



DIALDEHIDA MALONICĂ – UN POTENȚIAL MARCHER AL TOXICITĂȚII NANOPARTICULELOR ÎN MEDIUL ACVATIC

Liliana CEPUI, Ludmila RUDI, Tatiana CHIRIAC, Vera MISCU, Valeriu RUDIC

Institutul de Microbiologie și Biotehnologie, Chișinău, Republica Moldova

Author corespondent: Liliana Cepoi, e-mail: lilianacepoi@yahoo.com

DOI: 10.5281/zenodo.3701197

CZU: 547.441:615.9:582.273

Key words: nanoparticles, toxicity tests, malondialdehyde, *Porphyridium cruentum*.

Cuvinte cheie: nanoparticule, teste de toxicitate, dialdehidă malonică, *Porphyridium cruentum*.

MALONDIALDEHYDE – A POTENTIAL MARKER OF NANOPARTICLE TOXICITY IN AN AQUATIC ENVIRONMENT

Introduction. As a result of increased production and spread in the environment, nanoparticles can pose a significant risk to public health. To date, the toxicity data of nanoparticles collected, using traditional models and methods, are contradictory and inconsistent. Highlighting the significant methods and markers of nanoparticle toxicity is a current research direction.

Material and methods. The strain of red microalgae *Porphyridium cruentum* CNM-AR-01, known as a lipid manufacturer, was used as object of study. The toxic effect of CdSe (3-7 nm), ZnSe (40 nm) and ZnS (30-35 nm) nanoparticles was tested. The amount of malondialdehyde was determined based on thiobarbituric acid reactive substances.

Results. A close correlation between the amount of biomass and malondialdehyde in the cells of red microalgae *Porphyridium cruentum* has been established for nanoparticle concentration ranges which have a toxic effect on *Porphyridium cruentum*.

Conclusions. Malondialdehyde can be considered as a marker of nanoparticle toxicity.

Introducere. Nanoparticulele pot prezenta un real pericol pentru sănătatea publică, ca urmare a creșterii producției și a răspândirii lor în mediu. Până în prezent, datele de toxicitate a nanoparticulelor, colectate cu ajutorul modelelor și al metodelor tradiționale, sunt contradictorii și inconsistente. Relevarea metodelor și a markerilor semnificativi ai toxicității nanoparticulelor constituie o direcție de actualitate în domeniul cercetărilor.

Material și metode. Ca obiect de studiu a servit tulpina microalgei roșii *Porphyridium cruentum* CNM-AR-01, cunoscută în calitate de producător de lipide. A fost testat efectul toxic al nanoparticulelor de CdSe (3-7 nm), ZnSe (40 nm) și ZnS (30-35 nm). Cantitatea de dialdehidă malonică a fost determinată în baza substanțelor reactive ale acidului tiobarbituric.

Rezultate. A fost stabilită relația strânsă între cantitatea de biomasă și cantitatea de dialdehidă malonică în celulele microalgei roșii *Porphyridium cruentum* pentru acele domenii de concentrații de nanoparticule, care au efect toxic asupra obiectului studiat.

Concluzii. Dialdehida malonică poate fi considerată marker al toxicității nanoparticulelor.

INTRODUCERE

Ultimele două decenii se remarcă printr-o dezvoltare vertiginoasă a nanotehnologiei – domeniu de cercetare eminentamente inedit, atât din punctul de vedere al cunoașterii fundamentale, cât și din cel al aplicărilor practice, având înregistrate la activ succese spectaculoase. De exemplu, s-au obținut unele nanometrială cu proprietăți deosebite: nanotuburi de carbon, fulerene, puncte cuantice, dendrimere, nanoparticule ale diferiților oxizi metalici, nanoparticule ceramice, nanoparticule polimerice etc. (1). Pe lângă domeniile tradiționale de utilizare, cum ar fi: electronica, optoelectronica, nanotehnologia, nanoproductele s-au afirmat în medicina practică și în produsele farmaceutice, contribuind semnificativ la ameliorarea sănătății oamenilor, dar și la înțelegerea proceselor biologice în celulele sănătoase și în cele afectate. Dezvoltarea nanotehnologiei a influențat inclusiv asupra producerii de medicamente principial noi (mai eficiente și cu efecte secundare minime) și asupra elaborării de noi metode de diagnostic precoce și de tratament al maladiilor grave, cum ar fi: cancerul, diabetul zaharat, maladiile neurodegenerative etc. (2-4).

Creșterea producției de nanoparticule și răspândirea lor în mediu pot prezenta un risc semnificativ pentru sănătatea publică. În urma activității fiziologice înalte și a diversității căilor de pătrundere în organism (prin inhalare, administrare orală, transdermic, prin injectare), efectele nanoparticulelor se pot amplifica enorm. Afară de eficiență terapeutică, nanoparticulele pot prezenta un nivel sporit de toxicitate pentru sistemele biologice. În scopul anticipării și al contracarării efectelor negative ale nanoparticulelor pentru om, este necesar un studiu prealabil, care ar demonstra efectele impuse de nanomaterialele străine în organism (5).

Studiile de acest tip cel mai des sunt efectuate pe culturi celulare și pe obiecte-model, printre care microorganismele se regăsesc destul de rar. Investigațiile ce țin de domeniul interacțiunii nanomaterialelor cu microorganismele au în vizor studiul formării sistemelor hibride, în scopul obținerii vectorilor pentru preparatele medicamentoase și a dispozitivelor microelectronice, precum și pentru efectuarea imobilizării dirijate a nanomaterialelor pe celulele microbiene (6, 7, 8). În majoritatea lucrărilor de acest fel, celulele vii nu sunt apreciate ca sisteme vii funcționale, motiv pentru care va apărea, în mod evident, problema influen-

ței nanoparticulelor asupra activității sistemelor vitale ale celulei, care pot reacționa diferit la prezența xenoparticulelor.

Sistemele hibride nanomateriale – microorganisme oferă posibilitatea de a efectua un studiu perfect al toxicității nanoparticulelor asupra organismului, dar și al posibilelor efecte benefice ale lor. Microorganismele acvatice, printre care cianobacteriile și microalgele, se prezintă ca obiecte de studiu foarte comode și reprezentative, oferind facilități enorme în modelarea diferitelor efecte și în stabilirea mecanismelor de acțiune a diferiților compuși asupra proceselor vitale în celulele vii.

Afară de obiectele de studiu, o importanță majoră pentru testele de toxicitate o au și metodele aplicate. Metodele de testare a efectelor toxice ale nanoparticulelor asupra diferitelor tipuri de celule sunt foarte diverse – de la determinarea lactat dehidrogenazei (LDH), care semnalizează apoptoza, până la detectarea stresului oxidativ. Ele furnizează informații valoroase pentru identificarea biomarkerilor, care relevă daunele induse de nanoparticule (9).

În studiile de toxicitate a nanomaterialelor sunt foarte răspândite testele bazate pe aplicarea tetrazoliumului (testul MTT cu utilizarea 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromidului, testul MTS cu utilizarea 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfonil)-2H-tetrazoliumului și testul WST cu utilizarea uneia dintre sărurile solubile ale tetrazoliumului, de exemplu a 2-(2-metoxi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfonil)-2H-tetrazoliumului), precum și testele care evidențiază răspunsul inflamator celular, indus de nanoparticule (cuantificarea biomarkerilor inflamatori, cum ar fi IL-8, IL-6 și factorul de necroză tumorală). Diferite tipuri de culturi de celule, inclusiv linii de celule canceroase, au fost folosite ca modele de toxicitate in vitro.

Până în prezent, datele de toxicitate a nanoparticulelor, colectate cu ajutorul modelelor și al metodelor menționate mai sus, sunt contradictorii și inconsistente. Prin urmare, pe baza modelelor experimentale disponibile, poate fi dificil de a trage concluzii despre potențialul toxic al nanoparticulelor (10).

Stresul oxidativ, indus de anumite substanțe, este considerat drept un indicator sigur al toxicității acestora. Pe lângă modificarea activității enzime-

lor antioxidante, stresul oxidativ este caracterizat și prin degradarea macromoleculilor. Pentru multe nanoparticule a fost determinată creșterea dependentă de doză a gradului de deteriorare a AND-ului, a peroxidării lipidelor și a carbonilării proteinelor (5). Lipidele, ca element component esențial al membranelor biologice, care asigură nu numai funcționalitatea, dar și integritatea acestora, sunt grav afectate de factorii nocivi. Dialdehida malonică, care se formează în calitate de produs final al peroxidării lipidice, este unul dintre markerii moleculari universali ai stării de stres.

Generalizând cele expuse mai sus, relevăm scopul acestui studiu – evidențierea posibilității de aplicare a testului dialdehidei malonice în calitate de marker al toxicității nanoparticulelor pentru organisme acvatice.

MATERIAL ȘI METODE

În cercetare au fost incluse nanoparticule de CdSe, ZnSe și ZnS, care au fost sintetizate la Institutul de Inginerie Electronică și Nanotehnologii D. Ghițu. Nanoparticulele luminescente CdSe, cu dimensiunea de 3-7 nm, au fost obținute prin metoda coloidală. Nanoparticulele de ZnSe, cu dimensiunea de 40 nm și nanoparticulele de ZnS, cu dimensiunea de 30-35 nm, au fost obținute prin sinteza hidrotermală. Nanoparticulele au fost adăugate la mediul de cultivare sub formă de soluție hidrică din prima zi. Domeniul de concentrații a constituit: pentru nanoparticulele CdSe – de la 0,01 la 12,0 mg/l; pentru nanoparticulele de ZnSe – de la 0,01 la 0,6 mg/l și pentru nanoparticulele de ZnS – de la 0,01 la 8,0 mg/l.

În calitate de obiect-model a fost utilizată tulpina microalgei roșii *Porphyridium cruentum* CNM-AR-01, cunoscută în calitate de producător de lipide și, în special, de acid eicosapentaenoic (11). Microalga a fost cultivată pe mediul nutritiv mineral cu următoarea componentă: în g/l – NaCl-7,0; KCl-7,5; MgSO₄·7H₂O-1,8; Ca(NO₃)₂·4H₂O-0,15; KBr-0,05; KI-0,05; K₂HPO₄-0,2 și 1,0 ml/l soluție de microelemente, ce conține în mg/l: FeCl₃·6H₂O-2,7; NaVO₃-0,05; ZnSO₄·5H₂O-0,02; CuSO₄·5H₂O-0,05; MnSO₄·5H₂O-0,3; H₃BO₃-0,6; MoO₃-0,02, în baloane Erlenmeyer, cu volumul de lucru de 100 ml, la temperatura de 28°C, cu iluminare constantă cu fluxul de fotoni de 40,5 μM/m²s și agitare periodică. Durata cultivării a fost de 14 zile. La sfârșitul ciclului de cultivare, biomasa se separă de lichidul cultural prin centrifugare. Conținutul de biomasă

algală a fost determinat spectrofotometric conform curbei de calibrare, care reflectă dependența absorbției la 465 nm de cantitatea de biomasă.

Conținutul produselor degradării oxidative a lipidelor a fost stabilit în baza substanțelor reactive ale acidului tiobarbituric – testul dialdehidei malonice (MDA – malondialdehyde assay) (12). Concentrația dialdehidei malonice a fost calculată cu utilizarea coeficientului extincției molare a complexului dialdehidei malonice sau în % inhibiție față de proba martorului pozitiv.

REZULTATE

Unul dintre indicatorii esențiali ai adaptabilității microalgei la componenta mediului de cultivare este productivitatea, prin urmare monitorizarea acestui parametru poate servi ca factor de bază în procesul de stabilire a influenței diferiților xenobiotici, inclusiv a nanoparticulelor asupra organismului. Pentru toate tipurile de nanoparticule studiate, a fost determinat conținutul de biomasă, obținut la finele ciclului de cultivare a microalgei.

Concentrația particulelor CdSe a fost calculată în mg/l mediul de cultivare. Au fost efectuate 3 serii de experiențe, în diferite intervale de concentrații (de la 0,01 la 0,1 mg/l; de la 0,1 la 1,0 mg/l și de la 1 la 12 mg/l). În figurile 1 și 2, rezultatele conținutului de biomasă sunt prezentate în %, prin comparare cu probele control.

Concentrațiile de la 0,01 până la 0,1 mg/l au produs abateri minime de la valorile martorului, iar în cazul concentrației de 0,6 mg/l a fost observată o creștere statistic semnificativă (p<0,01) cu 20% comparativ cu martorul (fig. 1).

Concentrația de 0,09 mg/l CdSe a avut efect de reducere a productivității (cu până la 16%, p<0,05) comparativ cu martorul.

O reacție similară a culturii de *Porphyridium cruentum*, la introducerea CdSe, a fost constatată și în variantele experimentale cu aplicarea concentrațiilor de la 0,1 până la 1,0 mg/l CdSe. Conținutul de biomasă a crescut cu 18-19% la concentrația CdSe de 0,6 și 0,7 mg/l. Concentrațiile mai mici, precum și cele mai mari, s-au manifestat ca inerte, productivitatea menținându-se la nivelul probelor martor.

Pentru experiența cu utilizarea concentrațiilor mari de particule, rezultatele obținute (fig. 2) au indicat un spor al productivității cu 33,7-47,5% (p<0,001), în cazul concentrațiilor de 4,0-6,0 mg/l CdSe și cu 18% (p<0,01) pentru concentrația de

8,0 mg/l. Creșterea în continuare a concentrației CdSe în mediul de cultivare a redus drastic productivitatea: cu 37%, în cazul concentrației de 10 mg/l și cu 77,3 %, în cazul concentrației particulelor de 12 mg/l.

Concentrațiile mai înalte de CdSe în mediul de cultivare induc moartea celulelor în primele 5 zile (faza exponențială de creștere), ceea ce indică asupra implicării toxicității nanoparticulelor la acest nivel de concentrație.

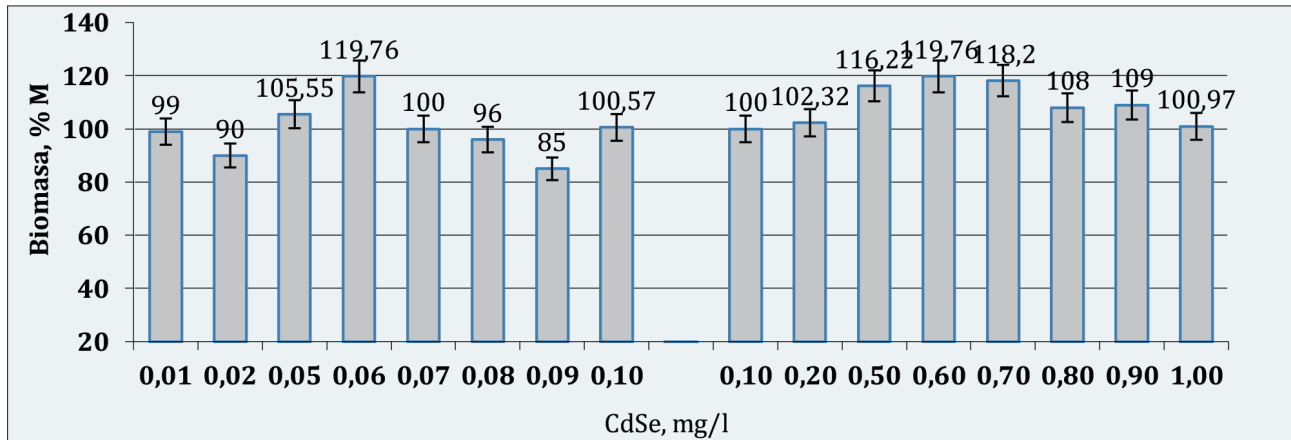


Figura 1. Biomasa *Porphyridium cruentum*, % față de proba martor (M) în prezența nanoparticulelor CdSe (0,01-0,1 mg/l; 0,1-1,0 mg/l).

Un alt compus studiat au fost particulele de ZnSe. În cadrul experiențelor preliminare, a fost stabilit că depășirea concentrației de 0,8 mg/l provoacă moartea celulelor în primele 5 zile de cultivare,

cu agregarea și sedimentarea lor. Rezultatele experiențelor cu aplicarea concentrațiilor de la 0,01 mg/l la 0,6 mg/l ZnSe sunt prezentate în Figura 3.

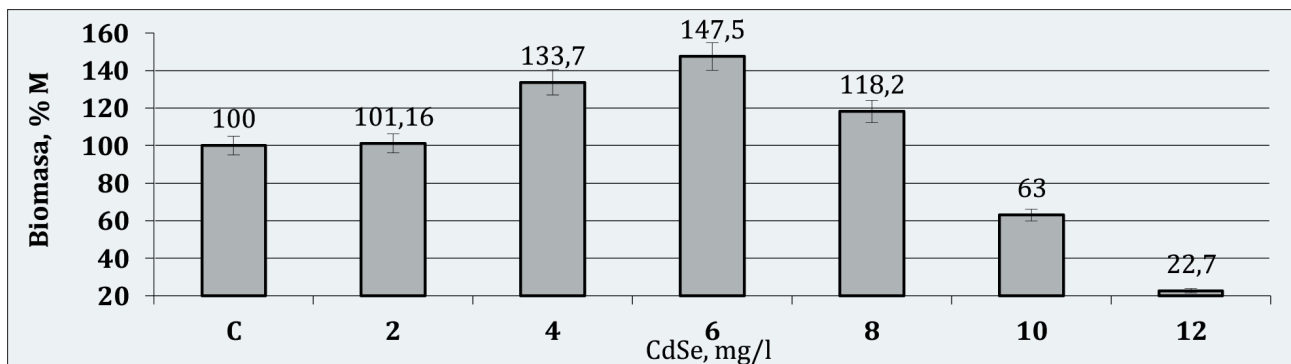


Figura 2. Biomasa *Porphyridium cruentum*, % față de proba martor (M) în prezența nanoparticulelor CdSe (2,0 - 12,0 mg/l).

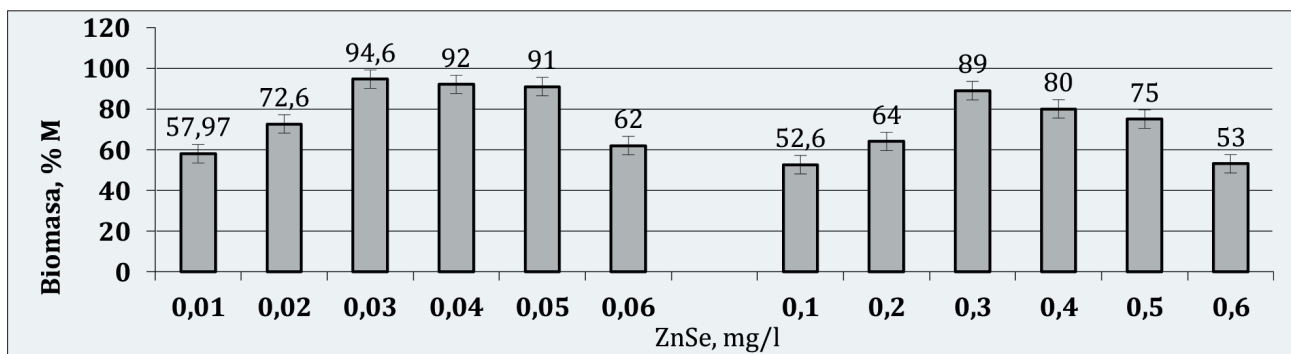


Figura 3. Biomasa *Porphyridium cruentum*, % față de proba martor (M) în prezența nanoparticulelor ZnSe (0,01-0,06 mg/l; 0,1 - 0,6 mg/l).

Rezultatele indică o reducere a productivității cu 42-28%, în comparație cu proba martor, în cazul concentrațiilor de 0,01-0,02 mg/l ZnSe și cu 47-36%, în cazul concentrațiilor de 0,1-0,2 mg/l ZnSe. Pentru concentrațiile de 0,03-0,05mg/l ZnSe productivitatea este la nivelul probelor martor (90-95%), urmată de o scădere cu 38% în varianta aplicării concentrației de 0,06 mg/l ZnSe.

În seria experimentală cu utilizarea concentrațiilor de 0,1-0,6 mg/l ZnSe, cea mai mare productivitate a fost determinată în cazul concentrației de 0,03 mg/l ZnSe, care este de 94,6% față de proba martor.

Experiențele cu adăugarea nanoparticulelor de ZnS la mediul de cultivare a microalgei *Porphyridium cruentum* au pornit de la determinarea concentrațiilor maxime toxice pentru microalge. A fost stabilit că ZnS reduce productivitatea, indiferent de concentrația utilizată, 8,0 mg/l nanoparticule generează o scădere a productivității cu 46% față de probele martor (fig. 4).

Concentrațiile mai mici au manifestat, de asemenea, un grad pronunțat de toxicitate, excepție prezentând concentrațiile de 0,03 și 0,2 mg/l, unde productivitatea a fost la nivelul probelor control.

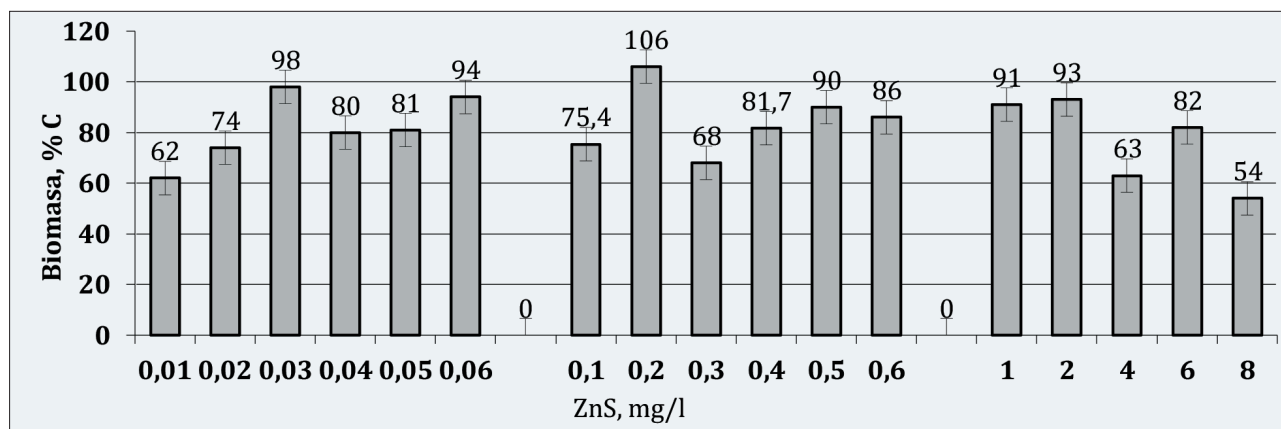


Figura 4. Biomasa *Porphyridium cruentum*, % față de proba martor (M) în prezența nanoparticulelor ZnS (0,01-0,06 mg/l; 0,1 – 0,6 mg/L; 1,0-8,0 mg/l).

Un efect de reducere a nivelului de acumulare a biomasei s-a manifestat în probele cu concentrația nanoparticulelor de 0,01 (cu 35%), 0,02 (cu 25%), 0,1 (cu 25%) și 0,3 (cu 32%).

Unul dintre cele mai semnificative teste ale evoluției stresului oxidativ în celulă este testul ne-

specific de determinare a produselor peroxidării lipidelor, testul dialdehidei malonice (MDA). Testul de acumulare a radicalilor acizilor grași indică influența negativă a condițiilor de cultivare asupra celulelor vii (fig. 5).

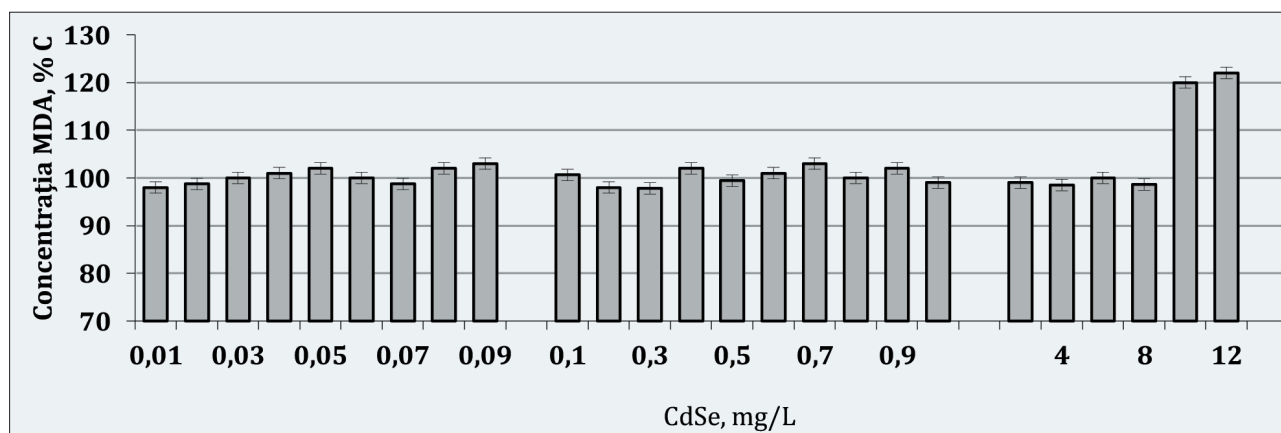


Figura 5. Dialdehida malonică, % C în biomasa de *Porphyridium cruentum* la cultivare în prezența nanoparticulelor CdSe.

Rezultatele obținute demonstrează că pentru majoritatea concentrațiilor de CdSe aplicate nu are loc afectarea structurilor membranare ale porfiridului. Prin urmare nu se produce deteriorarea statutului oxido-reducător, cu formarea radicalilor lipidelor structurale. Concentrațiile toxice ale CdSe de 10-12 mg/l au indus oxidarea lipidelor membranare. Astfel, mecanismul toxicității nanoparticulelor de CdSe se manifestă prin implicarea lor în deteriorarea structurilor membranare. Radicalii formați participă activ în pro-

cesul biosintetic al algelor, urmat de micșorarea productivității.

Determinarea produselor de oxidare a lipidelor prin testul acumulării dialdehidei malonice a scos în evidență impactul toxic al nanoparticulelor ZnSe asupra celulelor prin inducerea proceselor de oxidare a lipidelor și acumularea radicalilor acili. Rezultatele obținute (fig. 6) indică o acumulare a dialdehidei malonice în celulele de porfirid. Valorile testului MDA relevă o creștere cu 20-30%, comparativ cu proba de control.

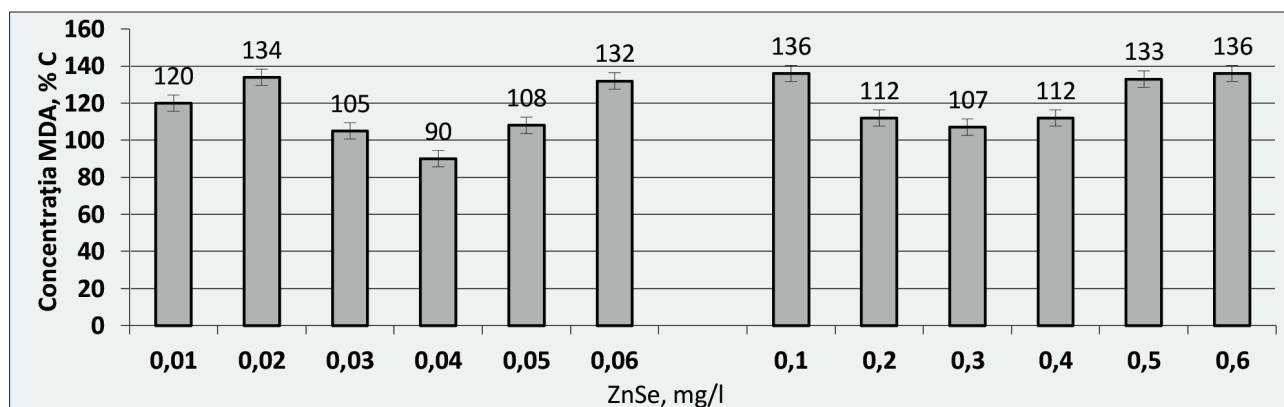


Figura 6. Dialdehida malonică, % C în biomasa de *Porphyridium cruentum* la cultivare în prezența ZnSeNP.

Prin urmare, toxicitatea nanoparticulelor ZnSe se manifestă prin implicarea lor în oxidarea lipidelor structurale ale membranelor celulare, ceea ce duce la modificarea permeabilității membranelor și la afectarea proceselor metabolice celulare.

A fost constatată, de asemenea, o majorare a conținutului dialdehidei malonice, produse în rezultatul aplicării concentrațiilor de 0,01-0,02 mg/l ZnS; 0,1 și 0,3 mg/l ZnS și 4-8 mg/l ZnS (fig. 7).

Valori mai mici ale testului MDA, comparativ cu proba de control, nu au fost determinate.

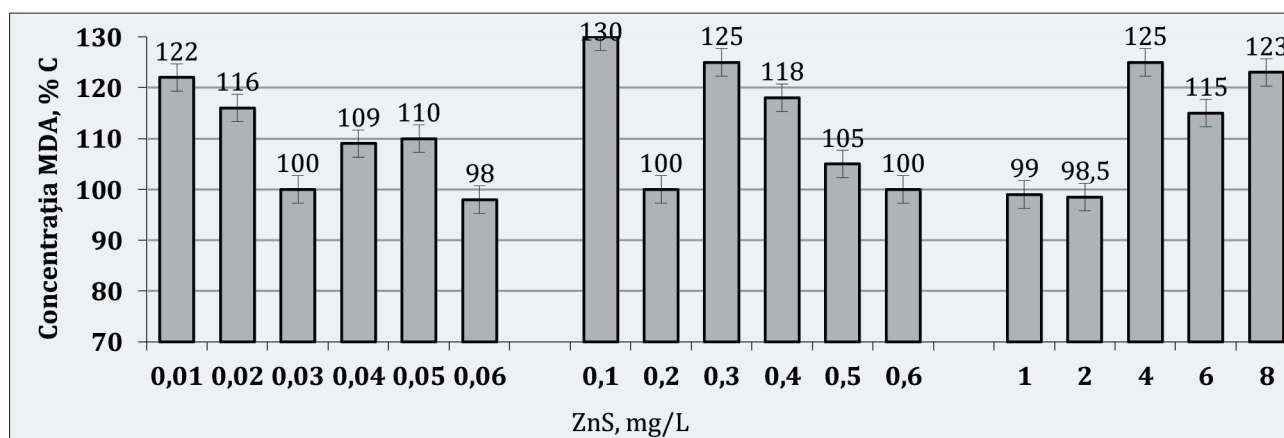


Figura 7. Dialdehida malonică, % C în biomasa de *Porphyridium cruentum* la cultivare în prezența ZnSNP.

DISCUȚII

Analizând influența pe care o are concentrația nanoparticulelor de CdSe asupra productivității culturii de *Porphyridium cruentum*, putem afirma

că dependența dată, în limitele studiate, poartă un caracter de undă, cu efecte de stimulare a producerii de biomasă la unele concentrații, urmat de

scăderi și de creșteri ulterioare, fenomen atestat destul de frecvent în lumea vie.

Productivitatea microalgei obținute, prin aplicarea nanoparticulelor de ZnS, este redusă, valorile testului MDA sunt crescute, prin urmare mecanismul acțiunii toxice este rezultatul implicării lor în activitatea biosintetică.

În scopul evaluării impactului nanoparticulelor

asupra culturii de porfiridium, a fost calculat coeficientul de corelare între productivitate și cantitatea dialdehidei malonice.

Rezultatele prezentate în Figura 8 demonstrează că, în cazul manifestării reacțiilor toxice de către *Porphyridium cruentum*, se înregistrează o corelare inversă puternică dintre conținutul de biomasă și valorile dialdehidei malonice, produsă în rezultatul peroxidării lipidelor.

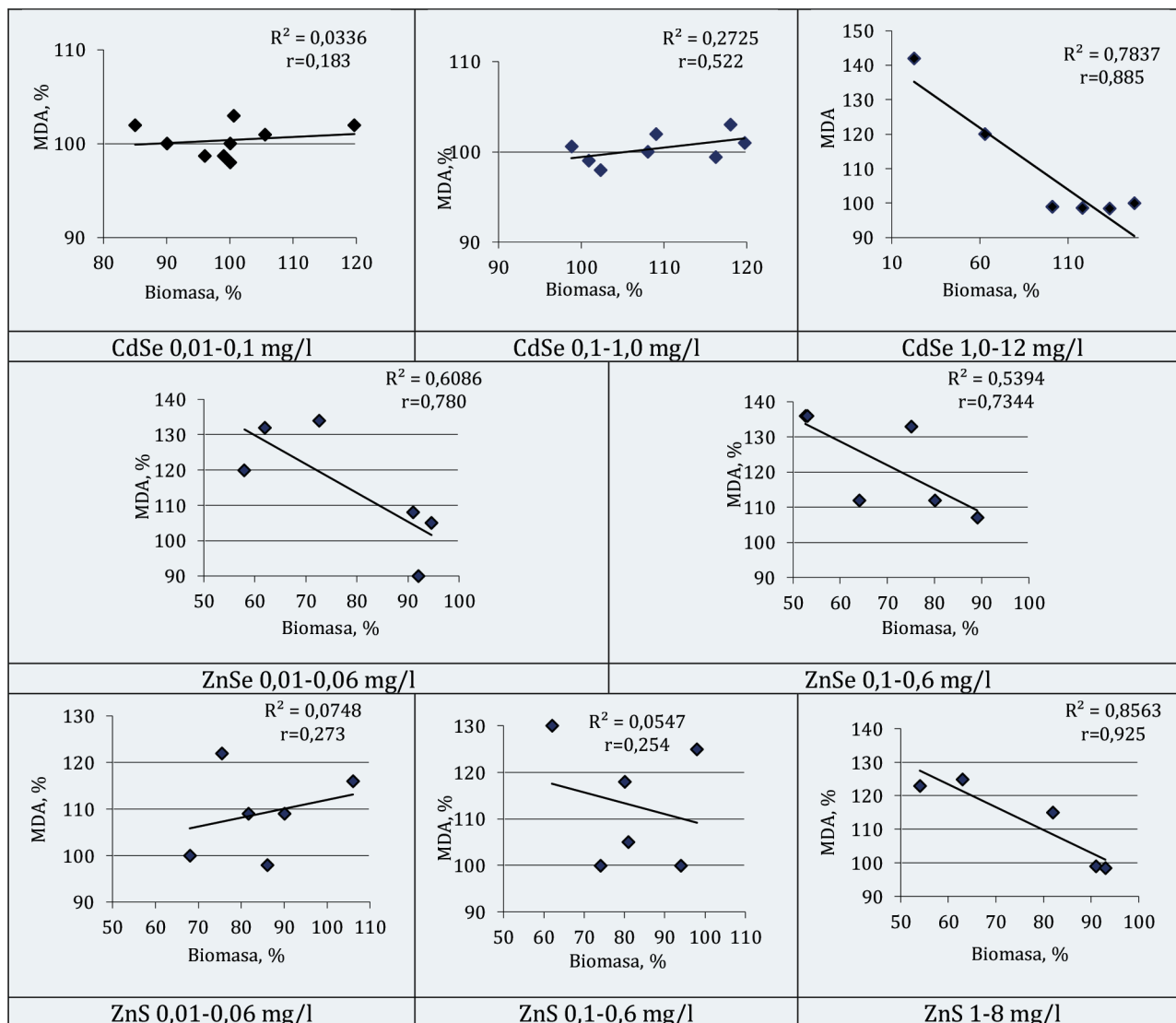


Figura 8. Corelarea între productivitatea culturii de porfiridium și procesul de peroxidare a lipidelor în biomasă la acțiunea nanoparticulelor CdSe, ZnSe și ZnS.

Au fost stabilite manifestări toxice pentru concentrațiile 1,0-12 mg/l CdSeNP, cu un coeficient de corelare $r=0,885$. Dependența corelațională este una inversă, pentru care reducerea conținutului de biomasă este asociată cu valori crescute ale dialdehidei malonice, determinate pentru concentrația nanoparticulelor de peste 8,0 mg/l. Un raport corelațional mare a fost stabilit și pentru

varianta experimentală, având concentrațiile CdSeNP între 0,1 și 1,0 mg/l. În cazul dat se observă o corelare directă, unde conținutului sporit de biomasă algală îi corespund valori joase ale testului MDA. Valorile moderat majorate ale dialdehidei malonice pot fi rezultatul unei activități biosintetice intensive, cu formare de specii reactive ale oxigenului, nefiind vorba despre manifestarea to-

xicității nanoparticulelor în concentrațiile determinate.

Coeficientul Pearson ridicat, cu valori de peste 0,7, a fost determinat în cazul aplicării nanoparticulelor ZnSe. Raportul corelațional este puternic și invers, reducerea conținutului de biomasă fiind asociată cu valori crescute ale dialdehidei malonice. Putem confirma existența efectului toxic al nanoparticulelor ZnSe, în limita concentrațiilor aplicate asupra microalgei.

Manifestări toxice au fost determinate pentru concentrațiile 1,0-8,0 mg/l ZnS NP, având coeficientul

de corelare $r=0,925$ foarte puternic. Dependența corelațională este una inversă, pentru care biomasă redusă este asociată cu valori ridicate ale dialdehidei malonice. Coeficientul de corelare mic $r=0,273$ a fost stabilit pentru concentrațiile 0,01-0,06 mg/l și $r=0,254$, pentru concentrațiile de 0,1-0,6 mg/l a nanoparticulelor de ZnS. În cazul concentrațiilor 0,1-0,6 mg/l ZnS se stabilește corelarea inversă, astfel că putem releva manifestarea efectului toxic al nanoparticulelor în limita concentrațiilor date, ceea ce nu a fost stabilit pentru seria experimentală având concentrațiile de 0,01-0,06 mg/l ZnS NP.

CONCLUZII

1. Dialdehida malonică poate fi considerată drept marker al toxicității nanoparticulelor. Metoda nespecifică de determinare a procesului de peroxidare a lipidelor structurale permite a stabili efectul toxic al nanoparticulelor studiate, în cazul existenței unei corelări dintre cantitatea de dialdehidă malonică și biomasă acumulată.
2. Toxicitatea tipurilor de particule menționate descrește în șirul ZnSe > ZnS > CdSe.
3. Nivelul înalt de corelare între cantitatea de biomasă și produsele degradării oxidative a lipidelor evidențiază mecanismul acestei influențe, care constă în degradarea membranelor biologice, în modificarea permeabilității și în dereglarea proceselor vitale.

REFERINȚE

1. Khan I, Saeed K, Khan I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arab J Chem.* 2019; 12(7):908-931.
2. Wang EC, Wang AZ. Nanoparticles and their applications in cell and molecular biology. *Integr Biol (Camb).* 2014; 6(1):9-26.
3. Blasiak B, van Veggel FCJM, Tomanek B. Applications of Nanoparticles for MRI Cancer Diagnosis and Therapy. *J Nanomater* 2013, Article ID 148578, doi: org/10.1155/2013/148578.
4. Prasad M, Lambe UP, Brar B, Shah IJM, Ranjan K, Prasad G. Nanotherapeutics: An insight into healthcare and multi-dimensional applications in medical sector of the modern world. *Biomed Pharmacother.* 2018; 97:1521-1537.
5. Dubey A, Goswami M, Yadav K, Chaudhary D. Oxidative Stress and Nano-Toxicity Induced by TiO₂ and ZnO on WAG Cell Line. In Vitro Toxicity Evaluation of Metallic Nanoparticles. *PLoS ONE.* 2015; 10(5). doi.org/10.1371/journal.pone.0127493.
6. Ma J, Wong H, Kong LB, Peng KW. Biomimetic processing of Nanocrystallite bioactive apatite coating on titanium. *Nanotechnology.* 2003; 14:619-623.
7. De la Isla A, Brostow W, Bujard B, Estevez M, Rodriguez JR, Vargas S, et al. Nanohybrid scratch resistant coating for teeth and bone viscoelasticity manifested in tribology. *Mat Resr Innovat.* 2003; 7:110-114.
8. Parak WJ, Boudreau R, Gros ML, Gerion D, Zanchet D, Micheel CM, et al. Cell motility and metastatic potential studies based on quantum dot imaging of phagokinetic tracks. *Adv Mater.* 2002; 14:882-885.
9. Savage DT, Hilt JZ, Dziubla TD. In vitro methods for assessing nanoparticle toxicity. *Methods in Molecular Biology.* 2019; 1894:1-29.
10. Bahadar H, Maqbool F, Niaz K, Abdollahi M. Toxicity of nanoparticles and an overview of current experimental models. *Iran Biomed J.* 2016; 20(1):1-11.
11. Reboloso MM, Fuentes GG, Acien Fernández JA, Sánchez Pérez JL, Guil G. Biomass nutrient profiles of the microalga *Porphyridium cruentum*. *Food Chemistry,* 2000; 70(3): 345-353.
12. Hodges DM, DeLong JM, Forney F, Prange RK. Improved thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta.* 1999; 207:604-611.

Data recepționării manuscrisului: 31/01/2020

Data acceptării spre publicare: 02/03/2020

Liliana CEPOI, ORCID 0000-0002-7516-948X, Web of Science Researcher ID 55246094000, SCOPUS Author ID J-9640-2019

Ludmila RUDI, ORCID 0000-0002-0752-8153, SCOPUS Author ID 55681134100

Tatiana CHIRIAC, ORCID 0000-0003-2933-0751, SCOPUS Author ID 38861074900

Vera MISCU, SCOPUS Author ID 55681768700

Valeriu RUDIC, ORCID 0000-0001-8090-3004, SCOPUS Author ID 6508235623