de proteïna present durant l'assaig (com en el cas de la LDH). Els resultats obtinguts d'aquest assaig també es van tractar amb el programa estadístic Rstudio.

3.9. Tractament de les dades i anàlisi estadístic

Les dades dels diferents experiments realitzats van ser analitzades amb el programa estadístic Rstudio. Principalment, l'anàlisi de les dades es va fer comparant els valors de les mitjanes entre els diversos tractaments de nTiO₂, que en el cas del test de moviment es va fer utilitzant el test de Tukey (amb un interval de confiança del 95%). També, alhora de comparar la interacció entre el temps i el nombre de contraccions abdominals es va realitzar un Two-Way ANOVA (amb un 95% d'interval de confiança) per tal de comprovar si existeix algun efecte del temps d'exposició del nTiO₂ en el nombre de contraccions abdominals sobre la població de *H. exocellata*.

La resta de dades (del test de construcció de les xarxes i de l'anàlisi dels biomarcadors) es van comparar realitzant diversos test-T (amb un interval de confiança del 95%) donat la robustesa d'aquest test amb una quantitat petita de dades. Els test-T es van fer comparant entre el grup control i la resta de tractaments de nTiO₂ com també entre els diferents tractaments. En el cas del test de construcció de les xarxes també es van comparar les mitjanes de tots els tractaments nTiO₂ entre la primera i la última fase de l'experiment.

Abans de fer les diverses comparacions de mitjanes es van comprovar la normalitat de les dades, donat que el test de Tukey, el Two-Way ANOVA i el test-T segueixen els supòsits de l'estadística paramètrica, que assumeixen la distribució normal de les dades. Per comprovar la normalitat de les dades es van realitzar tests de Shapiro-Wilk (amb un interval de confiança del 95%) i quan les dades d'una variable no seguien una distribució normal es transformaven aplicant l'arrel quadrada d'aquesta. Les dades de les variables que no seguien una distribució normal i que van ser seguidament transformades eren: "nombre de contraccions abdominals" (p-valor=6,842x10⁻⁵), "entropia" (p-valor=9,634x10⁻¹⁰) i "SOD" (p-valor=0,019). Els resultats de la resta dels test es mostren en l'apartat 4 d'aquest treball.

4. RESULTATS

4.1. Test de moviment

Es van fer un total de 96 observacions de 3 variables diferents (dia, tractament i nombre de contraccions abdominals). El resultat del test de Tukey indica que hi ha un efecte de la concentració del nTiO₂ sobre la població de *H. exocellata*, ja que existeixen diferències significatives entre els tractaments de 50 mg/l i el control (p-valor=0,0090); 50 mg/l i 0,5 mg/l (p-valor=0,0004) i 50 mg/l i 5 mg/l (p-valor=0,0172).

El test de Tukey no va ser significatiu per cap altre dels tractaments existents, malgrat que es dóna per suposat que el tractament amb la concentració de nTiO₂ més elevada (50 mg/l) provoca un efecte (estrès) sobre la població de *H. exocellata* quan es compara amb les concentracions inferiors a 1 mg/l i el control. Alhora de comparar a nivell de mitjanes entre tots els tractaments, els individus sota unes condicions de més concentració de nanopartícules presenten una mitjana en el nombre de contraccions abdominals superior al del tractament control; concretament la mitjana és de 12,88 i 5,19 contraccions abdominals en el tractament de 50 mg/l i control respectivament. Així, tal i com s'observa en el següent *boxplot* (**Fig. 8**), el nombre de contraccions abdominals augmenta considerablement a partir dels 10 mg/l de nTiO₂, el que indica que és a partir d'aquesta concentració de nTiO₂ que es provoca un estrès als individus de *H. exocellata*, però que no és prou significatiu fins a unes concentracions de 50 mg/l.

La comparació entre el nombre de contraccions abdominals i el temps d'exposició amb el Two-Way ANOVA també va resultar ser significatiu (p-valor=0,000614) el que implicaria que hi ha un efecte del temps d'exposició al nTiO₂ sobre la població de *H. exocellata* al cap de dues setmanes de tractaments; donat que la interacció entre el temps d'exposició i el nombre de contraccions abdominals va mostrar diferències significatives.

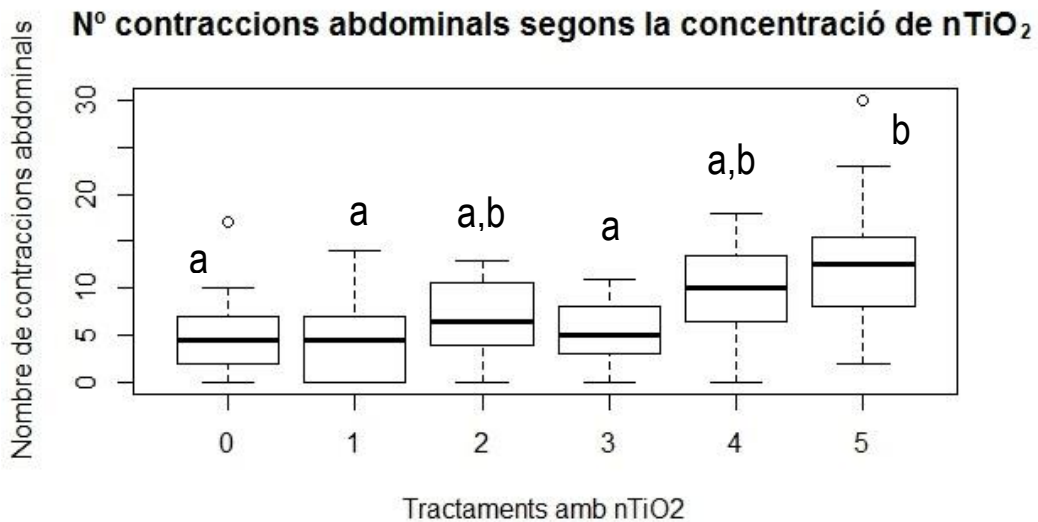


Fig. 8: Gràfic de caixes que mostra la distribució de les dades de les contraccions abdominals observades en els diferents tractaments de nTiO₂: 0=Control; 1=0,5 mg/l; 2=1,0 mg/l; 3=5,0 mg/l; 4=10,0 mg/l; 5=50,0 mg/l Font: Elaboració pròpia amb Rstudio.

4.2. Test de construcció de les xarxes

Del test de construcció de les xarxes es van fer un total de 45 observacions de 3 variables diferents (fase de l'experiment, tractament i entropia). S'ha de destacar que el nombre d'observacions va anar en funció del nombre de xarxes construïdes per la població de *H. exocellata*. En aquest cas no va ser interessant la quantificació del nombre de xarxes construïdes, sinó més aviat el caràcter qualitatiu de les xarxes (el seu desordre). El resultat de la comparació de mitjanes entre la primera i la última fase de l'experiment amb el test-T va resultar ser no significatiu (p-valor=0,1545), el que indica que no hi ha cap efecte del nTiO₂ sobre la irregularitat de les xarxes de la població de *H. exocellata* abans i després de l'experiment. També, en el cas de la comparació de mitjanes dels valors d'entropia entre els tractaments de nTiO₂ a la fase final de l'experiment, van resultar ser no significatius (p-valor=0,3412). Aquest últim resultat indica que la concentració de nTiO₂ tampoc provoca un efecte sobre la irregularitat de les xarxes en la població de *H. exocellata*.

4.3. Mortalitat

La mortalitat va ser calculada en base al percentatge d'individus morts després de 2 setmanes sota la influència del nTiO₂. Els resultats de la mortalitat són les dades que es mostren en la següent taula (**Taula 5**):

Taula 5: Taula del percentatge de mortalitat de cada tractament. Font: Elaboració pròpia.

Tractament nTiO ₂ (mg/l)	Individus vius fase inicial	Individus vius fase final	% Mortalitat
Control	9	7	22,22
0,5	6	4	33,33
1,0	10	7	30,00
5,0	7	6	14,29
10,0	7	5	28,57
50,0	9	4	55,56

Com es pot comprovar la mortalitat va ser elevada en tots els tractaments, incloent el grup control (22,22%; **Taula 5**), malgrat que la mortalitat més elevada es va registrar amb el tractament de 50 mg/l de nTiO₂ (55,56%; **Taula 5**).

4.4. Biomarcadors

Peroxidació de lípids (LPO)

De la peroxidació de lípids es van fer un total de 34 observacions amb 3 variables diferents (tractament, replicat i MDA equivalent). Els valors centrals de MDA equivalent per cada tractament de nTiO₂ es mostren a continuació en la següent taula (**Taula 6**). Si s'observen els valors de les mitjanes entre el tractament control ($5,39 \pm 1,11$ nmol MDA equiv./g teixit; **Taula 6**) i la mitjana del tractament amb més concentració de nTiO₂ ($8,80 \pm 0,74$ nmol MDA equiv./g teixit; **Taula 6**) es veu reflectit l'increment de la peroxidació lipídica en el gràfic (**Fig. 9**). D'altra banda, es van comparar les mitjanes de tots els tractaments amb el grup control amb diversos test-T; en concret, la comparació entre tractament amb més concentració de nTiO₂ i el control va mostrar diferències significatives (p -valor=0,016; **Taula 6**). Per tant, els resultats obtinguts indiquen que una concentració de 50 mg/l de nTiO₂ produeix un efecte sobre la peroxidació lipídica en els individus de *H. exocellata*. En cap cas, la comparació de mitjanes entre els altres tractaments va resultar ser significativa (p -valor>0,05). Malgrat els resultats obtinguts amb els test-T, es destaca un augment en la peroxidació lipídica a partir dels 5 mg/l de nTiO₂ (**Fig. 9**), encara que aquest efecte no sigui significatiu fins a unes concentracions 10 vegades superior de nTiO₂.

Taula 6: Taula que indica el grau de peroxidació lipídica en nmol MDA equivalent/g teixit segons la concentració de nTiO₂. Font: Elaboració pròpia.

Tractament nTiO ₂ (mg/l)	Mitjana MDA equiv. (nmol/g teixit)	Std	Error	T-student (p-valor)
Control	5,392	2,217	1,108	
0,5	5,030	2,599	1,162	0,416
1,0	5,409	3,170	1,585	0,497
5,0	6,916	0,857	0,383	0,098
10,0	7,305	1,622	0,662	0,075
50,0	8,798	1,645	0,736	0,016

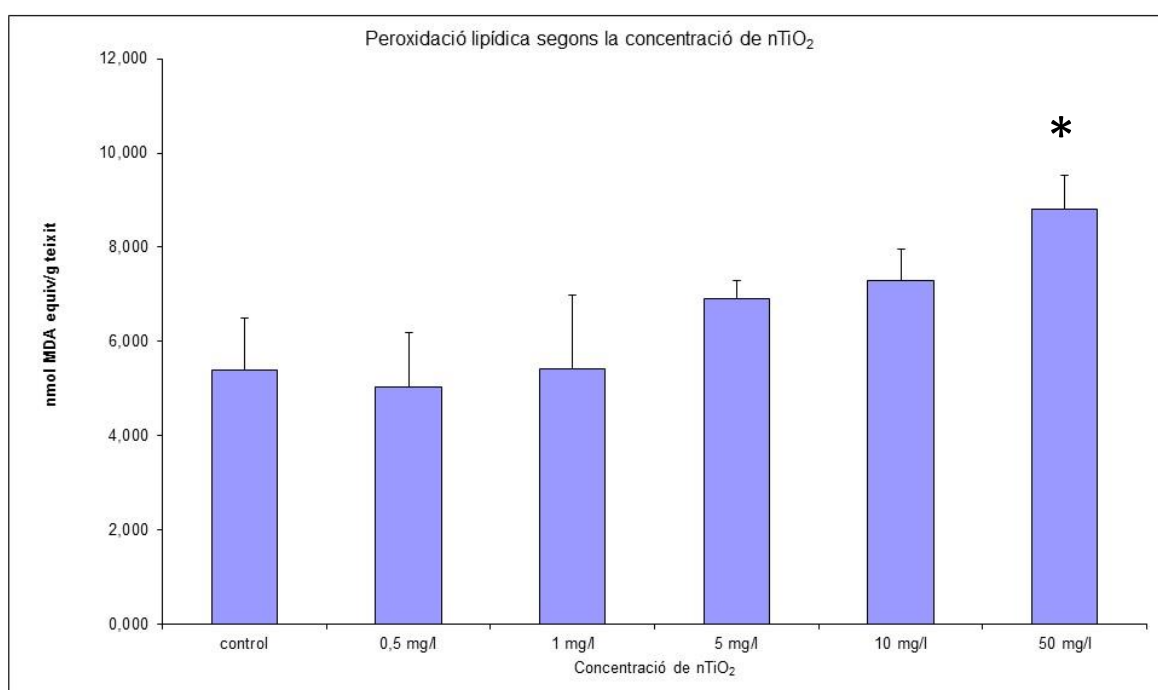


Fig. 9: Gràfic que mostra la quantitat de peroxidació lipídica en nmol MDA equivalent/g teixit segons la concentració de nTiO₂. Font: Elaboració pròpia

Catalasa (CAT)

En total es van fer 32 observacions de 3 variables diferents (tractament, replicat i CAT). Els valors de les mitjanes d'activitat de la CAT al llarg de tots els tractaments es mostren en la taula que hi ha a continuació (**Taula 7**) on s'hi destaca que la mitjana de l'activitat de la CAT és superior en el grup control ($459,05 \pm 45,65 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteïna; **Taula 7**) i en els tractaments amb menys concentració de nTiO₂ (0,5 i 1,0 mg/l; $429,78 \pm 19,37 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$

de proteïna i $416,57 \pm 21,61$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteïna respectivament; **Taula 7**). En canvi, la mitjana amb el mínim d'activitat de la CAT s'assoleix en el tractament de 10 mg/l de nTiO₂ ($340,56 \pm 48,67$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteïna; **Taula 7**), unes dades que indicarien que no hi hauria cap efecte del nTiO₂ sobre l'activitat de la CAT a la població de *H. exocellata* (**Fig. 10**). Cap comparació dels diversos test-T realitzats entre el grup control i els diferents tractaments de nTiO₂ van resultar ser significativa ($p\text{-valor} > 0,05$; **Taula 7**), com tampoc en altres comparacions entre els diferents tractaments. És a dir, els resultats dels diversos test-T indiquen que no existeix cap efecte del nTiO₂ sobre l'activitat de l'enzim CAT a la població de *H. exocellata*.

Taula 7: Taula que indica els nivells d'activitat de la CAT en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteïna segons la concentració de nTiO₂. Font: Elaboració pròpia.

Tractament nTiO ₂ (mg/l)	Mitjana activitat de la CAT ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteïna)	Std	Error	T-student (p-valor)
Control	459,049	102,080	45,651	
0,5	429,777	43,303	19,366	0,286
1,0	416,571	52,929	21,608	0,198
5,0	362,723	78,781	32,162	0,055
10,0	340,560	119,222	48,672	0,057
50,0	411,004	43,179	21,590	0,206

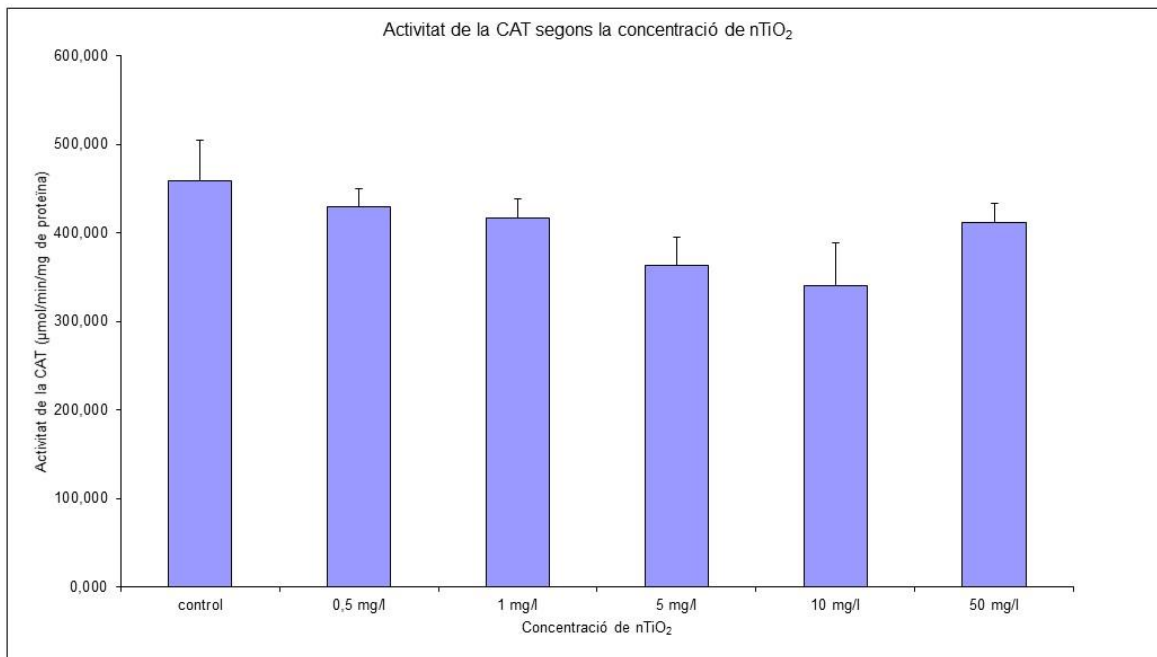


Fig. 10: Gràfica que mostra la mitjana d'activitat de la CAT en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteïna segons la concentració de nTiO₂. Font: Elaboració pròpia.

Superòxid dismutasa (SOD)

D'aquest assaig es van fer un total de 34 observacions de 3 variables diferents (tractament, replicat i SOD). Els resultats entre els diferents tractaments de nTiO₂ es mostren en la següent taula (**Taula 8**) on s'indiquen els valors de les mitjanes de cada tractament; en aquest cas, la mitjana més elevada es registra en el tractament de 1 mg/l nTiO₂ (6,37±1,71 U/mg de proteïna; **Taula 8**) que és inclús superior al de l'activitat de la SOD en el grup control (5,75±1,27 U/mg de proteïna; **Taula 8**) i que en el tractament amb més concentració de nTiO₂ (4,16±1,38 U/mg de proteïna; **Taula 8**). Al gràfic es mostren els diferents nivells que assoleix l'activitat de la SOD al llarg de les diferents concentracions de nTiO₂ (**Fig. 11**) on s'hi destaca la irregularitat de l'activitat d'aquest enzim entre els diferents tractaments. Alhora de comprovar els possibles efectes del nTiO₂ sobre l'activitat de la SOD, el test-T va mostrar diferències significatives entre el grup control i el tractament de 10 mg/l de nTiO₂ (p-valor=0,003; **Taula 8**), el que indica que hi ha un efecte sobre l'activitat de la SOD a una concentració de 10 mg/l de nTiO₂. Per altra banda, les comparacions entre el grup control i els altres tractaments van resultar ser no significatius (p-valor>0,05; **Taula 8**), així com altres comparacions realitzades.

Taula 8: Taula que indica el grau d'activitat de la SOD en U/mg de proteïna segons la concentració de nTiO₂. . Font: Elaboració pròpia.

Tractament nTiO ₂ (mg/l)	Mitjana activitat de la SOD (U/mg de proteïna)	Std	Error	T-student (p-valor)
Control	5,751	2,197	1,268	
0,5	4,838	0,927	0,464	0,240
1,0	6,373	2,967	1,713	0,392
5,0	4,793	4,044	2,022	0,365
10,0	1,841	0,418	0,187	0,003
50,0	4,155	2,751	1,376	0,215

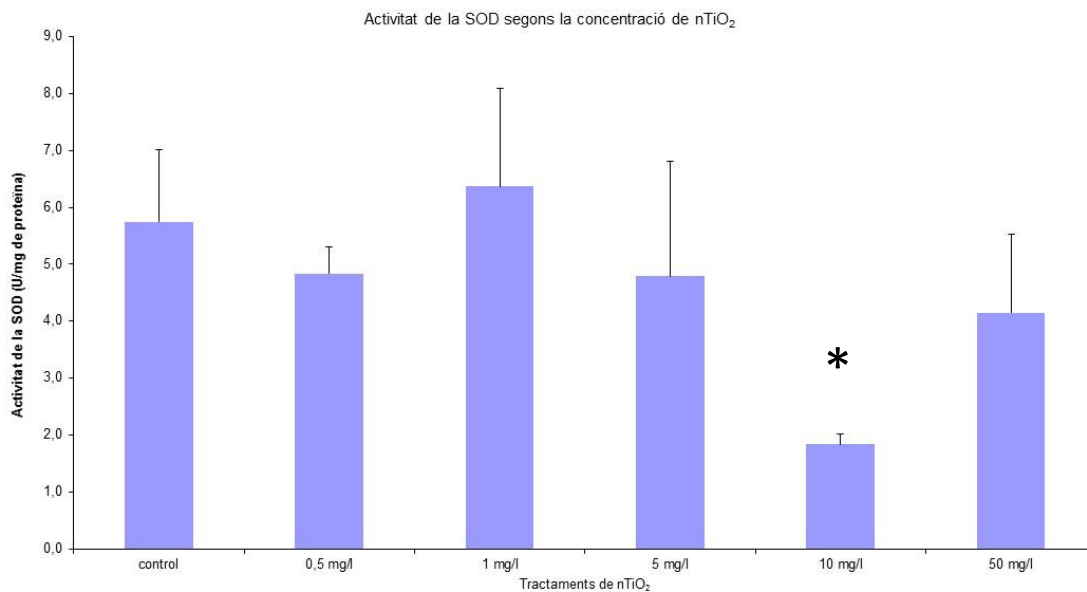


Fig. 11: Gràfic que mostra els nivells d'activitat de la SOD en U/mg de proteïna segons la concentració de nTiO₂. Font: Elaboració pròpia.

Lactat deshidrogenasa (LDH)

De l'assaig de la LDH es van fer un total de 34 observacions de 3 variables diferents (tractament, replicat i LDH). Els valors centrals de l'activitat de la LDH en cadascun dels tractaments de nTiO₂ es mostren en la taula que hi ha a continuació (**Taula 9**). Com es pot observar a la taula, els valors de les mitjanes són molt irregulars al llarg dels diferents tractaments (**Fig. 12**), malgrat que s'hi destaca l'increment de l'activitat de la LDH entre el grup control ($145,34 \pm 24,45$ nmol/min/mg proteïna; **Taula 9**) i el tractament de 50 mg/l de nTiO₂ ($175,39 \pm 13,70$ nmol/min/mg proteïna; **Taula 9**). S'hi destaca també el baix nivell de l'activitat de la LDH en el tractament de 10 mg/l de nTiO₂ que disminueix fins a uns valors de $117,31 \pm 27,94$ nmol/min/mg proteïna (**Taula 9**). Els diversos test-T realitzats no van mostrar diferències significatives per la comparació de l'activitat de la LDH entre el grup control i la resta de tractaments de nTiO₂ (p -valor $> 0,05$; **Taula 9**), pel que segons els resultats obtinguts es pot afirmar que no hi ha cap efecte del nTiO₂ sobre l'activitat de la LDH a la població de *H. exocellata*. Altrament, cap de les altres comparacions entre les mitjanes dels tractaments va resultar ser significativa (p -valor $> 0,05$).

Taula 9: Taula que indica l'activitat de la LDH en nmol/min/mg de proteïna en els diferents tractaments de nTiO₂. . Font: Elaboració pròpia.

Tractament nTiO ₂ (mg/l)	Mitjana LDH (nmol/min/mg proteïna)	Std	Error	T-student (p-valor)
Control	145,340	54,672	24,450	
0,5	164,098	99,707	44,590	0,361
1,0	139,274	43,958	17,946	0,421
5,0	166,215	66,863	27,297	0,295
10,0	117,309	68,433	27,938	0,240
50,0	175,394	33,551	13,697	0,145

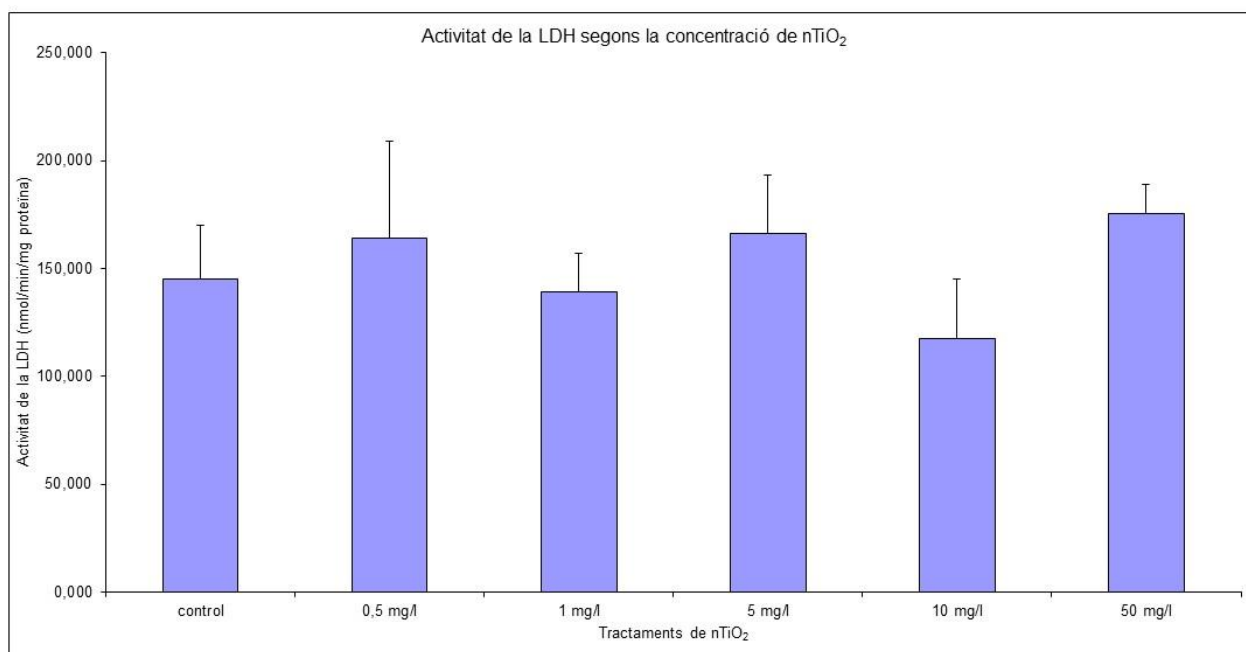


Figura 12: Gràfic que mostra l'activitat de la LDH en nmol/min/mg de proteïna segons la concentració de nTiO₂. Font: Elaboració pròpia.

Glutathione-S-transferasa (GST)

D'aquesta quantificació es van fer un total de 34 observacions de 3 variables diferents (tractament, replicat i GST). Els valors de les mitjanes d'activitat de la GST per cada tractament de nTiO₂ es mostren en la següent taula (**Taula 10**). En aquest cas, les mitjanes d'activitat de la GST es comporten d'una manera regular al llarg de les diferents concentracions de nTiO₂ (**Fig. 13**). La mitjana més elevada es dona amb una concentració de 5 mg/l de nTiO₂ (104,31±9,69 nmol/min/mg proteïna; **Taula 10**) i la mitjana més baixa d'activitat es dona en el grup control (85,01±12,21 nmol/min/mg proteïna **Taula 10**). Per

altra banda, en el tractament amb més concentració de nTiO₂ l'activitat de la GST és inferior (96,76±6,57 nmol/min/mg proteïna **Taula 10**) a la del tractament de 5 mg/l de nTiO₂, fet que no indica cap efecte de l'increment de la concentració de nTiO₂ sobre la població de *H. exocellata*. Malgrat els resultats, es van comparar els valors de les mitjanes al llarg dels diferents tractaments amb diversos test-T. Cap de les comparacions realitzades amb els diversos test-T entre el grup control i la resta dels tractaments van resultar ser significatius (p-valor>0,05; **Taula 10**), així com la resta de comparacions entre els diferents tractaments. Ni tant sols la comparació entre el tractament de 5 mg/l i el grup control va resultar ser significatiu (p-valor=0,120; **Taula 10**). Per tant, segons els resultats obtinguts de les múltiples comparacions de mitjanes, es pot dir que la concentració de nTiO₂ no té cap efecte sobre l'activitat de la GST de la població de *H. exocellata*.

Taula 10: Taula que indica l'activitat de la GST en nmol/min/mg de proteïna en els diferents tractaments de nTiO₂. . Font: Elaboració pròpia.

Tractament nTiO ₂ (mg/l)	Mitjana GST(nmol/min/mg proteïna)	Std	Error	T-student (p-valor)
Control	85,007	27,292	12,205	
0,5	91,434	33,722	15,081	0,374
1,0	102,110	30,799	12,574	0,180
5,0	104,310	23,726	9,686	0,120
10,0	97,246	28,638	11,692	0,245
50,0	96,762	16,100	6,573	0,198

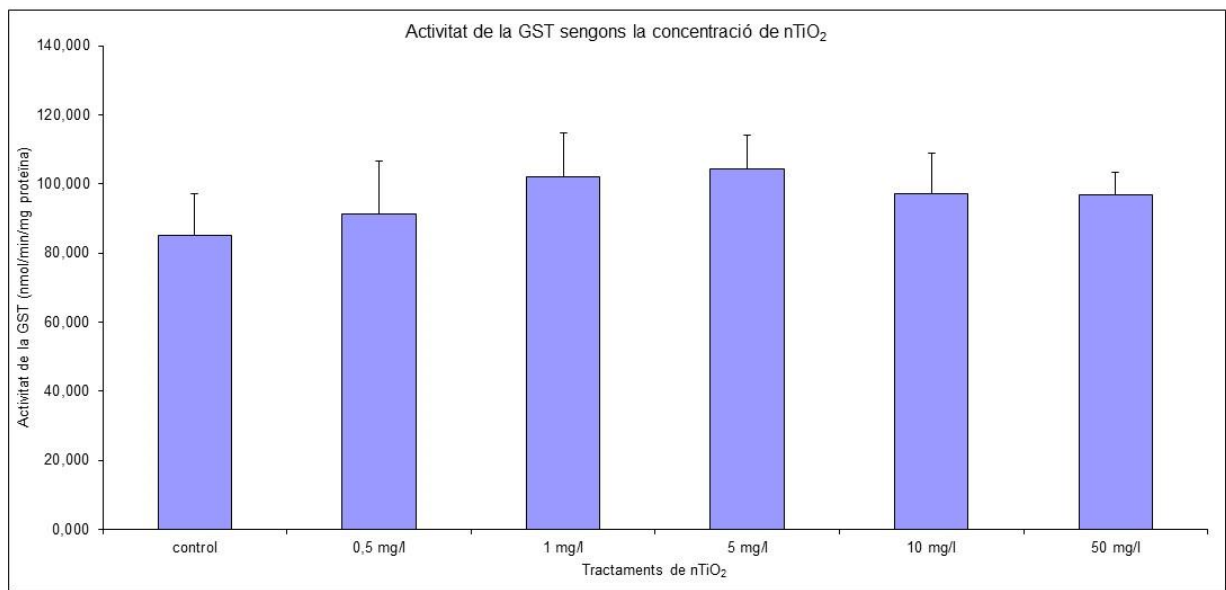


Fig. 13: Gràfic que mostra l'activitat de la GST en nmol/min/mg de proteïna segons la concentració de nTiO₂. Font: Elaboració pròpia.

5. DISCUSSIÓ DELS RESULTATS

Els resultats obtinguts dels diferents tests van mostrar diferències significatives en el nombre de contraccions abdominals (estrès) entre el grup control i el tractament amb una concentració de 50 mg/l de nTiO₂, a més, també es va observar un efecte sobre el nombre de contraccions abdominals quan hi ha una exposició prolongada del nTiO₂ en el temps sobre *H. exocellata*. A nivell cel·lular, en l'anàlisi dels biomarcadors es van observar diferències significatives en la peroxidació lipídica (estrès oxidatiu) entre el control i el tractament amb més concentració de nTiO₂; en el cas de la SOD, es van observar diferències entre el tractament control i una concentració de 10 mg/l de nTiO₂. La resta de biomarcadors (CAT, LDH i GST) no van indicar cap efecte del nTiO₂ sobre la població de *H. exocellata*. Pel que fa a les xarxes construïdes, tampoc es va observar cap efecte del nTiO₂ a diferents concentracions ni al llarg del temps d'exposició sobre *H. exocellata*. Altrament, la mortalitat més elevada es va donar en el tractament de 50 mg/l de nTiO₂ amb un 55,56% dels individus morts.

5.1.Efectes subletals

5.1.1.L'increment en la demanda d'O₂ faria augmentar el nombre de contraccions abdominals.

La toxicitat i el posterior canvi en el comportament animal té lloc quan s'introdueix un agent contaminant o apareix una nova condició en l'ambient que estressa als individus i els indueix un canvi en el seu comportament normal (Marcuella & Abramson, 1978). El nombre de contraccions abdominals és considerat com un canvi en el comportament de *H. exocellata* que podria estar degut a l'estrès provocat pel nTiO₂. En aquest treball, el nombre de contraccions abdominals va variar significativament entre els tractaments de 50 mg/l de nTiO₂ i els tractaments amb concentracions més baixes. Alguns autors relacionen aquest augment de les contraccions abdominals amb l'obtenció d'O₂ i el seu ús per al correcte funcionament del metabolisme. En casos d'hipòxia (amb un 30% de saturació d'oxigen), el nombre de contraccions abdominals o moviments ondulatoris en el gènere *Hydropsyche* augmenta significativament fins a un valor de 25 (Van der Geest, 2007); en contra, en casos amb una bona oxigenació de l'aigua (100% de saturació d'O₂) el nombre de contraccions abdominals disminueix fins a un valor de 3 (Van der Geest, 2007). El que fa pensar que un augment en la demanda d'O₂, augmenta considerablement el nombre de moviments ondulatoris per incrementar la ventilació i obtenció d'O₂ per les seves brànquies (Howack & Stanley, 2001). Els moviments que provoca són energèticament costosos i la majoria de l'O₂ obtingut és dedicat per a funcions locomotores i no per al creixement ni per al manteniment cel·lular (Van der Geest, 2007).

També, en casos d'estrès provocat per la contaminació d'aigües, Gerhardt (1996) en el seu estudi va informar d'un augment de la locomoció en l'espècie *Hydropsyche angustipennis* quan es troba exposada a aigües contaminades d'efluents industrials. En concret, la contaminació salina del medi aquàtic, pot provocar que el metabolisme es vegi incrementat degut a l'activació de mecanismes d'osmoregulació (Guerreiro *et al.*, 2002; Martínez-Álvarez *et al.*, 2002) que a la vegada, augmenta la freqüència dels moviments ondulatoris per facilitar la ventilació i l'obtenció d'O₂ (Van der Geest, 2007). En altre cas, no està del tot clar que la locomoció pugui ser un efecte subletal clar amb el que es pugui detectar efectes tòxics en les larves de *Hydropsyche*. En l'estudi de Macedo-Sousa *et al.* (2008) el moviment ondulatori en les larves de l'espècie *Hydropsyche pellucidula* no va mostrar cap efecte per la baixada en el pH del medi. Al mateix temps, es va mostrar un increment en les contraccions abdominals dels individus que es trobaven sota el tractament control, suggerint que el moviment podria variar en funció de factors intrínsecs.

En aquest experiment, la principal causa de l'augment en les contraccions abdominals sembla no ser degut a una situació d'hipòxia (com a factor intrínsec), ja que l'aigua dels aquaris es trobava en continu moviment gràcies a les bombes hidràuliques. En canvi, sembla que l'augment en la demanda d'O₂ sigui la principal causa de l'increment en les contraccions abdominals per ventilar les brànquies dels *H. exocellata* d'acord amb Howack & Stanley (2001). Aquest requeriment de ventilació pot ser degut a la necessitat d'eliminar el nTiO₂, que actuaria com a xenobiòtic, el qual exigeix de grans quantitats d'O₂ per incrementar el seu metabolisme (Guerreiro *et al.*, 2002; Martínez-Álvarez *et al.*, 2002) i generant grans quantitats de ROS (Livingstone, 1991) que provoca estrès oxidatiu a les cèl·lules. Els nostres resultats podrien indicar que la població de *H. exocellata* que es troba sota unes condicions de 50 mg/l de nTiO₂ podrien requerir una quantitat superior d'O₂ i es trobarien més estressats que la població del grup control.

5.1.2. Una concentració de 50 mg/l no afecta a la construcció de les xarxes de *H. exocellata*.

La simetria de les xarxes és també un factor subletal del qual s'han fet estudis com per exemple en el cas de Becker (1987), que va indicar una disminució en l'activitat de construcció de les xarxes en l'espècie *H. pellucidula* quan les concentracions d'O₂ són baixes. Per altra banda, alhora d'analitzar el caràcter més qualitatiu de les xarxes, Wendt-Rasch *et al.* (1998) va trobar un cert increment en la mida de malla de les xarxes i una disminució en les seves simetries en l'espècie *H. siltalai* quan era exposat a un agent insecticida. També, quan una població de *Hydropsyche exocellata* es troba sotmesa a un estrès salí, la irregularitat de les seves xarxes augmenta significativament (Sala *et al.* 2015).

El nTiO₂ no va mostrar cap tipus d'efecte sobre la regularitat de les xarxes com tampoc l'augment en la seva concentració. Malgrat els nostres resultats, podria ser que les concentracions utilitzades de nTiO₂ no fossin suficients com per a alterar la forma de construir les xarxes dels *H. exocellata*, es a dir, podria ser que al incrementar la concentració del nTiO₂ per sobre dels 50 mg/l hagués provocat un efecte, de totes maneres, s'han trobat unes concentracions de nano-partícules òptimes les quals els individus de *H. exocellata* poden tolerar per construir, sense irregularitats, les seves xarxes. Un hipotètic increment en la concentració de nTiO₂ podria provocar més estrès als individus, i com a conseqüència, un augment en la irregularitat de les xarxes com en el cas de Rasch *et al.* (1998) amb un agent insecticida i Sala *et al.* (2015) al incrementar la concentració de sals, o inclús, una disminució en el nombre de xarxes construïdes com en l'estudi de Becker (1987) al disminuir la concentració d'O₂. També podria ser que la toxicitat del nTiO₂ no afecti a les funcions metabòliques i neuronals encarregades de la construcció de les xarxes. En última instància, s'ha de destacar que comprovar la qualitat de les xarxes és un bon indicador per a avaluar l'estat físic dels *Hydropsyche* davant de qualsevol agent contaminant.

5.1.3. El nTiO₂ estaria provocant un estrès oxidatiu a nivell cel·lular a una concentració de 50 mg/l

L'anàlisi dels biomarcadors va mostrar que els individus de *H. exocellata* sotmesos a una concentració de 50 mg/l de nTiO₂ presentaven uns nivells de peroxidació lipídica (LPO) superiors als individus sotmesos al tractament control. La peroxidació lipídica és un dels efectes del dany oxidatiu de les cèl·lules, que principalment es troba provocat per les ROS i que afecta directament a les proteïnes, el DNA i els lípids. Les cèl·lules presenten enzims antioxidants com la CAT i la SOD per defensar-se de la producció de les ROS, però una inactivació provocada per aquestes (Winston & Di Giulio, 1991) en qualsevol d'aquests enzims, pot provocar estrès oxidatiu a les cèl·lules dels individus. Concretament, la peroxidació lipídica té lloc en el moment en el que els lípids pateixen una degradació oxidativa, la qual pot derivar en un dany a la membrana cel·lular que es troba formada principalment pels lípids. Una cadena de reaccions causada per la presència de radicals lliures d'oxigen condueixen a la LPO. Aquests radicals lliures d'oxigen capturen els electrons de les membranes lipídiques produint radicals lliures d'àcids grassos peroxidats, que reaccionen amb ells mateixos o bé altres àcids grassos. Els àcids grassos poliinsaturats són principalment afectats per la presència de grups metil (-CH₂-) que contenen molècules d'hidrogen altament reactives. Els productes trencats de la peroxidació lipídica, com cetones, aldehids i, més important, malondialdehid (MDA) (Leibovitz & Siegel, 1980) poden desencadenar un posterior dany en el DNA.

Els nivells de peroxidació lipídica dels individus sotmesos a la concentració més elevada de nTiO₂ confirmen la capacitat del nTiO₂ per formar ROS i generar un estrès oxidatiu a les cèl·lules. Aquests resultats s'ajusten als de l'estudi de Faria *et al.* (2014) en el que indica que una exposició de 1000 mg/l de nTiO₂ li provoca dany oxidatiu als teixits dels embrions de l'espècie *D. rerio* (zebrafish), donat que augmenten els nivells de peroxidació lipídica, com també els nivells d'enzims anti-oxidatius (SOD i GSH). Quan s'exposa els embrions de zebrafish a la radiació UV el nivell d'estrès oxidatiu és encara superior, indicant la capacitat foto-oxidativa del nTiO₂ per incrementar la producció de les ROS sota la radiació UV (Faria *et al.*, 2014).

Es creu que la capacitat del nTiO₂ per generar les ROS pot estar degut a la seva habilitat de produir radicals hidroxil (-OH) que poden reaccionar amb l'oxigen formant l'ió superòxid (O₂⁻) que és el substrat de l'enzim SOD (Faria *et al.*, 2014). Els radicals hidroxil són els que poden reaccionar amb d'altres molècules biològiques (Livingstone, 2003) tals com proteïnes, DNA i lípids (Fig. 14), i que explicarien els nostres nivells de peroxidació lipídica en el tractament amb la concentració més elevada de nTiO₂.

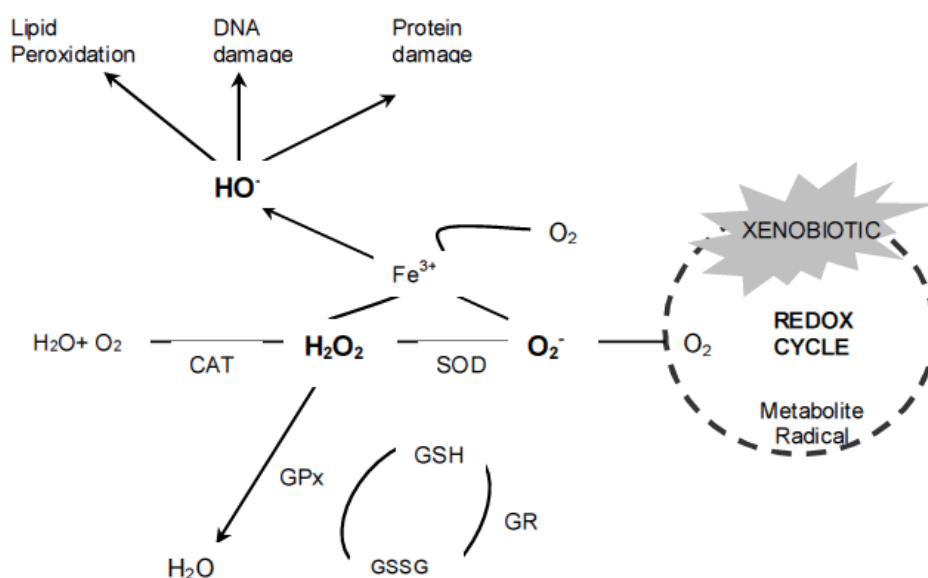


Fig. 14: esquema que representa els enzims antioxidants juntament amb els agents oxidants.

Els enzims antioxidants SOD i CAT (Fig. 14), que disminueixen la producció de les ROS, són biomarcadors els quals poden veure incrementades les seves activitats com a adaptació a les distorsions ambientals, o bé, es poden veure inhibides pel dany oxidatiu cel·lular (Vasseur & Cossu-Leguille, 2003). L'ió superòxid (O₂⁻) pot reaccionar amb el peroxidant d'hidrogen (H₂O₂) donant com a resultat més radicals hidroxil (OH•) que formen part de les ROS i que les cèl·lules necessiten eliminar mitjançant enzims anti-oxidatius. L'enzim

SOD té la capacitat de transformar el ió superòxid (O_2^-) en H_2O_2 i O_2 i, subseqüentment, l'enzim CAT trenca la molècula de H_2O_2 en H_2O i O_2 (Stegeman *et al.*, 1992) desintoxicant les cèl·lules.

D'aquesta manera, els nostres resultats indicarien que podria haver una certa tendència a la inhibició de l'activitat dels enzims SOD i CAT quan la concentració de $nTiO_2$ arriba als 10 mg/l, evitant l'eliminació de l' O_2^- via dismutació. Aquesta tendència podria estar provocada per l'excés de radicals hidroxil (-OH), que combinat amb l' O_2 generaria O_2^- en excés (Faria *et al.*, 2014). La inhibició de l'enzim CAT va ser observada en l'estudi de Kono & Fridovich (1982), en el que aquest enzim era inhibït per la producció en excés de l'ió superòxid i que podria explicar els resultats obtinguts de la quantificació de l'enzim CAT, però no en el cas de la quantificació de l'enzim SOD. Pel que fa a aquesta tendència d'inhibició dels dos enzims en el tractament de 10 mg/l de $nTiO_2$ podria estar explicada per una font d'estrès aleatòria que actuaria com a un factor incontrolable durant el procediment experimental: com la variabilitat de les condicions entre els diferents aquaris, la variació de cada individu o inclús nivells diferents d' O_2 en cada aquari. Malgrat els resultats, s'ha de destacar que es compleix una certa tendència a la inhibició, però que en cap cas es pot afirmar que els enzims SOD i CAT siguin inhibits quan la concentració de $nTiO_2$ ascendeix fins als 10 mg/l. En canvi, quan la concentració de $nTiO_2$ és d'uns 50 mg/l els dos enzims es troben actuant a uns nivells correctes que no indicarien cap tendència a la inhibició.

Els nivells de LDH i de GST no van mostrar diferències significatives entre el grup control i el tractament de 50 mg/l de $nTiO_2$ el que fa pensar que el $nTiO_2$ no produeix cap efecte en el metabolisme cel·lular ni tampoc en el metabolisme de biotransformació al augmentar la seva concentració. En els estudis de toxicitat de sals (Sala *et al.*, 2015; Barata *et al.*, 2005) la LDH sí que mostrava nivells superiors en les poblacions de *H. exocellata* no adaptades a una concentració de sals elevada (Sala *et al.*, 2015). Aquest fet va ser relacionat amb la possibilitat que podrien tenir les poblacions d'invertebrats per adaptar-se a condicions amb una elevada salinitat com ja s'ha comprovat en bacteris (Kartal *et al.*, 2006) i en plantes (Hameed & Ashraf, 2008). No se sap si els invertebrats es podran adaptar a unes condicions d'elevades concentracions de nano-partícules al medi en un futur, però seria interessant de comprovar-ho en altres estudis. En el cas de Barata *et al.* (2005) es van observar nivells de GST superiors en individus de *H. exocellata* sotmesos a concentracions de sals elevades que va ser relacionat amb els nivells de GST que presenten altres espècies d'insectes quan es troben exposades a xenobiòtics i altres agents oxidatius (Parkes *et al.*, 1993; Tang & Tu, 1995; Sivori *et al.*, 1997; Francis *et al.*, 2005).

5.2.Efectes letals

5.2.1. A partir de 50 mg/l augmenta la toxicitat del nTiO₂ a l'espècie *H. exocellata*.

En aquest experiment la mortalitat més elevada es va registrar en el tractament de més concentració de nTiO₂ amb un 55,56% dels individus morts al cap de 2 setmanes d'experiment. Aquest resultat es pot comparar amb la mortalitat registrada en *D. magna* amb la mateixa concentració de nTiO₂ i en el que la mortalitat va arribar al 100% dels individus al cap de 48 hores d'exposició en l'estudi de Zhu *et al.* (2010). Comparant aquests dos resultats se'n destaca que *H. exocellata* és una espècie més resistent que *D. magna*. Els valor de LC₅₀ (concentració que provoca una mortalitat del 50% de la població) que donava Zhu *et al.* (2010) es situava en 2,02 mg/l al cap de 72 hores d'exposició. En el nostre estudi no es va poder calcular el valor de LC₅₀ perquè es necessitaria repetir l'experiment diverses vegades amb diferents poblacions de *H. exocellata*, fet que es deixa per a futurs estudis de toxicitat de nano-partícules utilitzant aquesta espècie com a model.

Malgrat no tenir un valor de LC₅₀ en el nostre estudi, s'ha de destacar que la concentració aplicada als individus de *H. exocellata* per obtenir una mortalitat superior al 50% ha estat de 50 mg/l de nTiO₂ el que podria indicar que hem trobat concentracions òptimes de nano-partícules que entren dintre del seu rang de supervivència (que es trobaria per sota dels 50 mg/l), a partir d'aquesta concentració sembla que el nTiO₂ començaria a provocar un efecte sobre els individus de *H. exocellata*. A més, com s'ha dit abans, aquesta espècie és considerada com a resistent a la contaminació ambiental per la seva capacitat de bioacumular metalls i tolerar elevades concentracions salines (Cain & Luoma, 1998; Cain *et al.*, 2004; David 2003; Evans *et al.*, 2002; Sala *et al.*, 2015), el que pot indicar que altres espècies d'invertebrats menys resistents a la contaminació es poden veure afectades per concentracions més petites de nano-partícules de les que hem aplicat durant el nostre experiment. Aquest fet posaria en rellevància les dades aportades per Sholz & Nowack, (2009) en el que algunes de les zones més industrialitzades del món com Amèrica i Europa els seus efluent de plantes d'aigües residuals presenten unes concentracions de nTiO₂ de l'ordre de 3,47 µg/l; i en els seus cursos fluvials les concentracions es trobarien al voltant dels 0,015 µg/l. Aquestes dades són preocupants considerant que es pot donar l'acumulació del nTiO₂ al medi aquàtic en un futur, incrementant la seva concentració actual pels efluent residuals de plantes industrials i provocar un problema a la fauna aquàtica.

En vertebrats aquàtics l'efecte mortal que pot provocar el nTiO₂ s'ha avaluat en embrions de l'espècie de *zebrafish*, en la qual una concentració de 500 mg/l de nTiO₂ no va mostrar cap tipus d'efecte letal segons Zhu *et al.* (2008), com tampoc una concentració de 1000 mg/l (Faria *et al.*, 2013). En canvi, amb l'ús d'altres nanopartícules, dos estudis donen el major grau de mortalitat utilitzant el nZnO (Zhu *et al.*, 2008 i Adams *et al.*, 2006) que destaca per l'elevada toxicitat sobre els embrions i les larves de *Zebrafish* el qual necessita només una concentració de 1,79 mg/l per elevar la mortalitat fins al 50% dels individus al cap de 96 hores d'exposició (Zhu *et al.*, 2008). També en el cas de *D. magna* la mortalitat més elevada està provocada pel nZnO el qual provoca un 100% de la mortalitat dels individus amb una concentració de 0,5 mg/l (Adams *et al.*, 2006) una concentració 100 vegades inferior a la concentració més elevada del nostre estudi utilitzant nTiO₂ en la que es van detectar els únics efectes sobre *H. exocellata*. En *H. exocellata* encara no s'ha comprovat l'efecte del nZnO però seria interessant de comprovar-ho per saber si una espècie resistent a la contaminació com aquesta pot suportar una concentració superior a la de 0,5 mg/l de nZnO.

6. CONCLUSIONS

Els resultats d'aquest treball indiquen que una exposició del nTiO₂ a una concentració de 50 mg/l augmenta la toxicitat d'aquest agent contaminant i provoca efectes subletals a la població de *Hydropsyche exocellata*. Aquests efectes apareixen en forma d'estrès en els individus, que provoca un augment en el nombre de contraccions abdominals per ventilar les seves brànquies i presenten biomarcadors d'estrès oxidatiu a nivell cel·lular. Hem pogut comprovar com l'exposició del nTiO₂ al llarg del temps va anar incrementant aquest estrès en els individus de *H. exocellata* durant les 2 setmanes d'experiment.

També hem trobat concentracions de nano-partícules les quals la població de *H. exocellata* pot tolerar, i que es trobarien per sota dels 50 mg/l. De totes maneres, és important remarcar que *H. exocellata* és resistent a la contaminació i que altres espècies d'invertebrats aquàtics més sensibles es podrien veure afectades per concentracions més petites de nano-partícules.

Per aquest motiu creiem que és important que la normativa sobre l'abocament de nano-partícules al medi ambient proposi concentracions límit per evitar un augment de la concentració de les nano-partícules als rius, o bé que les plantes de tractament d'aigües residuals incloguin processos per eliminar-les per protegir la biodiversitat aquàtica.

7. BIBLIOGRAFIA

- Adams, LK., Lyon, DY., McIntosh, A., Alvarez, PJ. (2006). Comparative toxicity of nano-scale TiO₂, SiO₂ and ZnO water suspensions. *Water Sci. Technol.*; 54:327-334.
- Aebi, H. (1974). Catalase. In: Bergmayer, H.U. (Eds.), *Methods of enzymatic analysis*. Academic Press, London, pp. 671-684.
- Alkilany, A.M., Murphy, C.J. (2010). Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: what we have learned so far? *J. Nanopart. Res.*, 12:2313-2333.
- Allan, J.D., Castillo, M.M. (2007). *Stream ecology: structure and function of running waters*. Springer Science & Business media, 2007.
- Baird, DJ. & Burton, GA. (2001). *Ecological Variability: Separating Natural from Anthropogenic Causes of Ecosystem Impairment*. SETAC, Brussels, Belgium.
- Barata, C., Lekumberri, I., Vila-Escalé, M., Prat, N., Porte, C. (2005). Trace metal concentration, antioxidant enzyme activities and susceptibility to oxidative stress in the tricoptera larvae *Hydropsyche exocellata* from Llobregat river basin (NE Spain). *Aquatic Toxicology*, 74: 3-19.
- Baun, A., Hartmann, NB., Grieger, KD., Kusk, KE. (2008). Ecotoxicity of Engineered Nanoparticles to Aquatic Invertebrates: A Brief Review and Recommendations for Future Toxicity Testing. *Ecotoxicology*; 17:387-395.
- Becker, G., (1987). Ner-building behaviour, tolerance and development of two caddisfly species from the river Rhine (*Hydropsyche contubernalis* and *H. pellucidula*) in relation to the oxygen content. *Oecologia*, 73: 242-250.
- Beutler, E. (1975). *Red Cell Metabolism: A Manual of Biochemical Methods*. 2en ed. Grune & Straton, New York.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem*, 72: 248-254.
- Brown, DM., Wilson, MR., Macnee, W., Stone, V., Donaldson, K. (2001). Size-dependent proinflammatory effects of ultrafine polystyrene particles: a role for surface area and oxidative stress in the enhanced activity of ultrafines. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*; 175:191-9.
- Bonada, N. (2003). *Ecology of the macroinvertebrate communities in Mediterranean rivers at different scales and organization levels*. PhD. Thesis. University of Barcelona, Barcelona.

- Bonada, N., Zamora Muñoz, C., Rieradevall, M., Prat, N. (2004). Ecological profiles of caddisfly larvae in Mediterranean streams: implications for bioassessment methods. *Environ. Pollut.* 132, 509-521.
- Cain, DJ., Luoma, SN. (1998). Metal exposures to native populations of caddisfly *Hydropsyche* (Trichoptera: Hydropsychidae) determined from cytosolic and whole body metal concentrations. *Hydrobiologia* 386, 103-117.
- Cain, DJ., Luoma, SN., Wallace, WG. (2004). Linking bioaccumulation on aquatic insects to their distribution patterns in a mining-impacted river. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 1463-1473.
- Campos, B., Rivetti, C., Rosenkranz, P., Navas, JM., Barata, C. (2013). *Aquatic Toxicology*; 130-131: 174-183.
- Cummins, K.W. (1973). Trophic relations of aquatic insects. *Annual Review of Entomology*, 18: 183-206.
- Dahm, R. (2006). "The Zebrafish Exposed". *American Scientist* 94 (5): 446–53.
- Damáso, J., Fernández-Sanjuan, M., Sánchez-Ávila, J., Lacorte, S., Prat, N., Rieradevall, M., Soares, A.M., Barata, C. (2011). Multibiochemical responses of benthic macroinvertebrate species as a complementary tool to diagnose the cause of community impairment in polluted rivers. *Water Res.* 45(12): 3599-3613.
- David, CPC. (2003). Establishing the impact of acid mine drainage through metal bioaccumulation and taxa richness of benthic insects in a tropical Asian stream. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 2952-2959.
- Di Giulio, R. T., Benson, W.H., Sanders, B.M., Van Veld, P.A. (1995). Biochemical mechanisms: metabolism, adaptation and toxicity. In *Fundamentals of Aquatic Toxicology. Effects, Environmental Fate and Risk Assessment*, ed G. Rand. Taylor and Francis, London.
- Dobias, J. & Bernier-Latmani R. (2013). Silver release from Silver Nanoparticles in Natural Waters. *Environmental Science & Technology* 4140-4146. École Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL), CH-1015 Lausanne, Switzerland.
- Deplegue, MH., Amaral-Mendes, JJ., Daniel, B., Halbrook, RS., Kloepper-Sams, P., Moore, MN, et al. (1993). The conceptual basis of the biomarker approach. In: Peakall DG, Shugart LR, editors. *Biomarkers---research and application in the assessment of environmental health*. Berlin, Heidelberg: Springer. p. 15-29.
- Esterbauer, H., Schaur, R.J., Zollner, H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynoneal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biol. Med.* 11: 81-128.

- Evans, RD., Balch, GC., Evans, HE., Welbourn, PM. (2002). Simultaneous measurement of uptake and elimination of cadmium by caddisfly (Trichoptera: Hydropsychidae) larvae using stable isotope tracers. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 1032-1039.
- Faria, M., Navas, JM., Soares, AMVM., Barata, C. (2013). Oxidative stress effects of titanium dioxide nanoparticle aggregates in zebrafish embryos. *Science of the Total Environment*: 470-471: 379-389.
- Foro Intergubernamental sobre Seguridad Química. Alianzas Mundiales para la Seguridad Química. Contribución con el objetivo del 2020. Punto 6 del orden del día. IFCS/FORUM-VI/01.TS. Dakar, Senegal. Marzo de 2008.
- Francis, F., Vanhaelen, N., Haubruge, E. (2005). Glutathione-S-transferase in the adaptation to plant secondary metabolites in the *Myzus persicae* aphid. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* 58: 166-174.
- Galloway, TS., Sanger, RC., Smith, KL., Fillman, G., Readman, JW., Ford, TE., et al. (2002). Rapid assessment of marine pollution using multiple biomarkers and chemical immunoassays. *Environmental Science & Technology*; 36: 2219-26.
- Galloway, TS., Brown, RJ., Browne, MA., Dissanayake, A., Lowe, D., Jones, MB., et al. (2004). A multibiomarker approach to environmental assessment. *Environmental Science & Technology*; 38: 1723-31.
- García, G. (2015). Nanopartículas magnéticas inmovilizadas en la membrana celular a través de química "click" bioortogonal. Trabajo Fin de Grado. Instituto Universitario de Investigación en Nanociencia de Aragón, Facultad de Ciencias, Universidad de Zaragoza.
- Gottschalk, A., Sonderer, T., Scholz, RW., Nowack, B. (2009). Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO₂, ZnO, Ag, CNT, Fullerenes) for different regions. *Environ. Sci. Technol.*; 43:9216-9222.
- Gross, M. (1999). *Travels to the nanoworld; miniature machinery in the nature and technology*. New York: Plenum Trade; 254 pp.
- Guerreiro, G., Di Finizio, A., Ciarcia, G., (2002). Stress-induced changes of plasma antioxidants in aquacultured sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 132: 205-2011.
- Habig, W.H., Jakoby, W.B. (1981). *Methods Enzymol.*, 77: 398-405.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, Oxford.

- Hameed, M., Ashraf, M. (2008). Physiological and biochemical adaptations of *Cynodon dactylon* (L.) Pers. from the Salt Range (Pakistan) to salinity stress. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 203(8): 683-694.
- Hanson, P., Springer, M. & Ramírez, A. (2010). Introducción a los grupos macroinvertebrados acuáticos. *Rev. Biol. Trop. (Int. J. Trop. Biol. ISSN-0034-7744)* Vol. 58 (Suppl. 4): 3-37.
- Hoet PHM, Brüske-Hohfeld I, Salata OV. (2004). Nanoparticles - known and unknown health risks. *J Nanobiotechnol*; 2:12, doi:10.1186/1477-3155-2-12.
- Howack, W.W., Stanley, D.W. (2001). Insects in hypoxia. *Journal of Insects Physiology*, 47: 533-542.
- Hund-Rinke, K., Simon, M. (2006). Ecotoxic effect of photocatalytic active nanoparticles TiO₂ on algae and daphnids. *Environ. Sci. Poll. Res.*; 13(4):1-8.
- Instituto Riojano de Salud Laboral. (2011). La Seguridad y la Salud en la Exposición a Nanopartículas. "Por un desarrollo seguro de las nanotecnologías". Área de Higiene Industrial, Logroño. DL: LR-101-2011.
- Kartal, B., Koleva, M., Arsov, R., van der Star, W., Jetten, M.S., Strous, M. (2006). Adaptation of a freshwater anammox population to high salinity wastewater. *Journal of Biotechnology*, 124(4): 546-553.
- Kim D, El-Shall H, Dennis D, Morey T. (2005). Interaction of PLGA nanoparticles with human blood constituents. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 40:83-91.
- Kono, Y., Fridovich. (1982). Superoxide radical inhibits catalase. *J. Biol. Chem.* 10: 5751-5754.
- Li, Y., Li, Y., Wu, X-L., Li, X. (2012). Removal of silver nanoparticles in simulated wastewater treatment processes and its impact on COD and NH. *Chemosphere* 87: 248-252.
- Leibovitz, B.E., Siegel, B.V. (1980). Aspects of free radical reactions in biological systems: aging. *J. Gerontol.* 35, 45-56.
- Livingstone, D.R. (1991). Organic xenobiotic metabolism in marine invertebrates. In: Gilles, R. (Ed.), *Advances in comparative and environmental physiology*, vol. 7, Springer-Verlag, Berlin, 46-185.
- Livingstone, D.R., (1993). Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular biomarkers in the aquatic environment. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 57, 195-211.
- Livingstone, DR., Chipman, JK., Lowe, DM., Minier, C., Mitchelmore, CL., Moore, MN., et al. (2000). Development of biomarkers to detect the effects of organic pollution on aquatic invertebrates:

- recent molecular, genotoxic, cellular and immunological studies on the common mussel (*Mytilus edulis* L.) and other mytilids. *Int. Environ. Pollut.*; 13:56-91.
- Livingstone, D.R., (2003). Oxidative stress in aquatic organisms in relation to pollution and aquaculture. *Revue Méd. Vét.* 154, 6, 427-430.
- Lovern, SB., Strickler, JR., Klaper, R. (2007). Behavioral and physiological changes in *Daphnia magna* when exposed to nanoparticle suspensions (titanium dioxide, nano-C60, and C60HxC70Hx). *Environ. Sci. Technol.* 41:4465-4470.
- Lowe, DM., Fossato, VU., Depledge, MH. (1995a). Contaminant induced lysosomal membrane damage in blood cells of mussels *M. galloprovincialis* from the Venice Lagoon: an *in vitro* study. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*; 129:189-96.
- Lowe, DM., Soverchia, C., Moore, MN. (1995b). Lysosomal membrane responses in the blood and digestive cells of mussels experimentally exposed to flouranthene. *Aquat. Toxicol.*; 33:105-12.
- Ma, S., Li, D. (2012). The biophysicochemical interactions at the interfaces between nanoparticles and aquatic organisms: adsorption and internalization. *Environmental Science: Processes Impacts*, 15:145-160.
- Macedo-Sousa, J.A., Gerhardt, A., Brett, C.M.A., Nogueira, A.J.A., Soares, A.M.V.M. (2008). Behavioural responses of indigenous benthic invertebrates (*Echinogammarus meridionalis*, *Hydropsyche pellucidula* and *Choroterpes picteti*) to a pulse of acid mine drainage: a laboratorial study. *Environ. Pollut.* 156: 966-973.
- Marcuella, H., Abramson, C.I. (1978). Behavioral toxicology and teleost fish. In: *The Behaviour of Fish and other Aquatic Animals*, pp. 33-77, New York: Academic.
- Martínez-Álvarez, R.M., Hidalgo, M.C., Domezain, A., Morales, A.E., García-Gallego, M., Sanz, A. (2002). Physiological changes of sturgeon *Acipenser naccarii* caused by increasing environmental salinity. *J. Exp. Biol.* 205: 3699-3706.
- McCord, J. M., Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry*, 224: 6049-6055.
- Moore, MN., Depledge, MH., Readman, JW., Leonard, P. (2004). An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. *Mutat. Res.*; 552:247-68.
- Moore, MN. (2006). Do Nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? *Environment International*. Plymouth Marine Laboratory.

- Nakano, S., Miyasaka, H., Kuhara, N. (1999). Terrestrial-Aquatic Linkages: Riparian Arthropods Inputs Alter Trophic Cascades in a Stream Food Web. The Ecological Society of America, Ecology, Vol. 80, No. 7. pp. 2435-2441.
- Neal, A.L. (2008). What can be inferred from bacterium-nanoparticle interactions about the potential consequences of environmental exposure to nanoparticles? Ecotoxicology, 17:362.
- NHECD. (2008). Creation of a critical and commented database on the health, safety and environmental database. Recuperat de <http://www.nhecd-fp7.eu/index.php?id=515>.
- Parkes, T.L., Hilliker, A.J., Phillips, J.P. (1993). Genetic and biochemical analysis of glutathione-S-transferase in the oxygen defense system of *Drosophila melanogaster*. Genome 36: 1007-1014.
- Perkel, JM. (2004). Nanoscience is out of the bottle. The Scientist; 17(15):20-3.
- Pol, R., Guerrero, M., García-Lecina, E., Altube, A., Rossinyol, E., Garroni, S., Baró, M.D., Pons, J., Sort, J., Pellicer, E. (2016). Ni-, Pt- and (Ni/Pt)-doped TiO₂ nanophotocatalysts: A smart approach for sustainable degradation of Rhodamine B dye. Appl. Catal. B Environ. 181, 270–278. doi:10.1016/j.apcatb.2015.08.006
- Rand, GM., Petrochelli, SR. (1985). Fundamentals of Aquatic Toxicology: Methods and Applications. FMC Corporation, Princetown, New Jersey; Batelle New England Marine Research Laboratory, Duxbury, Massachussetts. ISBN 0-89116-382-4.
- Resh, V.H. (1992). Recent trends in the use of Trichoptera in water quality monitoring. In: Proceedings of the Seventh International Symposium on Trichoptera, pp. 285-291.
- Rosenkranz, P., Fernandes, TF., Chaudhry, Q., Stone, V. (2007). Effects of a model nanoparticle and manufactured nanoparticles on *Daphnia magna*. Proceedings from Nanotoxicology, 2nd Information Conference, 19-21, San Servolo, Venice, Italy, pp 42-43.
- Royal Society and Royal Academy of Engineering. (2004). Nanoscience and Nanotechnologies: opportunities and uncertainties. RS policy document 19/04. London: The Royal Society; p.113.
- Sala Prat, M. (2015). Efectes subletals de la salinització en *Hydropsyche exocellata*. Treball Final de Màster. Freshwater Ecology and Management Research Group, Grup de recerca BETA, Departament d'Ecologia de la Universitat de Barcelona, Barcelona.
- Sholz, R. & Nowack, B. (2009). Modeled Environmental Concentrations of Engineered Nanomaterials (TiO₂, ZnO, Ag, CNT, Fullerenes) for Different Regions. Environmental Science & Technology, Vol. 43, 9216-9222. Swiss Federal Laboratories for Materials Testing and Research, Zurich, Switzerland.

- Solà, C. & Prat, N. (2006). Monitoring metal and metalloid bioaccumulation in Hydropsyche (Trichoptera, Hydropsychidae) to evaluate metal pollution in a mining river. Whole body versus tissue content. *Science of the Total Environment*, 359(1), 221-231.
- Sivori, J.L., Casabe, N., Zerba, E.N., Wood, E.J. (1997). Induction of glutathione-S-transferase activity in *Triatoma infestans*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 92: 797-802.
- Stegeman, J.J., Brouwer, M., Richard, T.D.G., Förlin, L., Fowler, B.A., Sanders, B.M., van Veld, P.A. (1992). Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In: Hugget, R.J., Kimerly, R.A., Mehrle, P.M., Jr, Bergman, H.L. (Eds.), *Biomarkers: Biochemical, 30 Physiological and Histological markers of Anthropogenic Stress*. Lewis Publishers, Chelsea, MI, USA, pp. 235-335.
- Tachet, H., Pierrot, J.P., Roux, C., Bournaud, M. (1992). Net-building behaviour of six Hydropsyche species (Trichoptera) in relation to current velocity and distribution along the Rhône River. *Journal of North American Benthological Society*: 350-365.
- Tang, A.H., Tu, C.P. (1995). Pentobarbital-induced changes in *Drosophila* glutathione-S-transferase D21 mRNA stability. *J. Biol. Chem.* 270: 13819-13825.
- Van der Gest. (2007). Behavioural responses of caddisfly larvae to hypoxia. *Contributions to Zoology*, 76 (4): 255-260.
- Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E. (2003). Fish Bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a Review. *Environ. Toxicology*. 36, 189-222.
- Vasseur, P., Cossu-Leguille, C. (2003). Biomarkers and community indices as complementary tools for environmental safety. *Environ. Int.* 28: 711-717.
- Vieira, R. (1999). Tesis doctoral: Las larvas de los Tricópteros de Galicia (Insecta: Trichoptera). Facultad de Biología de la Universidad de Santiago de Compostela.
- Wang, Z.L. (1998). *Phys. Chem. B*; 6145-6151.
- Wells, P.G., Depledge, M.H., Butler, J.N., Manock, J.J., Knap, A.H. (2001). Rapid toxicity assessment and biomonitoring of marine contaminants---exploiting the potential of rapid biomarker assays and microscale toxicity test. *Mar. Pollut. Bull.*; 42:799-804.
- Wendt-Rasch, L., Vought, L.-M., Woim, P. (1998). Effects of fenvalerate on the net-spinning behaviour of Hydropsyche siltalai (Dölher)(Trichoptera: Hydropsychidae). *Hydrobiologia*, 362: 53-61.

- Whalen, K.E. (2008). Functional characterization and expression of molluscan detoxification enzymes and transporters involved in dietary allelochemical resistance. Bachelor of Science, University of North Carolina, PhD Thesis.
- Winston, G.W., Di Giulio, R.T. (1991). Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat Toxicol.* 19, 137-161.
- Zhu, X., Chang, Y., Cheng, Y. (2010). Toxicity and Bioaccumulation of TiO₂ Nanoparticle Aggregates in *Daphnia magna*. *Chemosphere* 78: 209-215.
- Zhu, X., Zhu, L., Duan, Z., Qi, R., Li, Y., Lang, Y. (2008). Comparative toxicity of several metal oxide nanoparticle aqueous suspensions to Zebrafish (*Danio rerio*) early developmental stage. *J. Environ. Sci. Health A. Tox Hazard Subst. Environ. Eng.* 43(3): 278-284.

8. ANNEX

8.1. Dades del nombre de contraccions abdominals (Test de Moviment)

Data	Tractament	Nº contraccions abdominals
dia1	0	4
dia1	0	0
dia1	0	0
dia1	0	4
dia1	1	0
dia1	1	0
dia1	1	4
dia1	1	5
dia1	2	13
dia1	2	0
dia1	2	3
dia1	2	10
dia1	3	4
dia1	3	10
dia1	3	1
dia1	3	3
dia1	4	3
dia1	4	0
dia1	4	0
dia1	4	8
dia1	5	9
dia1	5	6
dia1	5	7
dia1	5	14
dia2	0	7
dia2	0	4
dia2	0	7
dia2	0	0
dia2	1	0
dia2	1	0
dia2	1	7
dia2	1	0
dia2	2	13
dia2	2	4
dia2	2	5
dia2	2	0
dia2	3	11
dia2	3	3

dia2	3	8
dia2	3	0
dia2	4	10
dia2	4	15
dia2	4	10
dia2	4	7
dia2	5	5
dia2	5	13
dia2	5	10
dia2	5	14
dia3	0	1
dia3	0	3
dia3	0	6
dia3	0	10
dia3	1	14
dia3	1	12
dia3	1	7
dia3	1	14
dia3	2	4
dia3	2	12
dia3	2	4
dia3	2	7
dia3	3	3
dia3	3	5
dia3	3	6
dia3	3	7
dia3	4	8
dia3	4	14
dia3	4	15
dia3	4	10
dia3	5	20
dia3	5	12
dia3	5	10
dia3	5	23
dia4	0	17
dia4	0	5
dia4	0	7
dia4	0	8
dia4	1	0
dia4	1	6
dia4	1	0
dia4	1	7
dia4	2	6
dia4	2	10
dia4	2	11

dia4	2	7
dia4	3	5
dia4	3	0
dia4	3	9
dia4	3	8
dia4	4	18
dia4	4	6
dia4	4	13
dia4	4	13
dia4	5	16
dia4	5	2
dia4	5	15
dia4	5	30

8.2. Dades de l'entropia de les xarxes

Fase	Tractament	Entropia
0	0	0,0013
0	0	0,0015
0	0	0,0036
0	0	0,0033
0	2	0,0014
0	2	0,002
0	3	0,0032
0	3	0,0011
0	3	0,0041
0	4	0,002
0	4	0,0013
0	4	0,0023
0	4	0,0032
0	4	0,0029
0	5	0,0032
0	5	0,0043
0	6	0,0027
0	6	0,0026
0	6	0,0024
1	0	0,0025
1	0	0,0024
1	0	0,0022
1	0	0,0022
1	0	0,0037
1	2	0,0012
1	2	0,0018
1	3	0,0035

1	3	0,0016
1	3	0,0052
1	3	0,0054
1	4	0,0022
1	4	0,0033
1	5	0,0019
1	5	0,0083
1	5	0,0031
1	5	0,0016
1	5	0,0036
1	5	0,0019
1	6	0,0014
1	6	0,0032
1	6	0,0025
1	6	0,0038
1	6	0,0031
1	6	0,0154
1	6	0,0022

8.3. Dades de mortalitat

Nombre d'individus vius

Tractament	Concentració nTiO2 (mg/L)	Nombre d'individus vius fase inicial	15/03/2016	17/03/2016	22/03/2016	24/03/2016	% Mortalitat Final
Control	0	9	8	8	7	7	22,22
2	0,5	6	6	6	5	4	33,33
3	1	10	9	8	7	7	30,00
4	5	7	6	6	6	6	14,29
5	10	7	6	6	5	5	28,57
6	50	9	8	7	5	4	55,56
Total	-	48	43	41	35	33	-

Mortalitat per etapes de temps d'exposició

Tractament	Mortalitat 1 (%)	Mortalitat 2 (%)	Mortalitat 3 (%)	Mortalitat 4 (%)
Control	11,11	0,00	12,50	0,00
2	0,00	0,00	16,67	20,00
3	10,00	11,11	12,50	0,00
4	14,29	0,00	0,00	0,00
5	14,29	0,00	16,67	0,00
6	11,11	12,50	28,57	20,00
Mitjana	10,13	3,94	14,48	6,67

8.4. Protocols per als Biomarcadors

Homogenització de Teixit de les Mostres

1. Es van preparar uns 100 ml de *homogenization buffer* amb 1 ml de EDTA 1000 mM.
2. Els *Hydropsyche* emmagatzemats al congelador de -80°C en tubs falcon (cada tub falcon representa a un tractament amb una concentració concreta de nTiO₂) eren extrets i mantinguts en els tubs sobre gel sec. De cada tractament (cada falcon) eren extrets 2 individus (*pools*: n=2) i introduïts en tubs d'assaig amb 1 ml de *homogenization buffer* per a fer 1 rentat dels individus.
3. Una vegada que els individus eren rentats es procedia a mesurar la massa dels 2 individus junts amb l'ajuda d'una balança analítica (extraient el cap dels individus abans d'anotar el seu pes) i introduïts dintre de tubs eppendorf de 2 ml de capacitat.

Quantitat de *homogenization buffer* per homogeneïtzar les mostres:

$$\text{mg de pes anotat} \times 8 = \text{volum de } \textit{homogenization buffer} \text{ necessari}$$

A continuació es mostra la taula amb el pes anotat de cada *pool* amb el volum necessari per homogeneïtzar la mostra:

CONTROL	Pes (mg)	Volum (µl)
C1	90.11	721
C2	82.80	662
C3	103.46	828
C4	56.88	455
C5	52.27	418
C6*	176.60	1412
0,5 mg/l		
2.1	100.05	800
2.2	97.05	780
2.3	65.74	526
2.4	60.09	480
2.5	97.90	782
2.6*	-	-
1 mg/l		
3.1	62.55	500
3.2	66.61	532
3.3	104.01	832

3.4	64.15	512
3.5	49.42	395
3.6	63.47	508
5 mg/l		
4.1	85.60	684
4.2	103.17	825
4.3	89.16	714
4.4	78.47	628
4.5	95.13	760
4.6	89.42	714
10 mg/l		
5.1	84.28	674
5.2	87.04	696
5.3	101.70	814
5.4	76.85	615
5.5	105.96	848
5.6	85.07	608
50 mg/l		
6.1	74.66	597
6.2	94.09	752
6.3	110.40	882
6.4	75.68	605
6.5	77.87	622
6.6	66.02	528

* La mostra C6 no es va acabar fent perquè el *pool* constava de 3 individus i no es va acabar de fraccionar el teixit de manera òptima.

* La mostra 2.6 no es va acabar fent per la falta d'individus en el tractament 0.5 mg/l.

*La mostra 6.6 consta d'un *pool* amb un sol individu.

4. A continuació les mostres eren fraccionades amb l'ajuda de *beeds* (2 de 5 mm de diàmetre i 1 de 3 mm de diàmetre) i de *tissue layer* a 50 oscil·lacions durant 1 minut.

5. S'extreia el "triturat" dels tubs *ependorf* amb pipetes i es col·locava en nous tubs *ependorf* correctament etiquetats.

6. Les mostres eren centrifugades a 10.000 g durant 20 minuts per separar el sobrenedant i descartar el pèl·let cel·lular.

7. Amb pipetes s'extreia el sobrenedant i s'aliquotaven segons els volums necessaris per a l'anàlisi dels 6 biomarcadors:

Quantificació de proteïna	10 µl
LPO	100 µl
CAT	20 µl
GSH	100 µl
LDH+GST	50 µl
SOD	20 µl

8. Totes les mostres eren introduïdes en gel sec una vegada que eren aliquotades i després s'emmagatzemaven al refrigerador de -80°C.

Quantificació de Proteïna de les Mostres – Bradford 1976

L'assaig de Bradford és un mètode colorimètric de quantificació de proteïnes, basat en el canvi d'absorbància del colorant *Coomassie Brilliant Blue G-250* en condicions àcides quan s'uneix a les proteïnes.

1. Primer es van preparar els estàndards de BSA (*Bovine Serum Albumin* 1 mg/ml) en tubs *ependorf* per construir la corba de la reacció amb les següents quantitats que es mostren a la taula:

Concentració (mg/ml)	H ₂ O MilliQ vol.	BSA Stock (1mg/ml) vol.
0	500 µl	0 µl
0.02	490 µl	10 µl
0.04	480 µl	20 µl
0.1	450 µl	50 µl
0.2	400 µl	100 µl

2. A continuació, tots els replicats (mostres) van ser diluïts amb H₂O MilliQ a una dilució 1/100 per encaixar la concentració de proteïna entre els 0.02 i 0.2 mg/ml dintre de la corba dels estàndards:

10 µl de mostres + 990 µl de H₂O MilliQ a baixa temperatura

3. Les plaques es van preparar per a un total de 4 rèpliques per cada replicat (mostres) + 4 rèpliques per cada estàndard de BSA:

A	0	0.02	0.04	0.1	0.2	C1	C2	C3	C4	C5	C6	2.1	2.2	2.3	2.4	2.5	2.6	3.1
B	0	0.02	0.04	0.1	0.2	C1	C2	C3	C4	C5	C6	2.1	2.2	2.3	2.4	2.5	2.6	3.1
C	0	0.02	0.04	0.1	0.2	C1	C2	C3	C4	C5	C6	2.1	2.2	2.3	2.4	2.5	2.6	3.1
D	0	0.02	0.04	0.1	0.2	C1	C2	C3	C4	C5	C6	2.1	2.2	2.3	2.4	2.5	2.6	3.1
E	3.2	3.3	3.4	3.5	3.6													
F	3.2	3.3	3.4	3.5	3.6													
G	3.2	3.3	3.4	3.5	3.6													
H	3.2	3.3	3.4	3.5	3.6													

A	4.1	4.2	4.3	4.4	4.5	4.6	5.1	5.2	5.3	5.4	5.5	5.6						
B	4.1	4.2	4.3	4.4	4.5	4.6	5.1	5.2	5.3	5.4	5.5	5.6						
C	4.1	4.2	4.3	4.4	4.5	4.6	5.1	5.2	5.3	5.4	5.5	5.6						
D	4.1	4.2	4.3	4.4	4.5	4.6	5.1	5.2	5.3	5.4	5.5	5.6						
E	6.1	6.2	6.3	6.4	6.5	6.6												
F	6.1	6.2	6.3	6.4	6.5	6.6												
G	6.1	6.2	6.3	6.4	6.5	6.6												
H	6.1	6.2	6.3	6.4	6.5	6.6												

A cada pou de les dues plaques es van afegir 10 µl de mostra i 10 µl de estàndard als pous corresponents.

4. El reactiu de Bradford es va preparar per a un volum total de 35 ml:

41 replicats (mostres) x 4 rèpliques x 200 µl a cada pou de la placa = 32.800 µl = 32,8 ml aprox. 35 ml

En una proporció 1 Bradford : 4 H₂O milli-Q → 7 ml de Bradford + 28 ml de H₂O milli-Q

5. A cada pou es van afegir 200 µl de reactiu de Bradford.

6. A continuació es van col·locar les dues plaques a incubar durant 15 min a temperatura ambient i protegides de la llum.

7. Es van llegir l'absorbància de les dues plaques a 580 nm i es va calcular la mitjana de les absorbàncies de cada replicat (eliminant les rèpliques que presentaven una desviació superior al 5%).

8. Finalment es va calcular la quantitat de proteïna de totes les mostres (replicats) mitjançant la extrapolació de l'equació de 2on grau (la corba dels estàndard de BSA s'ajusta a una equació lineal de 2on grau):

$$Y = ax^2 + bx + c \rightarrow x \text{ (mg/ml)} = \frac{-b \pm \sqrt{b^2 - 4a(c - y)}}{2a}$$

A on:

a= coeficient de x^2

b= coeficient de x

c= terme independent de x

y= absorbància (en nm)

x= concentració de proteïna de les mostres en mg/ml

El resultat es multiplica pel factor de dilució, en aquest cas, 100.

Peroxidació dels lípids – Esterbauer et al., 1991

El malondialdehid (MDA) és un producte natural generat de la peroxidació dels lípids. L'assaig de MDA està basat en la reacció del agent cromogènic *N-methyl-2-phenylindole* (NMPI) amb MDA a 45°C, donant com a resultat un cromòfor que presenta una absorbància a 586 nm (Esterbauer *et al.*, 1991).

1. Primer de tot es van preparar els estàndards de TMP 10 µM:

- Es va preparar reactiu TMP 10 mM amb 4,95 µl TMP + 3 ml *homogenization buffer* (*Phosphate buffer* 100 mM, pH=7,4; 4°C; 150 ml KCl i 1 mM EDTA)
- El TMP 10 mM es va diluir 1000 vegades amb 20 µl TMP 10 Mm + 20 ml de H₂O milli-Q.

ESTÀNDARDS:

Blanc	100 µl <i>homobuffer</i> + 100 µl H ₂ O milli-Q
0 µM	200 µl H ₂ O milli-Q
0,25 µM	25 µl TMP µM + 175 µl H ₂ O milli-Q
0,50 µM	50 µl TMP µM + 150 µl H ₂ O milli-Q
1 µM	100 µl TMP µM + 100 µl H ₂ O milli-Q
2 µM	200 µl TMP µM

* Es va preparar 2 vegades els estàndard per a plaquetar 2 plaques diferents

2. El reactiu *1-methyl-2-phenylindole* (Reactiu 1) es va preparar per a un volum total de 130 ml:

48 replicats x 4 rèpliques x 650 µl = 124.800 µl = 124,8 ml aprox. 130 ml de reactiu 1

De la següent manera:

Es van dissoldre 0.209 g de reactiu 1 en 31,25 ml de metanol + 93,75 ml acetonitril (en proporció 1:3)

3. Es van afegir 650 µl de reactiu 1 en totes les mostres (després es va fer un vòrtex a totes les mostres per homogeneïtzar-les).

4. Es van afegir 150 µl de HCl 37% en totes les mostres.

5. Es van afegir 12 µl de BHT 1% en totes les mostres.

6. Les mostres es van incubar a 45°C durant uns 40 min per a permetre la reacció. La reacció s'atura quan les mostres s'introdueixen en gel.

7. Es van centrifugar les mostres a 15.000 g durant 10 min.

8. Es van preparar les plaques dividint les mostres en dos grups diferents i afegint 300 µl de volum de reacció a cada pou:

A	B	0	0.25	0.50	1	2	C1	C2	C3	2.1	2.2	2.3	3.1	3.2	3.3	4.1	4.2	4.3
B	B	0	0.25	0.50	1	2	C1	C2	C3	2.1	2.2	2.3	3.1	3.2	3.3	4.1	4.2	4.3
C	B	0	0.25	0.50	1	2	C1	C2	C3	2.1	2.2	2.3	3.1	3.2	3.3	4.1	4.2	4.3
D	B	0	0.25	0.50	1	2	C1	C2	C3	2.1	2.2	2.3	3.1	3.2	3.3	4.1	4.2	4.3
E	5.1	5.2	5.3	6.1	6.2	6.3												
F	5.1	5.2	5.3	6.1	6.2	6.3												
G	5.1	5.2	5.3	6.1	6.2	6.3												
H	5.1	5.2	5.3	6.1	6.2	6.3												

A	B	0	0.25	0.50	1	2	C4	C5	C6	2.4	2.5	2.6	3.4	3.5	3.6	4.4	4.5	4.6
B	B	0	0.25	0.50	1	2	C4	C5	C6	2.4	2.5	2.6	3.4	3.5	3.6	4.4	4.5	4.6
C	B	0	0.25	0.50	1	2	C4	C5	C6	2.4	2.5	2.6	3.4	3.5	3.6	4.4	4.5	4.6
D	B	0	0.25	0.50	1	2	C4	C5	C6	2.4	2.5	2.6	3.4	3.5	3.6	4.4	4.5	4.6
E	5.4	5.5	5.6	6.4	6.5	6.6												
F	5.4	5.5	5.6	6.4	6.5	6.6												
G	5.4	5.5	5.6	6.4	6.5	6.6												
H	5.4	5.5	5.6	6.4	6.5	6.6												

* Finalment es van fer 2 rèpliques per cada replicat. La rèplica C6 i 2.6 no es van fer per falta de mostra.

9. Es va mesurar l'absorbància de les dues plaques a 586 nm i es va calcular la mitjana de l'absorbància d'entre les dues rèpliques de cada replicat.

10. Finalment es va calcular la quantitat de TMP equivalent en uM mitjançant la extrapolació de l'equació de la recta dels estàndards de TMP:

$$Y = mx + b \rightarrow x \text{ (uM)} = (Y - b) / m$$

A on:

m = pendent de la recta

b = terme independent (intersecció amb l'eix Y)

Y = absorbància (en nm)

x = quantitat de TMP equivalent en uM

Quantificació de l'activitat de Catalasa – Aebi (1974) & Beutler 1975

La Catalasa és un enzim amb capacitat per trencar la molècula de H₂O₂ per formar H₂O + O₂. L'assaig de quantificació de l'activitat de Catalasa permet observar el consum de H₂O₂ que presenta una absorbància a 240 nm al llarg d'1 minut.

1. Primerament, totes les mostres van ser diluïdes a una concentració de proteïna 0.5 mg/ml amb *homogenization buffer* (*Phosphate buffer* 100 mM; pH=7,4; 4°C; 150 ml KCl i 1 mM EDTA) i mantingudes en gel.

2. El H₂O₂ 150 mM va ser preparat dissolent 255 µl de H₂O₂ 30% en 15 ml de *phosphate buffer* 80 mM; pH=6,5 (a temperatura ambient).

3. La reacció va estar preparada de la següent manera:

3.1. Es van afegir 640 µl de *phosphate buffer* 80 mM; pH=6,5 en una cuveta.

3.2. Es van afegir 350 µl de H₂O₂ 150 mM.

3.3. Es van afegir 10 µl de mostra.

3.4. La cuveta va ser agitada 3 vegades abans de mesurar l'absorbància.

3.5. Per últim es procedia a mesurar l'absorbància a 240 nm durant 1 minut amb l'ajuda d'un espectrofotòmetre.

**Es van realitzar mínim 2 rèpliques per cada mostra o replicat.

**El blanc es va fer amb 10 µl de *homogenization buffer*.

** El volum de la reacció final va ser de 1 ml i el volum de mostra afegida constava de 10 µl.

4. A continuació, totes les mostres van ser diluïdes a 0.1 mg/ml de proteïna per a quantificar-la mitjançant el mètode de Bradford. Per diluir les mostres es van agafar 50 µl de cada una i es van introduir en nous tubs *ependorf* amb 200 µl de H₂O milli-Q (5 vegades diluïdes).

Lactate dehydrogenase (LDH)

L'LDH és un enzim que és capaç de reduir la molècula de piruvat per transformar-la en lactat mitjançant l'ús del coenzim NADH. Aquest assaig es basa en la monitorització de l'oxidació del coenzim NADH que presenta una absorbància a uns 340 nm i que és relacionat amb la quantificació de l'activitat de l'enzim LDH.

1. Primerament totes les mostres van ser diluïdes a una concentració de proteïna de 0.5 mg/ml amb *homogenization buffer* (*phosphate buffer* 100 mM; pH=7,4; 4°C; 150 ml KCl i 1 mM EDTA) i mantingudes en gel.

2. A continuació es va preparar la solució de piruvat 7,08 mM de la següent manera:

3 blancs + 34 mostres = 37 mostres x 3 rèpliques x 50 µl = 5.500 µl = 5,5 ml aprox. 7 ml de solució.

Es van dissoldre 5,45 mg de piruvat en 7 ml de *phosphate buffer* 100 mM.

3. El NADH 0,27 mM *Reaction Mixture* es va preparar per a 3 grups de mostres on a cada grup de mostres constava de:

1 blanc + 12 mostres = 13 mostres x 3 rèpliques x 200 µl = 7.800 µl = 7,8 ml aprox. 9 ml de solució.

Es van afegir 486 µl de NADH en 8,515 ml de *phosphate buffer* 100 mM **x 3 (per a cada grup de mostres)**

4. Les plaques per a cada grup de mostres van ser preparades de la següent manera:

A cada pou s'hi van afegir:

25 µl de mostra + 25 µl de *phosphate buffer* 100 mM

200 µl de NADH *Reaction Mixture* 0,27 mM

50 µl de piruvat 7,08 mM

** En aquest mateix ordre donat que el piruvat que actua com a substrat comença la reacció.

** Els blancs es van fer amb *homogenization buffer* .

** El volum de mostra afegida és de 25 µl mentre que el volum de reacció és de 300 µl.

A	C1	C2	2.1	2.2	3.1	3.2	4.1	4.2	5.1	5.2	6.1	6.2
B	C1	C2	2.1	2.2	3.1	3.2	4.1	4.2	5.1	5.2	6.1	6.2
C	C1	C2	2.1	2.2	3.1	3.2	4.1	4.2	5.1	5.2	6.1	6.2
D	Blanc	Blanc	Blanc									

A	C3	C4	2.3	2.4	3.3	3.4	4.3	4.4	5.3	5.4	5.5	5.6
B	C3	C4	2.3	2.4	3.3	3.4	4.3	4.4	5.3	5.4	5.5	5.6
C	C3	C4	2.3	2.4	3.3	3.4	4.3	4.4	5.3	5.4	5.5	5.6
D	Blanc	Blanc	Blanc									

A	C5	2.5	3.5	3.6	4.5	4.6	5.5	5.6	6.5	6.6
B	C5	2.5	3.5	3.6	4.5	4.6	5.5	5.6	6.5	6.6
C	C5	2.5	3.5	3.6	4.5	4.6	5.5	5.6	6.5	6.6
D	Blanc	Blanc	Blanc							

5. Es va mesurar l'absorbància de les plaques a 340 nm, a 25°C durant 5 minuts.

6. Finalment es van diluir les mostres a 0.1 mg/ml de proteïna per a quantificar-la mitjançant el mètode de Bradford. Per diluir les mostres es van agafar 50 µl de cada una i es van introduir en nous tubs *eppendorf* amb 200 µl de H₂O milli-Q (5 vegades diluïdes).

Quantificació de l'activitat de Glutaciona-S-Transferasa (GST) – Habig & Jakoby 1981

La glutaciona-S-transferasa es troba involucrada en la segona fase dels processos de biotransformacions de xenobiòtics, mitjançant la seva unió amb els productes resultants de la primera fase d'aquests processos, i transformant-los en molècules molt més hidrofíliques, facilitant a les cèl·lules l'eliminació dels xenobiòtics. La glutaciona-S-transferasa reacciona en aquest assaig amb el 1-cloro-2,4-dinitrobenzè (CDNB) formant S-2,4-dinitrofenilglutaciona que absorbeix a 340 nm i que la reacció es monitoritza mitjançant l'increment en l'absorbància.

1. Primerament totes les mostres van ser diluïdes a una concentració de proteïna de 0.5 mg/ml amb *homogenization buffer* (*phosphate buffer* 100 mM; pH=7,4; 4°C; 150 mM KCl i 1 mM EDTA) i mantingudes en gel (ja diluïdes per a la LDH)

2. A continuació es va preparar la *Reaction Mixture* de GSH 20 mM + CDNB 20 mM:

2.1. Primer es van preparar uns 3 ml de GSH 20 mM: Es van dissoldre 18,6 mg de GSH en 3 ml de *phosphate buffer* 100 mM.

2.2. Després es van preparar uns 3 ml de CDNB 20 mM: Es van dissoldre 12,15 mg de CDNB en 3 ml de *phosphate buffer* 100 mM.

2.3. Per últim es va preparar la *Reaction Mixture* per a 3 grups de mostres on cada grup constava de:

1 blanc + 12 mostres = 13 mostres x 3 rèpliques x 200 µl = 7.800 µl = 7,8 ml aprox. 9 ml de solució.

Es van afegir 675 µl de GSH + 675 µl de CDNB en 7,65 ml de *phosphate buffer* 100 mM.

3. Les plaques per a cada grup de mostres van ser preparades de la següent manera:

A cada pou s'hi van afegir:

40 µl de mostra

60 µl de *phosphate buffer* 100 mM

200 µl de *Reaction Mixture*

**El blanc es va fer amb *homogenization buffer* .

**El volum de mostra va ser de 40 µl mentre que el volum de la reacció era de 300 µl.

A	C1	C2	2.1	2.2	3.1	3.2	4.1	4.2	5.1	5.2	6.1	6.2
B	C1	C2	2.1	2.2	3.1	3.2	4.1	4.2	5.1	5.2	6.1	6.2
C	C1	C2	2.1	2.2	3.1	3.2	4.1	4.2	5.1	5.2	6.1	6.2
D	Blanc	Blanc	Blanc									

A	C3	C4	2.3	2.4	3.3	3.4	4.3	4.4	5.3	5.4	5.5	5.6
B	C3	C4	2.3	2.4	3.3	3.4	4.3	4.4	5.3	5.4	5.5	5.6
C	C3	C4	2.3	2.4	3.3	3.4	4.3	4.4	5.3	5.4	5.5	5.6
D	Blanc	Blanc	Blanc									

A	C5	2.5	3.5	3.6	4.5	4.6	5.5	5.6	6.5	6.6
B	C5	2.5	3.5	3.6	4.5	4.6	5.5	5.6	6.5	6.6
C	C5	2.5	3.5	3.6	4.5	4.6	5.5	5.6	6.5	6.6
D	Blanc	Blanc	Blanc							

4. L'absorbància de les plaques va ser mesurada a 340 nm a 25°C durant 5 minuts.

5. Finalment es van diluir les mostres a 0.1 mg/ml de proteïna per a quantificar-la mitjançant el mètode de Bradford. Per diluir les mostres es van agafar 50 µl de cada una i es van introduir en nous tubs *ependorf* amb 200 µl de H₂O milli-Q (5 vegades diluïdes i ja diluïdes per a la LDH).

Taula de dades dels 5 biomarcadors analitzats:

Mostres	MDA equiv. (nmol/g ww)	Activitat de CAT (nmol/min/mg proteïna)	Activitat de la SOD (U/mg de proteïna)	Activitat del LDH (nmol/min/mg proteïna)	Activitat de GST (nmol/min/mg proteïna)
C1	2,641	316,314	3,272	74,950	55,848
C2		407,841	7,454	134,630	80,034
C3	4,500	587,295		122,147	62,736
C4	7,984	485,552	6,528	218,840	110,223
C5	5,941	498,244		176,127	116,193
2,1	4,212	414,549	4,740	101,405	60,291
2,2	2,640	488,381	5,783	73,530	59,452
2,3	7,990	460,359	3,602	223,893	109,419
2,4	7,591	398,817		310,053	138,619
2,5	2,719	386,330	5,226	111,568	89,369
3,1	2,719	361,960	3,441	121,133	69,721
3,2	3,500	507,792		185,085	100,184
3,3		410,464		118,132	83,720
3,4		418,014	6,304	201,680	128,842
3,5	5,627	433,419		88,743	70,927
3,6	9,792	367,781	9,373	120,870	149,127

4,1		360,096	2,677	143,822	35,972
4,2	6,567	435,364		162,6	77,822
4,3	6,262	423,585	2,924	254,265	101,218
4,4	6,413	357,228	2,713	189,527	114,169
4,5	8,377	384,155	10,857	193,892	145,113
4,6	6,963	215,908		53,183	101,675
5,1	6,648	212,969	2,484	55,887	57,186
5,2	6,253	186,070		64,795	78,056
5,3	8,224	367,709	1,919	160,96	87,360
5,4	6,648	352,391	1,371	230,86	136,779
5,5	10,185	477,866	1,600	119,662	115,853
5,6	5,875	446,355	1,829	71,693	108,241
6,1			3,959	174,526	87,448
6,2	6,171		4,684	137,445	95,973
6,3	9,622	380,587	2,502	154,383	81,393
6,4	9,792	434,957	1,186	179,124	104,134
6,5	10,185	459,366	8,445	236,297	125,233
6,6	8,220	369,105		170,585	86,391