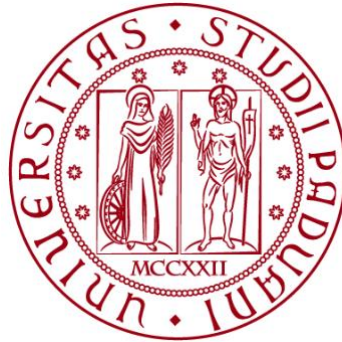


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biologia Molecolare



ELABORATO DI LAUREA

**Attività antibatterica di nanoparticelle d'argento
biogeniche e di citotossicità in cellule umane di
epatocarcinoma (Huh-7)**

**Tutor: Prof.ssa Maddalena Mognato
Dipartimento di Biologia**

Laureanda: Giulia Angelica Battistello

ANNO ACCADEMICO 2023/2024

INDICE

ABSTRACT

INTRODUZIONE	1
1.1. Nanoparticelle d'argento (AgNPs)	1
1.2. Green Nanotechnology	1
1.3. Potenziale antimicrobico	3
1.4. Carcinoma epatocellulare (HCC) e potenziale antitumorale	4
MATERIALI E METODI	5
2.1. Biosintesi delle nanoparticelle	5
2.1.1. Caratterizzazione delle nanoparticelle	6
2.2. Attività antimicrobica delle nanoparticelle d'argento AgNP@Fo	7
2.3. Preparazione delle colture cellulari Huh-7	7
2.4 Saggio MTT	8
2.5. Saggio Calceina-AM	9
2.8. Imaging assay basato sulla vitalità cellulare live/dead	10
RISULTATI E DISCUSSIONE	11
3.1. Caratterizzazione fisico-chimica di AgNP@Fo e AgNP@OR	11
3.2. Attività antimicrobica	12
3.3. Valutazione della citotossicità di AgNP@OR e AgNP@Fo nelle cellule Huh-7	14
ESPERIENZA DI STAGE	16
BIBLIOGRAFIA	18
APPENDICE	

ABSTRACT

Attualmente le nanoparticelle d'argento (AgNPs) vengono impiegate principalmente per le loro proprietà antimicrobiche; tuttavia, è possibile osservare il loro effetto inibitorio sulla crescita e sulla proliferazione di varie cellule tumorali. Questo studio intende analizzare l'attività antibatterica di nanoparticelle d'argento biogeniche e la loro citotossicità in cellule di epatocarcinoma umano (Huh-7). La sintesi biogenica di AgNPs è stata condotta utilizzando il secretoma acquoso del fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (AgNP@Fo) e l'estratto di buccia d'arancia (AgNP@OR). Nonostante presentassero proprietà fisiche e morfologiche simili, evidenziate attraverso microscopia STEM (Scanning Transmission Electron Microscopy) e AFM (Atomic Force Microscopy), le nanoparticelle hanno dimostrato bioattività diverse. L'efficacia antimicrobica di entrambe le nanoparticelle è stata valutata rispetto diversi batteri, come *S. Aureus* ed *E. Coli*: AgNP@Fo è risultata circa dieci volte più potente di AgNP@OR. Gli effetti antitumorali sono stati dimostrati dall'MTT, confermati dal test della calceina-AM e dall'imaging a fluorescenza: AgNP@Fo ha mostrato una citotossicità 20 volte superiore rispetto ad AgNP@OR, con un valore IC₅₀ di 0,545 $\mu\text{mol L}^{-1}$. I risultati di questo lavoro stabiliscono, dunque, solide basi per la futura esplorazione delle interazioni molecolari delle nanoparticelle sintetizzate attraverso diverse vie biosintetiche, in particolare all'interno di ambienti cellulari batterici e tumorali.

INTRODUZIONE

1.1. Nanoparticelle d'argento (AgNPs)

Il campo emergente della nanotecnologia ha consentito notevoli miglioramenti nel campo della medicina. Esistono infatti prove sostanziali a sostegno dell'uso di nanoparticelle (NP) per migliorare la somministrazione di farmaci: proprietà quali dimensioni ridotte (1-100 nm), capacità di targeting, elevata capacità di carico e mantenimento del modello di rilascio forniscono un controllo più facile sui comportamenti dei farmaci una volta che entrano nel corpo del paziente, il che a sua volta si traduce in una maggiore selettività e biodisponibilità del farmaco nel sito mirato (riducendo la loro clearance renale) insieme alla riduzione degli effetti collaterali avversi. Alcuni studi dimostrano che le nanoparticelle possono attraversare le membrane cellulari e interagire anche con il sistema biologico grazie alla forte attività ossidativa: dopo aver attraversato le membrane cellulari, le AgNPs rilasciano ioni d'argento nella cellula che hanno effetti collaterali sul sistema biologico inducendo citotossicità e persino la morte della cellula. L'azione citotossica delle nanoparticelle è diventata una questione di preoccupazione per la salute umana e l'ambiente, motivo per cui sono necessarie ricerche e procedure per garantirne un utilizzo sicuro e consapevole ma, al tempo stesso, motivo di interesse nell'ambito della terapia oncologica. Oltre ad essere una La sintesi di AgNP può essere eseguita tramite due metodi, "top-down" o "bottom-up". Gli approcci top-down comportano la riduzione delle dimensioni del materiale di partenza, solitamente ottenuta tramite varie tecniche fisiche. I metodi bottom-up vengono eseguiti utilizzando agenti riducenti e di capping, che possono essere chimici o naturali (green). L'approccio prevalente per la sintesi di AgNP comporta la riduzione chimica, ottenuta riducendo un precursore d'argento con sostanze come il boridruro di sodio e la N,N-dimetilformammide.

1.2. Green Nanotechnology

La nanotecnologia verde è una sottoclasse della chimica verde, l'approccio alla sintesi dei materiali che utilizza meccanismi esistenti in natura. Ci sono molti vantaggi nell'uso di materiale vegetale come agente riducente per la sintesi di nanoparticelle d'argento; come accessibilità, economicità, efficienza energetica, ecosostenibilità e bassa tossicità. Questi metodi ecosostenibili coinvolgono microrganismi, piante e tecniche assistite da

irradiazione. Questi agenti non solo facilitano il processo di sintesi, ma forniscono anche modifiche superficiali indotte da biomolecole che possono potenzialmente migliorare le interazioni delle nanoparticelle con i sistemi biologici e producono nanoparticelle molto stabili per ulteriori utilizzi. Contrariamente ai tradizionali metodi di sintesi fisica e chimica, la sintesi verde non produce sottoprodotti tossici e non necessita di attrezzature e materiali specializzati, fornendo così un metodo ecologico con aumento della scalabilità complessiva del processo. La biosintesi delle nanoparticelle è un tipo di approccio bottom-up basato sull'ossidazione/riduzione di ioni inorganici in un sistema nanometrico in presenza di enzimi microbici o fitochimici vegetali che hanno capacità antiossidante o capacità di riduzione. Questi fitocomposti offrono la flessibilità richiesta per un migliore controllo su dimensioni e forma delle nanoparticelle e, infine, è un processo che prevede un unico passaggio, per cui vengono ridotte ulteriormente eventuali complicazioni del processo di sintesi. I parametri che devono essere considerati durante la sintesi AgNP sono pH, temperatura, durata della reazione e la proporzione di miscelazione dell'estratto biologico con AgNO_3 . Questi parametri influenzano il risultato complessivo della nanoparticella. La regolazione del pH provoca cambiamenti nel potenziale zeta ¹ delle nanoparticelle poiché la natura cationica dello ione Ag^+ tende a cambiare a causa del cambiamento nella forza ionica della soluzione. Allo stesso modo, la velocità di reazione aumenta aumentando la temperatura di reazione, che influenza anche la stabilità termica del composto riducente, influenzando così le rese. Insieme ai due parametri sopra menzionati, il tempo è direttamente proporzionale alla velocità di reazione nella maggior parte dei casi. Infine, la dimensione e la forma delle nanoparticelle dipendono dalla proporzione di miscela in cui sono stati mescolati l'estratto vegetale e AgNO_3 .

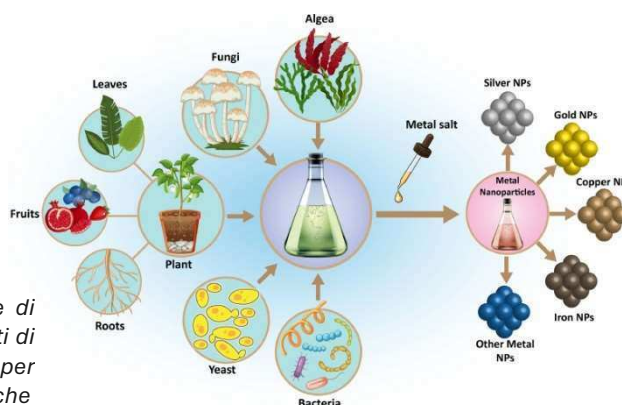


Figura 1. Diverse fonti utilizzate per la sintesi verde di nanoparticelle metalliche. Microrganismi, diverse parti di piante, funghi e alghe sono fonti biologiche applicabili per la fabbricazione di diversi tipi di nanoparticelle metalliche

¹ Il potenziale zeta è una misura della carica elettrica effettiva sulla superficie della nanoparticella, che quantifica le cariche. Quando una nanoparticella ha una carica superficiale netta, la carica viene schermata dalla concentrazione di ioni di carica opposta vicino alla superficie della nanoparticella. Questo strato di ioni con carica opposta si muove con la nanoparticella e insieme allo strato. Il potenziale zeta è una misura della differenza di potenziale tra il fluido di massa in cui è dispersa una particella e lo strato di fluido contenente gli ioni con carica opposta che è associato alla superficie della nanoparticella. Le particelle con un potenziale zeta positivo si legheranno alla superficie con carica negativa e viceversa. L'entità del potenziale zeta fornisce informazioni sulla stabilità delle particelle. Maggiore è l'entità del potenziale, maggiore è la repulsione elettrostatica e quindi maggiore è la stabilità. È importante considerare che l'entità della carica sulla superficie della nanoparticella dipende dal pH della soluzione.

1.3. Potenziale antimicrobico

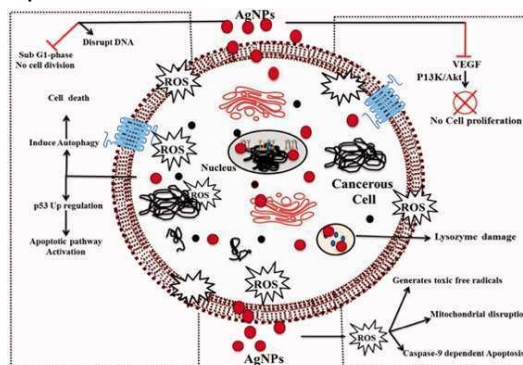
Le proprietà antibatteriche delle AgNPs sono conosciute da decenni, ma la loro caratterizzazione e quantificazione su base scientifica è iniziata recentemente. I composti d'argento sono considerati tra gli agenti antimicrobici più potenti e ad azione rapida. Gli AgNP hanno dimostrato efficacia contro microrganismi ad ampio spettro, tra cui batteri multifarmaco-resistenti e meticillino-resistenti, come lo *Staphylococcus aureus* (MRSA) che non sono controllabili dagli attuali farmaci a causa dei loro spostamenti o derive antigeniche. L'argento è stato utilizzato per molti anni come antisettico anche senza conoscerne la modalità d'azione e, attualmente, i ricercatori sono in grado di esplorare alcuni dei meccanismi attraverso i quali l'argento controlla efficacemente l'attività dei microrganismi patogeni. Attualmente, la letteratura supporta principalmente tre meccanismi che sono stati osservati insieme o separatamente, attraverso i quali le AgNP esercitano la loro azione antibatterica. Il primo postula che le AgNP agiscano a livello di membrana in quanto sono in grado di penetrare la membrana esterna, accumulandosi nella membrana interna dove l'adesione delle nanoparticelle alla cellula genera la loro destabilizzazione e danno, aumentando la permeabilità della membrana e inducendo la fuoriuscita del contenuto cellulare e successivamente la sua morte. È anche dimostrato che le AgNP possono interagire con proteine contenenti zolfo nella parete cellulare dei batteri, un'interazione che può causare danni strutturali che portano alla rottura della parete cellulare. Il secondo meccanismo propone che le nanoparticelle non solo possono rompere e attraversare la membrana cellulare, alterandone la struttura e la permeabilità, ma possono anche entrare nella cellula dove è stato suggerito che, a causa delle sue proprietà, le AgNP avranno un'affinità per interagire con gruppi di zolfo o fosforo, presenti nel contenuto intracellulare come DNA e proteine, alterandone la struttura e le funzioni. Allo stesso modo, possono alterare la catena respiratoria nella membrana interna interagendo con i gruppi tiolici negli enzimi che inducono specie reattive dell'ossigeno e radicali liberi, generando danni ai macchinari intracellulari e attivando il percorso dell'apoptosi. Un terzo meccanismo che si propone di verificarsi parallelamente agli altri due è il rilascio di ioni d'argento dalle nanoparticelle, che a causa delle loro dimensioni e carica, possono interagire con i componenti cellulari alterando i percorsi metabolici, le membrane e persino il materiale genetico. La resistenza delle nanoparticelle d'argento nei patogeni batterici Gram-positivi è elevata a causa del loro spesso strato di peptidoglicano a differenza dei batteri Gram-negativi. Quindi la concentrazione è un fattore determinante molto importante per l'efficacia delle nanoparticelle d'argento nel combattere i microrganismi.

1.4. Carcinoma epatocellulare (HCC) e potenziale antitumorale

In questo elaborato è stato valutato il potenziale antitumorale di AgNPs biogeniche nei confronti di cellule di carcinoma epatocellulare umano. Il cancro al fegato è un grave problema di salute, con oltre 850.000 casi all'anno in tutto il mondo, cifra in costante aumento. Questa neoplasia è attualmente la seconda causa di morte correlata al cancro a livello globale e, tra tutti i tumori epatici primari, il carcinoma epatocellulare (HCC) è la forma più comune, rappresentando il 90% dei casi. Vari fattori di rischio per lo sviluppo di HCC sono ben definiti, come la cirrosi (danno epatico cronico causato da fibrosi), l'infezione da virus dell'epatite B (HBV), l'infezione da virus dell'epatite C (HCV), l'abuso di alcol e la sindrome metabolica. Altri cofattori, come l'inalazione di tabacco e l'assunzione di aflatossina B1 (un cancerogeno fungino presente nelle scorte alimentari associato a mutazioni nel gene oncosoppressore TP53) sono fattori ben caratterizzati che contribuiscono all'HCC. Recenti scoperte hanno indicato l'infezione da virus adeno-associato 2 (AAV2) come una nuova causa della malattia, in particolare negli individui senza cirrosi. È stata dimostrata la prevenzione primaria dell'HCC attraverso la vaccinazione contro l'HBV. Analogamente, nei pazienti con infezione cronica, efficaci terapie antivirali contro l'HBV e l'HCV che producono risposte virologiche sostenute sono associate a una profonda diminuzione dell'incidenza dell'HCC. Le linee guida raccomandano la sorveglianza mediante ecografia ogni 6 mesi nelle popolazioni a rischio.

Di recente, sono state studiate le proprietà antitumorali delle nanoparticelle biogeniche e sono stati ottenuti risultati promettenti. Sono stati proposti diversi meccanismi per gli effetti anticancro delle AgNP. Le AgNP possono innescare apoptosi o necrosi danneggiando l'ultrastruttura delle cellule tumorali, inducendo la produzione di ROS e danni al DNA, inattivando gli enzimi e regolando i percorsi di segnalazione. Le AgNP di origine vegetale inducono generalmente specie reattive dell'ossigeno (ROS) che causano la morte cellulare. Le ROS influenzano i percorsi del processo di trasduzione del segnale che causano anche l'apoptosi cellulare. La generazione di radicali perossido (H_2O_2) altera il potenziale trans-membrana dei mitocondri causando il disaccoppiamento del processo di respirazione, determinando quindi le morti selettive delle cellule cancerose.

Figura 2. Rappresentazione schematica dei meccanismi dell'attività antitumorale di AgNPs



MATERIALI E METODI

2.1. Biosintesi delle nanoparticelle

Sono state utilizzate due tipi di nanoparticelle biogeniche, sintetizzate a partire da filtrato fungino ed estratto di buccia d'arancia. Per le prime (AgNP@Fo) è stato utilizzato il fungo *Fusarium oxysporum*, raccolto dalla radice di Musa sp. in Brasile. Dopo aver fatto crescere una cultura in piastre Petri usando un terreno di coltura di estratto di lievito 0,5%, estratto di malto 2% e agar al 2%; il terreno inoculato è stato lasciato per 7 giorni a 28°C per garantire la crescita ottimale del fungo. Al termine dell'incubazione, è stato preparato un terreno di coltura liquido da 500 mL composto da estratto di lievito allo 0,5% e estratto di malto al 2%. Circa 1 cm² del terreno solido con il fungo è stato rimosso e trasferito nel terreno liquido sterile. Il terreno di coltura da 500 mL è stato quindi incubato in uno Shaker sotto agitazione a 150 giri/min a 28 °C per 6 giorni. La biomassa ottenuta è stata filtrata con carta filtrante e lavata con acqua deionizzata, ottenendo circa 10 g di biomassa che sono stati messi in 100 mL di acqua deionizzata: questo materiale è stato poi agitato a 150 giri/min a 28 °C per 3 giorni. La soluzione con biomassa è stata quindi filtrata utilizzando un imbuto Büchner² e carta filtrante, ottenendo il filtrato fungino (FF) utilizzato per la sintesi di AgNP@Fo. Infine, è stata aggiunta una soluzione di AgNO₃ 1 mmol L⁻¹ e la miscela di reazione è stata mantenuta a 28 °C al riparo dalla luce. La formazione di AgNP@Fo è stata studiata mediante spettroscopia ultravioletta-visibile (UV-Vis) in un intervallo da 200 a 800 nm. L'estratto d'arancia per la seconda biosintesi è stato ottenuto mescolando 25 g di buccia d'arancia in 400 mL di acqua distillata. Il sistema è stato fatto bollire per 2 min e una volta raffreddato, i residui solidi sono stati rimossi dall'estratto utilizzando un imbuto Büchner e carta filtrante. Per la sintesi delle nanoparticelle, è stato utilizzato AgNO₃ 1 mmol L⁻¹ come fonte di ioni d'argento, seguito da agitazione in un agitatore orizzontale per 2 h.



Figura 3. Schema d'estrazione vegetale e della fabbricazione di NP di biosintesi. Gli estratti vegetali vengono inizialmente raccolti tramite un processo di riscaldamento. Questi estratti contengono diversi agenti riducenti, vengono utilizzati per la biosintesi

² Questo imbuto è formato da un cilindro recante sul fondo un setto forato; al di sotto di esso sta la parte conica terminante con il gambo. Il filtro, sempre circolare, viene posto sul setto poroso. Questo imbuto viene utilizzato per recuperare maggiori quantitativi di solido grazie alle maggiori dimensioni del setto forato e quindi dei filtri impiegati.

2.1.1. Caratterizzazione delle nanoparticelle

Le dimensioni delle nanoparticelle influenzano la loro bioaccumulazione e tossicità; quindi, è di grande importanza eseguire la caratterizzazione dei nanomateriali ottenuti. I diametri delle particelle, gli indici di polidispersione³ e le misurazioni del potenziale zeta sono stati determinati tramite Dynamic Light Scattering (DLS) in un'apparecchiatura Zetasizer nano-series. La risonanza plasmonica di superficie⁴ delle nanoparticelle è stata studiata utilizzando il metodo di spettroscopia UV-Vis con uno spettrofotometro Agilent HP 8453 nell'intervallo di lunghezza d'onda da 200 a 1000 nm. Le nanoparticelle plasmoniche, tra cui particelle di oro, argento e platino, sono particelle metalliche discrete che hanno proprietà ottiche uniche dovute alle loro dimensioni e forma e vengono sempre più incorporate in prodotti e tecnologie commerciali. Queste tecnologie, che spaziano da campi che vanno dal fotovoltaico ai sensori biologici e chimici, sfruttano la straordinaria efficienza delle nanoparticelle plasmoniche nell'assorbire e diffondere la luce. Inoltre, a differenza della maggior parte dei coloranti e dei pigmenti, le nanoparticelle plasmoniche hanno un colore che dipende dalle loro dimensioni e forma e possono essere regolate per ottimizzare le prestazioni per singole applicazioni senza modificare la composizione chimica del materiale: ad esempio, le nanoparticelle d'argento, in soluzione appaiono colorate in modo diverso da quelle di forma massiva, sono infatti di colore giallo chiaro. Inoltre, la morfologia e le dimensioni delle nanoparticelle d'argento sono state valutate utilizzando le tecniche di microscopia elettronica a trasmissione a scansione (STEM) e microscopia a forza atomica (AFM). Per le analisi DLS, STEM e AFM, le nanoparticelle sono state diluite in acqua MilliQ 1:10 (v/v) e filtrate utilizzando un filtro per siringa da 0,22 µm. I dati DLS sono stati acquisiti utilizzando il software Zetasizer, mentre le analisi microscopiche sono state eseguite utilizzando ImageJ.

Per la quantificazione di argento nei colloidi delle nanoparticelle d'argento, inizialmente sono state preparate soluzioni standard di Ag⁺ con concentrazioni variabili tra 1 e 15 ppm. Un volume di 1,2 mL di soluzioni standard Ag⁺ o colloidi AgNP è stato miscelato con 200 mL di una soluzione tampone NaAc/AcH (pH = 4) e 100 mL di una soluzione di 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) (10 mmol L⁻¹ in etanolo). Quando si introduce TMB

³ Misura dell'uniformità di distribuzione dei pesi molecolari in un determinato polimero. La polidispersività viene espressa tramite un indice ottenuto dal rapporto tra la massa molare media ponderale e la massa molare media numerica del polimero.

⁴ La risonanza plasmonica di superficie (SPR) è la manifestazione di un effetto di risonanza dovuto all'interazione degli elettroni di conduzione delle nanoparticelle metalliche con i fotoni incidenti. L'interazione si basa sulla dimensione e sulla forma delle nanoparticelle metalliche e sulla natura e sulla composizione del mezzo di dispersione.

e una soluzione tampone (NaAc/AcH) in una soluzione acquosa trasparente contenente Ag⁺, si verifica una trasformazione chimica, con conseguente formazione dello stato ossidato di TMB (oxTMB) e Ag(0). Queste soluzioni sono state lasciate riposare a 5 °C per 24 ore. Dopo la reazione di ossidazione di TMB da parte di ioni Ag⁺, le soluzioni sono state analizzate utilizzando uno spettrofotometro UV-Vis (picchi tipici di oxTMB, a ~655 nm).

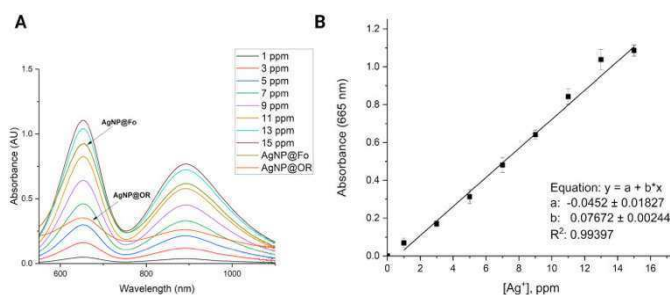


Figura 4. Determinazione della concentrazione di argento (i): (A) spettri di assorbimento degli standard di argento(i) con quantità crescenti di Ag⁺ (0–15 ppm) in presenza di TMB (10 mmol L⁻¹). (B) Relazione lineare tra la concentrazione di ioni argento (Ag⁺) in (ppm) e l'assorbanza rilevata a 665 nm

2.2. Attività antimicrobica delle nanoparticelle d'argento AgNP@Fo

I batteri sono stati ottenuti dalla Tropical Culture Collection della Fondazione Andre Tosello (Brasile) e utilizzati per determinare le concentrazioni minime inibitorie (MIC) di AgNP, che si riferiscono alle concentrazioni più basse di AgNP che limitano la crescita batterica visibile. È stata utilizzata la tecnica di diluizione della micropiastrella a 96 pozzetti per verificare l'attività antimicrobica di AgNP. Ogni piastra a 96 pozzetti è composta da 8 file verticali (da A a H) e 12 file orizzontali (da 1 a 12). La prima fila verticale è stata considerata come controllo positivo (100 mL di inoculo + 100 mL di terreno di coltura sterile) e la seconda fila verticale come controllo negativo (100 mL di terreno di coltura sterile + 100 mL di colloidali AgNP). I colloidali di AgNP sono stati diluiti in un terreno di coltura sterile, mantenendo il volume finale a 200 mL, con l'aggiunta posteriore di 50 mL della sospensione di inoculo. Il terreno di coltura utilizzato era Mueller Hinton (MH), un terreno di coltura ampiamente utilizzato per i test di sensibilità antimicrobica (AST). Le piastre sono state incubate a 35 °C per 24 ore; quindi, la lettura è stata eseguita mediante verifica visiva della torbidità. Tutti i passaggi sono stati ripetuti 3 volte per ciascun microrganismo separatamente, le tre repliche hanno contribuito ad ottenere risultati più robusti.

2.3. Preparazione delle colture cellulari Huh-7

Le cellule di epatoma umano (Huh-7, n. JCRB0403) sono state ottenute dalla Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank. Le cellule sono state

coltivate in fiasche T25 contenenti 5 mL di terreno Dulbecco's Modified Eagle's Medium Low Glucose (DMEM LG) addizionato con il 10% di siero bovino fetale e l'1% di penicillina/streptomina. Le cellule sono state mantenute in un incubatore a 37 °C, 95% di umidità e 5% di CO₂. Le cellule sono state subcoltivate come richiesto per il mantenimento quando la confluenza ha raggiunto circa l'80%. In tutti gli esperimenti, le cellule sono state coltivate per un massimo di 1 mese, dopodiché una nuova fiala di cellule Huh-7 è stata scongelata e utilizzata per 1 mese. Tutte le colture sono state determinate come prive di micoplasmi ad ogni scongelamento utilizzando il metodo di colorazione diretta del DNA e ispezionate al microscopio a fluorescenza. Si è poi proseguito con la semina delle cellule per i trattamenti con AgNP@OR e AgNP@Fo: le cellule Huh-7 sono state coltivate in piastre da 96 pozzetti a una densità di $7,5 \times 10^3$ cellule per pozzetto in terreno DMEM LG addizionato con il 10% di FBS e l'1% di Pen/Strep e incubate (37 °C e 5% di CO₂). Sono state eseguite almeno tre serie di riduzioni MTT e saggi di calceina AM in tre giorni diversi. Dopo 24 ore di piastratura cellulare, il terreno di coltura è stato rimosso e le cellule sono state incubate con 100 mL di AgNP@OR o AgNP@Fo a nove diverse concentrazioni che vanno da 0,0015 fino a 100 mmol L⁻¹. Le nanoparticelle sono state diluite in terreno DMEM a basso contenuto di glucosio privo di siero e antibiotici (di seguito denominato terreno DMEM LG non integrato). Vale la pena notare che il colloide delle nanoparticelle ha sostituito fino al 20% del terreno di coltura per evitare una diluizione eccessiva del terreno, che può influire sulla vitalità cellulare. Le cellule incubate con terreno DMEM LG non integrato sono state utilizzate come gruppo di controllo. Le cellule trattate sono state incubate per 24 ore a 37 °C in un'atmosfera al 5% di CO₂.

2.4 Saggio MTT

Il saggio MTT viene utilizzato per misurare l'attività metabolica delle cellule, che è un indicatore della proliferazione e della vitalità cellulare e della citotossicità. Questo saggio colorimetrico si basa sulla riduzione di un sale di tetrazolio giallo (bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, o MTT) a cristalli viola di formazano da parte delle cellule metabolicamente attive. Le cellule vitali contengono enzimi reduttasi NAD(P)H-dipendenti che riducono l'MTT a formazano. I cristalli insolubili di formazano vengono poi dissolti con una soluzione di solubilizzazione e la soluzione colorata risultante viene quantificata misurando l'assorbanza a 500-600 nanometri tramite uno spettrofotometro per piastre multipozzetto. Quanto più scura è la soluzione tanto maggiore sarà il numero di cellule vitali metabolicamente attive. Dopo

24 ore di esposizione delle cellule ad AgNP@OR o AgNP@Fo, 10 mL di soluzione MTT (5 mg mL⁻¹) sono stati aggiunti a tre pozzetti. Nel gruppo del bianco (blank), sono stati aggiunti 10 mL di LG-DMEM non integrato. Quindi, la piastra è stata incubata a 37 °C in un'atmosfera al 5% di CO₂ e protetta dalla luce. Dopo 2,5 ore, le soluzioni MTT e blank sono state sostituite da 100 mL di dimetilsolfossido – DMSO per solubilizzare i cristalli di formazano. Quindi, la piastra è stata tenuta in agitazione per 15 min. Successivamente, è stata eseguita la lettura dell'assorbanza (a una lunghezza d'onda di 570 nm) di ogni pozzetto (trattato con MTT e bianco) nel Cytation 5 Hybrid Multidetector Reader. I risultati sono stati estratti in fogli Excel, dove sono stati eseguiti i calcoli per ottenere la vitalità cellulare come segue:

$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{(\text{Abs of AgNP}) - (\text{Abs of blank})}{(\text{Abs of negative control}) - (\text{Abs of blank})} \times 100$$

Per il calcolo della vitalità, sono state eseguite almeno tre repliche indipendenti, ciascuna delle repliche conteneva triplicati di pozzetti (ad esempio, tre pozzetti trattati con AgNP@OR o AgNP@Fo a ciascuna delle concentrazioni della curva, tre pozzetti trattati con controllo negativo, in questo caso, terreno DMEM non integrato), tre pozzetti erano il bianco, dove ci sono cellule e trattamento, ma senza l'aggiunta di MTT. In una ripetizione indipendente, la media aritmetica dei tre pozzetti per ogni AgNP è stata utilizzata per calcolare la media aritmetica della vitalità cellulare relativa. E, la media aritmetica finale della vitalità cellulare per ogni AgNP è stata calcolata dalle tre repliche indipendenti. Quindi, i dati di vitalità cellulare calcolati e le rispettive concentrazioni di AgNP@OR e AgNP@Fo sono stati tracciati nel software GraphPad Prism 8.0.2. per eseguire il calcolo IC₅₀ tramite regressione lineare log(inibitore) vs. risposta – pendenza variabile (quattro parametri).

2.5. Saggio Calceina-AM

Dopo 24 ore di esposizione cellulare ad AgNP@OR o AgNP@Fo, i trattamenti sono stati sostituiti da 50 mL di una soluzione di calceina-AM (50 mmol L⁻¹, Invitrogen, USA) in FluoroBrite DMEM in tre pozzetti. Nel gruppo vuoto, 50 mL di FluoroBrite DMEM sono stati aggiunti agli altri tre pozzetti. Dopo 30 minuti di incubazione, l'emissione di fluorescenza della calceina ($\lambda_{\text{ex/em}} = 488/528 \text{ nm}$) è stata misurata utilizzando Cytation 5 Hybrid Multidetector Reader. I risultati

sono stati estratti in fogli Excel, dove sono stati eseguiti i calcoli per ottenere la vitalità cellulare come segue:

$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{(\text{FIAv AgNP}) - (\text{FIAv blank})}{(\text{FIAv negative control}) - (\text{FIAv blank})} \times 100$$

Per questo calcolo sono stati utilizzati:

- Media di almeno tre valori di intensità di fluorescenza della calceina (FIAv) riferiti al trattamento in triplicato con AgNP@OR o AgNP@Fo a ciascuna delle sue concentrazioni.
- FIAv del bianco (media di tre pozzetti senza aggiunta di MTT);
- FIAv del controllo negativo (cellule trattate con terreno DMEM LG non integrato).

Quindi, i dati di vitalità cellulare calcolati e le rispettive concentrazioni di AgNP@OR e AgNP@Fo sono stati tracciati nel software GraphPad Prism 8.0.2 per eseguire il calcolo IC50 tramite regressione lineare log(inibitore) vs. risposta - pendenza variabile (quattro parametri).

2.8. Imaging assay basato sulla vitalità cellulare live/dead

Oltre al saggio MTT e calceina AM, è stato eseguito un saggio basato su immagini utilizzando i coloranti – Hoechst, ioduro di propidio e calceina per valutare la vitalità cellulare. Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich®) viene utilizzato per determinare il conteggio totale delle cellule poiché lega il DNA da cellule vive o non vive. Anche lo ioduro di propidio (PI) (ThermoFisher®) lega il DNA, ma è impermeabile alle cellule sane. Pertanto, le cellule colorate con PI sono considerate cellule non vitali. La calceina-AM, quando convertita in calceina dalle esterasi intracellulari, indica cellule vitali. Dopo 24 ore di esposizione delle cellule a soluzioni AgNP@OR o AgNP@Fo, i trattamenti sono stati sostituiti da 50 mL di una soluzione contenente calceina (1: 2000, v/v), PI (1: 1000 v/v) e Hoechst (1: 1000 v/v) in FluoroBrite DMEM. Le piastre sono state incubate per 30 min a 37 °C in un'atmosfera al 5% di CO₂ e protette dalla luce. Quindi, le immagini di fluorescenza di ciascun pozzetto sono state acquisite con l'obiettivo 10× utilizzando il lettore multi-modale di immagini di Cytation 5 (Biotek Instruments, USA). I filtri utilizzati per l'imaging erano: GFP per calceina (eccitazione/emissione = 469/525 nm), filtro PI per PI (eccitazione/emissione = 531/647 nm), filtro DAPI per Hoechst (eccitazione/emissione = 377/447 nm).

RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1. Caratterizzazione fisico-chimica di AgNP@Fo e AgNP@OR

Per valutare le caratteristiche fisico-chimiche delle nanoparticelle d'argento biosintetizzate, sono stati determinati i loro raggi idrodinamici, i potenziali zeta e gli indici di polidispersità. Valutando le dimensioni delle nanoparticelle utilizzando DLS e STEM, è possibile comprendere le dimensioni delle particelle, che svolgono un ruolo cruciale nelle loro interazioni con i sistemi biologici e altri materiali. Le misurazioni del potenziale zeta forniscono informazioni sulla carica superficiale delle nanoparticelle, rivelando la presenza di gruppi funzionali che influiscono con la loro stabilità e il potenziale di aggregazione. Inoltre, la determinazione dell'indice di polidispersione fornisce informazioni sull'uniformità delle dimensioni delle particelle all'interno della soluzione, indicando il livello di omogeneità nella dispersione delle nanoparticelle. La formazione di AgNP è stata monitorata esplorando gli spettri UV-Vis. Sono state osservate le lunghezze d'onda da 350 a 500 nm, caratteristiche delle nanoparticelle d'argento. AgNP@Fo ha mostrato il massimo a 433 nm indicativo della morfologia sferica del nanomateriale. Analogamente, nel caso di AgNP@OR, è stata rilevata una risonanza plasmonica di superficie (SPR) attorno a 426 nm. Le morfologie sferiche delle nanoparticelle sono state confermate in AFM e STEM. Dopo 96 ore di biosintesi, AgNP@Fo ha mostrato una dimensione media delle nanoparticelle di $56,43 \pm 19,18$ nm, determinata utilizzando DLS, e $20,81 \pm 5,08$ nm utilizzando STEM. La differenza principale tra DLS e STEM risiede nell'approccio utilizzato per misurare la dimensione delle nanoparticelle. DLS fornisce informazioni sulla dimensione idrodinamica media delle particelle in soluzione, mentre STEM offre immagini dirette della dimensione e della forma delle singole nanoparticelle. I potenziali zeta di queste nanoparticelle, quando diluite in acqua Milli-Q a un rapporto v/v di 1:10, sono stati misurati e i valori negativi del potenziale zeta sono stati attribuiti alla presenza di gruppi carbossilati nei campioni biologici, che svolgono un ruolo nella stabilizzazione delle AgNP. Il potenziale zeta di AgNP@Fo era $-26,8 \pm 7,55$ mV. Questa stabilizzazione ha portato a un indice di polidispersione (PDI) di 0,163, indicando una dispersione relativamente omogenea delle nanoparticelle all'interno del colloide. La concentrazione di AgNP@Fo è stata quantificata come $0,401 \pm 0,099$ mmol L⁻¹ utilizzando la curva di calibrazione allineandosi strettamente con la concentrazione teoricamente prevista di 0,5 mmol L⁻¹, rientrando quindi nell'intervallo previsto. D'altra parte, le nanoparticelle AgNP@OR hanno mostrato dimensioni medie più piccole $39,97 \pm 19,72$ nm,

determinate utilizzando DLS e $11,77 \pm 1,90$ nm utilizzando STEM. Il potenziale zeta per queste nanoparticelle era $-26,2 \pm 2,87$ mV, dimostrando una carica negativa simile a quella osservata per AgNP@Fo. Il campione ha mostrato un valore PDI di 0,414, coerente con la ricerca precedente che suggerisce che gli AgNP sintetizzati da estratti di frutta e verdura mostrano spesso PDI moderati, da 0,3 a 0,5.29 Inoltre, la concentrazione di AgNP@OR è stata determinata essere $0,465 \pm 0,01$ mmol L⁻¹.

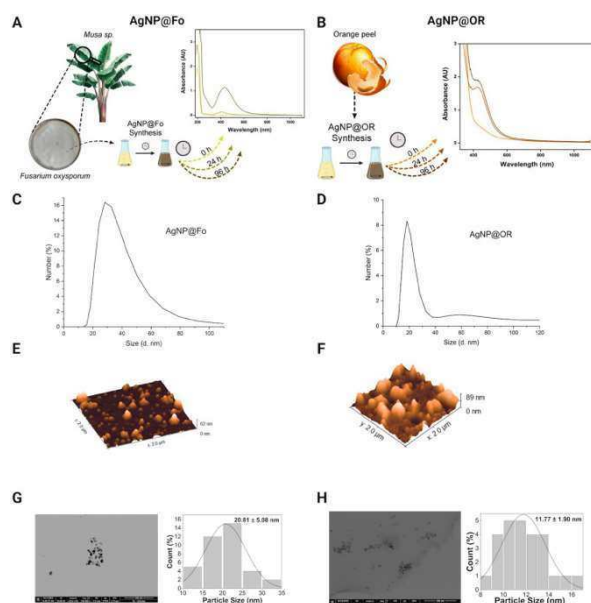


Figura 5. Caratterizzazione fisico-chimica delle nanoparticelle d'argento sintetizzate (AgNP@Fo e AgNP@OR) utilizzando diverse tecniche di caratterizzazione: (A) Assorbimento UV-Vis di nanoparticelle d'argento (AgNP@fo) a 433 nm, (B) Assorbimento UV-Vis di AgNP@OR a 426nm, (C) Grafico di diffusione dinamica della luce (DLS) di AgNP@Fo, (D) Grafico DLS di AgNP@OR, (E) Microscopia a forma atomica (AFM) di AgNP@Fo che rileva morfologia sferica, (F) AFM di AgNP@OR che mostra morfologia sferica, (G) Microscopia elettronica a scansione a trasmissione (STEM) di AgNP@Fo, (H) STEM di AgNP@OR

3.2. Attività antimicrobica

AgNP@Fo ha dimostrato un'attività antimicrobica significativa, con concentrazioni minime inibitorie (MIC) comprese tra 0,84 e 1,68 mg mL⁻¹, esibendo valori MIC inferiori per i batteri Gram-negativi. Tuttavia, AgNP@OR ha mostrato un intervallo più ampio di valori MIC, compresi tra 10,8 e 27,0 mg mL⁻¹. È interessante notare che AgNP@OR non ha mostrato alcuna attività antimicrobica contro Staphylococcus aureus nell'intervallo di concentrazione testato. Il meccanismo mediante il quale le nanoparticelle d'argento (AgNP) combattono i batteri non è attualmente pienamente compreso. Tuttavia, esistono diverse teorie che chiariscono gli effetti antibatterici delle nanoparticelle d'argento: (1) produzione di specie reattive dell'ossigeno, (2) liberazione di ioni Ag⁺ dalle AgNP che causano la denaturazione delle proteine legandosi ai gruppi sulfidrilici e (3) attaccamento delle AgNP ai batteri, con conseguente danno alle strutture batteriche. Si ritiene infatti che l'attività antimicrobica derivi dalla tendenza delle nanoparticelle a interagire con i batteri. Le AgNP si accumulano sulle superfici della membrana batterica, causando l'inibizione delle proteine cellulari, portando di conseguenza alla

morte delle cellule batteriche. In base ai valori MIC ottenuti, l'attività antimicrobica di AgNP@Fo è abbastanza promettente e mostra un potenziale antimicrobico maggiore, che può essere fino a circa 10 volte più potente, rispetto a alcuni studi pubblicati che hanno valutato le AgNP sintetizzate in condizioni diverse, apportando un contributo significativo a questo campo di studio. Utilizzando l'¹H-NMR⁵, si è potuto valutare il cambiamento nel profilo metabolico di *S. aureus* in risposta all'azione delle nanoparticelle d'argento (AgNP@Fo). Questi risultati mirano a migliorare la comprensione dell'impatto di AgNP@Fo sui batteri a livello metabolico e possono essere riprodotti per gli altri batteri testati. La sovrapposizione dei profili metabolici tra il campione di controllo (che non è stato sottoposto a trattamento con AgNP@Fo) e il campione trattato con nanoparticelle è illustrata nella Fig. 3A. Per confermare la differenza tra questi gruppi, tramite l'utilizzo di un'analisi chemiometrica, si è potuto confermare che le nanoparticelle AgNP@Fo hanno avuto un impatto significativo sul livello metabolico delle cellule batteriche. Ciò consente di identificare i metaboliti che hanno maggiormente influenzato la separazione tra i gruppi di controllo e quelli trattati con AgNP@Fo. Per valutare quali metaboliti fossero maggiormente interessati, ovvero dove vi fosse una variazione più significativa nelle concentrazioni relative, è stata condotta un'analisi t-test da cui è stata identificata una diminuzione pronunciata nelle concentrazioni di metaboliti quali fosfocolina, lattato, glicerolo e glutammato; i quali svolgono ruoli essenziali in percorsi metabolici cruciali per la sopravvivenza batterica. La varianza nel potenziale biologico osservata tra AgNP@Fo e AgNP@OR potrebbe essere collegata alle proteine secrete dal fungo *Fusarium oxysporum* e a quelle presenti nella biomassa arancione, che potenzialmente fungono da agenti sia riducenti che stabilizzanti. Comprendere il processo di ancoraggio delle proteine è fondamentale per determinare come le nanoparticelle interagiscono con il loro ambiente. Questa interazione potrebbe avere un impatto sul rilascio controllato di ioni d'argento, influenzando così l'attività antimicrobica delle nanoparticelle. Il modo in cui le proteine si legano alle nanoparticelle potrebbe non solo influenzare la stabilità delle particelle, ma anche il loro potenziale di internalizzazione da parte di microrganismi, un fattore critico per la loro efficacia antimicrobica.

⁵ La risonanza magnetica nucleare protonica è un'applicazione della risonanza magnetica nucleare alla spettroscopia NMR rispetto ai nuclei di idrogeno-1 all'interno delle molecole di una sostanza, al fine di determinare la struttura delle sue molecole.

3.3. Valutazione della citotossicità di AgNP@OR e AgNP@Fo nelle cellule Huh-7

Per ottenere informazioni sul profilo di citotossicità di AgNP@OR e AgNP@Fo, sono state utilizzate cellule Huh-7 e la concentrazione semimassimale per la vitalità cellulare (IC50) è stata determinata mediante test MTT e calceina. Le concentrazioni di trattamento di AgNP@OR e AgNP@Fo variavano da 0,0015 a 100 mmol L⁻¹. Sono stati calcolati altri parametri rilevanti, come il livello di effetto avverso non osservabile (NOAEL), la dose più alta alla quale non si osserva l'effetto dannoso e il livello di effetto avverso osservabile più basso (LOAEL), la dose più bassa alla quale si osserva l'effetto dannoso. Per il test MTT, i valori IC50 per l'esposizione di Huh-7 ad AgNP@OR e AgNP@Fo per 24 ore sono stati determinati utilizzando un modello di regressione non lineare a nove punti con il software GraphPad Prism 8.0.2. Per AgNP@OR, il NOAEL è stato calcolato essere 1,56 mmol L⁻¹, il LOAEL 6,25 mmol L⁻¹ e il valore IC50 era 7,833 mmol L⁻¹. Per AgNP@Fo, il NOAEL è stato calcolato a 0,097 mmol L⁻¹, il LOAEL a 0,39 mmol L⁻¹ e il valore IC50 era 0,545 mmol L⁻¹. Pertanto, il profilo di citotossicità determinato utilizzando il test MTT suggerisce che AgNP@Fo ha una citotossicità significativamente più elevata verso le cellule Huh-7 rispetto ad AgNP@OR. Per il test della calceina, il profilo citotossico è stato determinato utilizzando un approccio simile al test MTT; per il confronto, sono state testate le stesse concentrazioni di AgNP@OR e AgNP@Fo e sono stati determinati gli stessi parametri (Fig. 5). Per AgNP@OR, il NOAEL è stato determinato a 6,25 mmol L⁻¹, il LOAEL a 25 mmol L⁻¹ e il valore IC50 era 12,36 mmol L⁻¹. Rispetto ai valori determinati da MTT, i valori NOAEL e LOAEL erano una concentrazione testata più alti e il valore IC50 era simile. Per AgNP@Fo, il NOAEL è stato determinato essere 0,097 mmol L⁻¹, il LOAEL 0,39 mmol L⁻¹ e il valore IC50 era 0,4544 mmol L⁻¹. Rispetto ai valori determinati da MTT, i valori NOAEL e LOAEL erano gli stessi e il valore IC50 era simile. Pertanto, i risultati di MTT e calceina concordavano, suggerendo che AgNP@Fo è più citotossico di AgNP@OR, aumentando la robustezza dei risultati. Come misura alternativa e complementare della risposta citotossica, sono state utilizzate anche le immagini di fluorescenza e contrasto di fase delle cellule colorate con calceina, PI e Hoechst per monitorare la risposta tossica delle cellule Huh-7 all'esposizione ad AgNP@OR e AgNP@Fo MTT. È stato possibile dimostrare che da una concentrazione di 6,25 mmol L⁻¹ AgNP@OR, più cellule Huh-7 hanno un nucleo colorato con PI, indicando cellule non vitali, vale a dire cellule che perdono l'integrità della membrana plasmatica.

Dalla concentrazione di 6,25 mmol L⁻¹ AgNP@OR, non sono state osservate cellule colorate con calceina, vale a dire nessuna cellula vitale. Nelle

immagini a contrasto di fase, si può vedere che le cellule trattate con AgNP@OR a 6,25 e 100 mmol L⁻¹ hanno una morfologia diversa rispetto alle cellule sane trattate con il controllo negativo (terreno di coltura); sono più piccole, arrotondate e staccate. Da una concentrazione di 0,39 mmol L⁻¹ AgNP@Fo, un numero maggiore di cellule Huh-7 ha un nucleo cellulare colorato con il fluoroforo PI. Da una concentrazione di 1,56 mmol L⁻¹ AgNP@Fo, nessuna cellula è colorata con calceina, ovvero cellule vitali. Nelle immagini a contrasto di fase, le cellule trattate con concentrazioni superiori a 1,56 mol L⁻¹ AgNP@Fo mostrano una morfologia diversa rispetto alle cellule sane trattate con il controllo negativo (terreno di coltura), essendo più piccole, arrotondate e staccate dal fondo. AgNP@Fo era circa 20 volte più citotossico di AgNP@OR, ciò è stato supportato dal test MTT, dal test calceina-AM e dalle immagini di fluorescenza. Una possibile spiegazione per le differenze del profilo di citotossicità tra AgNP@OR e AgNP@Fo è una conseguenza delle proprietà fisico-chimiche delle nanoparticelle. Poiché entrambe le nanoparticelle sono molto simili per dimensioni e forma (la dimensione di AgNP@Fo è 56,43 ± 19,18 nm e la dimensione di AgNP@OR è 39,97 ± 19,72 nm, entrambe sferiche), le differenze nella citotossicità potrebbero essere dovute a modifiche superficiali di queste due particelle e alla loro interazione con le cellule Huh-7. Per comprendere appieno le ragioni di questa discrepanza nell'attività antitumorale tra le nanoparticelle, sono necessarie ulteriori indagini approfondite per identificare i composti chimici specifici presenti in ciascun tipo di nanoparticelle, nonché le loro proprietà biologiche e i meccanismi di azione. Sulla base di queste scoperte, sarà possibile sviluppare trattamenti contro il cancro più efficaci e mirati.

In sintesi, questo studio mirava a esplorare il potenziale antimicrobico e antitumorale per migliorare la nostra comprensione dell'impatto delle nanoparticelle di argento biogenico. Inoltre, apre la strada a future indagini sulle interazioni di AgNP con le cellule tumorali, ampliando così gli orizzonti per la ricerca avanzata in questo settore. Questi risultati supportano l'ipotesi che la biosintesi delle nanoparticelle d'argento determini il loro ruolo biologico. AgNP@Fo ha mostrato un'attività antimicrobica impressionante, con valori MIC circa 10 volte inferiori ad AgNP@OR. Inoltre, AgNP@Fo ha mostrato una citotossicità quasi 20 volte superiore rispetto ad AgNP@OR nelle cellule Huh-7, con un valore IC₅₀ di 0,545 mmol L⁻¹. Chiarire i meccanismi alla base di queste attività migliorerebbe senza dubbio la nostra comprensione della relazione tra proprietà fisico-chimiche e applicazioni biologiche. Questa conoscenza, insieme alla sicurezza e all'efficacia negli studi clinici, è fondamentale per migliorare lo sviluppo razionale delle applicazioni dei nanomateriali.

ESPERIENZA DI STAGE

Gli esperimenti condotti in laboratorio sono stati finalizzati alla valutazione della citotossicità da parte di nanoparticelle d'argento sintetizzate con l'utilizzo di foglie di tè nei confronti di cellule tumorali. In particolare, le cellule utilizzate per tutti gli esperimenti che ho eseguito sono le A49, cellule epiteliali tumorali, che dopo essere state scongelate sono state mantenute in colture su piastra da 25 cm² in terreno F-12K contenete FBS al 10%. Le nanoparticelle, sintetizzate a partire da foglie di tè nero, un agente riducente e stabilizzante facilmente reperibile e di basso costo, sono state mantenute in soluzione acquosa e scongelate ad ogni utilizzo, a cui è seguita la sonicazione. Le cellule invece sono state subcoltivate circa ogni 48h, in modo che fossero prelevate per gli esperimenti allo stato di semi-confluenza. Il primo saggio di citotossicità effettuato è stato il saggio clonogenico, che misura la capacità di sopravvivenza delle cellule in base al numero di cloni (di almeno 50 cellule) che si sono formati dopo semina a bassa densità. Sono state perciò fatte crescere le cellule in 2 capsule, incubando le cellule overnight in terreno contenente FBS al 3%: una per effettuare il controllo quindi priva di nanoparticelle, ed una contenete nanoparticelle a concentrazione 5ug/ml. Dopo 24 ore, le cellule cresciute nella capsula con le nanoparticelle sono state contate e in seguito seminate in piastre Petri da 5ml (circa 300 cellule/piastra): 3 repliche tecniche per ogni NP e il controllo. Dopo circa 7 giorni, le cellule sono state colorate e fissate con il Violetto di Genziana (Crystal Violet) per evidenziare i cloni e facilitarne la conta. È stato quindi effettuato il conteggio di ogni piastra e i dati sono poi stati analizzati tramite il calcolo dell'efficienza di clonaggio (E.C., %) e da questo l'indice di sopravvivenza (S: E.C. trattato/E.C. controllo moltiplicato per 100).

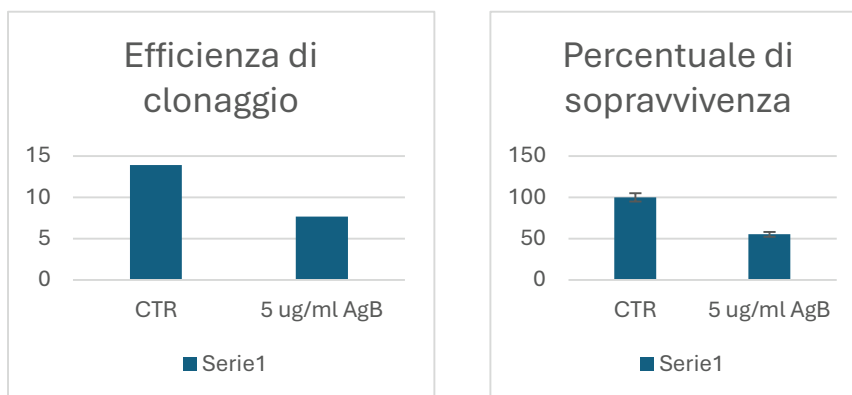


Figura 6 e Figura 7. Efficienza di clonaggio e percentuale di sopravvivenza relativi al saggio clonogenico effettuato su cellule A549 trattate con AgNP biosintetiche (24h)

Osservando i grafici, si può notare che le nanoparticelle biogeniche risultano tossiche per le cellule rispetto al controllo, in quanto presentano percentuali di sopravvivenza di valori inferiori rispetto al controllo. Tuttavia, è opportuno effettuare più repliche e analizzare come variano i dati a concentrazione di AgNPs diverse in modo da ottenere un risultato statisticamente significativo.

Ho inoltre condotto un ulteriore esperimento volto a valutare gli effetti tossici delle nanoparticelle sulle cellule: si tratta dell'MTS, ovvero un saggio di vitalità cellulare che si basa sull'attività delle deidrogenasi mitocondriali: queste riducono l'MTS a formazano conferendo alla sostanza un colore violaceo. Per il saggio MTS è stata preparata una piastra da 96 pozzetti con 5×10^3 cellule per pozzetto, che sono state poi incubate con le nanoparticelle d'argento biogeniche e chimiche alle concentrazioni di $2 \mu\text{g/ml}$, $5 \mu\text{g/ml}$, $7 \mu\text{g/ml}$, $10 \mu\text{g/ml}$, $15 \mu\text{g/ml}$ e $20 \mu\text{g/ml}$ e il blank rappresentato da H_2O . Questo saggio è stato ripetuto due volte e dall'analisi media dati è emerso, come si può evincere dai grafici, che i risultati relativi alle nanoparticelle biogeniche presentano minore coerenza rispetto all'andamento che la percentuale di sopravvivenza dovrebbe avere all'aumentare della concentrazione di nanoparticelle ($20 \mu\text{g/ml}$) mentre la sintesi chimica mostra un andamento più vicino a quello ipotizzato, in quanto è tendenzialmente presente una proporzionalità inversa tra l'aumento della concentrazione di NPs e la diminuzione di sopravvivenza cellulare.

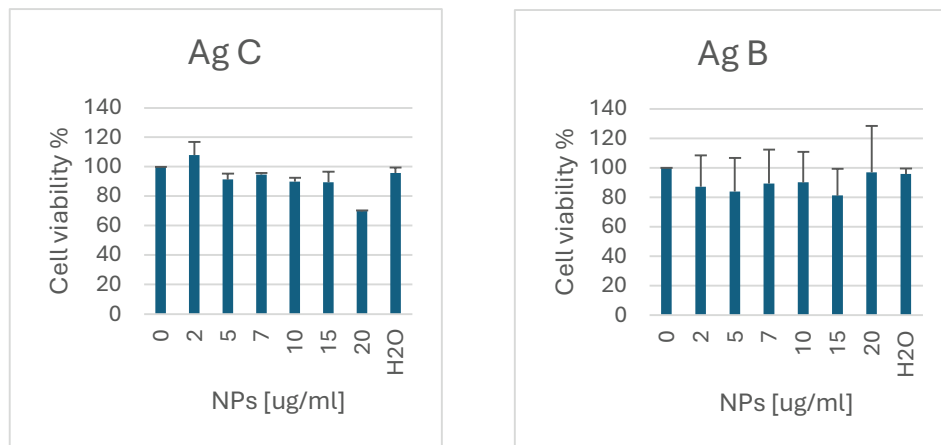


Figura 8 e Figura 9. Media risultati saggio MTS su cellule A549 esposte a varie concentrazioni di nanoparticelle chimiche (AgC) e biosintetiche (AgB)

Infine, durante il mio percorso di stage ho assistito all'allestimento di numerosi altri esperimenti, in particolare alla preparazione delle cellule trattate con nanoparticelle di diverso tipo (Au e Ag) derivate da sintesi chimiche e biogeniche che sono poi state osservate tramite microscopia elettronica a trasmissione (TEM) e ho potuto osservare l'effettiva internalizzazione delle nanoparticelle all'interno dei vari compartimenti ed organelli cellulari.

BIBLIOGRAFIA

1. Mostafavi E, Zarepour A, Barabadi H, Zarrabi A, Truong LB, Medina-Cruz D. Antineoplastic activity of biogenic silver and gold nanoparticles to combat leukemia: Beginning a new era in cancer theragnostic. *Biotechnol Rep (Amst)*. 2022 Feb 26;
2. Ahmad S, Munir S, Zeb N, Ullah A, Khan B, Ali J, Bilal M, Omer M, Alamzeb M, Salman SM, Ali S. Green nanotechnology: a review on green synthesis of silver nanoparticles - an ecofriendly approach. *Int J Nanomedicine*. 2019 Jul 10;
3. Abbasi, E., Milani, M., Fekri Aval, S., Kouhi, M., Akbarzadeh, A., Tayefi Nasrabadi, H., ... Samiei, M. (2014). Silver nanoparticles: Synthesis methods, bio-applications and properties. *Critical Reviews in Microbiology*, 42(2),173–180.
4. Hembram KC, Kumar R, Kandha L, Parhi PK, Kundu CN, Bindhani BK. Therapeutic prospective of plant-induced silver nanoparticles: application as antimicrobial and anticancer agent. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2018;46(sup3):S38-S51.
5. Forner A, Reig M, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet*. 2018 Mar 31;391(10127):1301-1314.
6. Wypij M, Jędrzejewski T, Trzcińska-Wencel J, Ostrowski M, Rai M, Golińska P. Green Synthesized Silver Nanoparticles: Antibacterial and Anticancer Activities, Biocompatibility, and Analyses of Surface-Attached Proteins. *Front Microbiol*. 2021 Apr 22;12:632505.
7. Huy TQ, Huyen PTM, Le AT, Tonezzer M. Recent Advances of Silver Nanoparticles in Cancer Diagnosis and Treatment. *Anticancer Agents Med Chem*. 2020;20(11):1276-1287.
8. Kamal Eddin FB, Fen YW. The Principle of Nanomaterials Based Surface Plasmon Resonance Biosensors and Its Potential for Dopamine Detection. *Molecules*. 2020 Jun 15;25(12):2769.
9. Miranda RR, Sampaio I, Zucolotto V. Exploring silver nanoparticles for cancer therapy and diagnosis. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2022 Feb;210:112254.
10. Kaur, I., Ellis, L., Romer, I., Tantra, R., Carriere, M., Allard, S., Mayne-L'Hermite, M., Minelli, C., Unger, W., Potthoff, A., Rades, S., Valsami-Jones, E. Dispersion of Nanomaterials in Aqueous Media: Towards Protocol Optimization. *J. Vis. Exp.* (130), e56074, doi:10.3791/56074 (2017).


 Cite this: *RSC Adv.*, 2024, 14, 2192

Biogenic silver nanoparticles' antibacterial activity and cytotoxicity on human hepatocarcinoma cells (Huh-7)[†]

 Thyerre Santana da Costa,^a Mariana Rodrigues da Silva,^b Júlio César Jerônimo Barbosa,^{ac} Uedson Da Silva Das Neves,^a Marcelo Bispo de Jesus^{id}^b and Ljubica Tasic^{id}^{*a}

Exploring diverse synthetic pathways for nanomaterial synthesis has emerged as a promising direction. For example, silver nanoparticles (AgNPs) are synthesized using different approaches yielding nanomaterials with distinct morphological, physical and biological properties. Hence, the present study reports the biogenic synthesis of silver nanoparticles using the aqueous secretome of the fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (AgNP@Fo) and orange peel extract (AgNP@OR). The physical and morphological properties of synthesized nanoparticles were similar, with AgNP@Fo measuring 56.43 ± 19.18 nm and AgNP@OR measuring 39.97 ± 19.72 nm in size. The zeta potentials for the nanoparticles were low, -26.8 ± 7.55 and -26.2 ± 2.87 mV for AgNP@Fo and AgNP@OR, respectively, demonstrating a similar negative charge. The spherical morphologies of both nanoparticles were evidenced by Scanning Transmission Electron Microscopy (STEM) and Atomic Force Microscopy (AFM). However, despite their similar physical and morphological properties, AgNPs demonstrated different bioactivities. We evaluated and compared the antimicrobial efficacy of these nanoparticles against a range of bacteria, such as *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Escherichia coli*. The AgNP@Fo showed Minimum Inhibitory Concentration (MIC) values ranging from 0.84 to 1.68 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and were around ten times more potent compared to AgNP@OR. The anticancer activities of both nanoparticles were investigated using human hepatocarcinoma cells (Huh-7), where AgNP@Fo exhibited around 20 times higher cytotoxicity than AgNP@OR with an IC_{50} value of 0.545 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Anticancer effects were demonstrated by the MTT, confirmed by the calcein-AM assay and fluorescence imaging. This study establishes solid groundwork for future exploration of molecular interactions of nanoparticles synthesized through distinct biosynthetic routes, particularly within bacterial and cancerous cell environments.

Received 12th November 2023

Accepted 31st December 2023

DOI: 10.1039/d3ra07733k

rsc.li/rsc-advances

1. Introduction

Currently, with wide recognition for their antimicrobial potential, silver nanoparticles (AgNPs) are being applied in the treatment of ulcers, infections, burns, wounds, and for solving other topical problems.^{1–3} In addition to their antimicrobial properties, AgNPs have potential anticarcinogenic effects.⁴ They have been found to exhibit inhibitory effects on the growth and proliferation of various cancer cells, making them promising

candidates for cancer therapy.⁵ The unique physicochemical properties of AgNPs, such as their size and high surface area, allow for efficient interactions with cancer cells, leading to cytotoxic effects and apoptosis induction.^{6,7} These findings highlight the multifunctional nature of AgNPs, making them a fascinating area of research for both antimicrobial and anti-cancer applications.

AgNP synthesis can be carried out through two methods, either “top-down” or “bottom-up.” The top-down approaches involve the reduction of the starting material size, usually achieved through various physical techniques. The bottom-up methods are performed using reducing and capping agents, which can be either chemical or natural (green).^{8,9} The prevalent approach for synthesizing AgNPs involves chemical reduction, achieved by reducing a silver precursor with substances like sodium borohydride and *N,N*-dimethylformamide.^{10,11} However, the use of green methods in AgNP synthesis has witnessed a significant upsurge due to their inherent advantages, such as

^aInstitute of Chemistry, Biological Chemistry Laboratory, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, SP, 13083-970, Brazil. E-mail: ljubica@unicamp.br

^bDepartment of Biochemistry and Tissue Biology, Institute of Biology, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, SP, 13083-862, Brazil

^cDepartment of Organic Chemistry, Institute of Chemistry, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, SP, 13083-970, Brazil

[†] Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: <https://doi.org/10.1039/d3ra07733k>



accessibility, cost-effectiveness, energy efficiency, environmental friendliness, and low toxicity. These environmentally friendly methods involve microorganisms, plants, and irradiation-assisted techniques.^{12–14} These agents not only facilitate the synthesis process but also provide biomolecule-induced surface modifications that can potentially enhance the nanoparticles' interactions with biological systems.¹⁵ Furthermore, despite these notable advantages, the arena of discrepancies in the biological activity of silver nanoparticles fabricated through different biosynthetic routes remains an underexplored domain.¹⁶

This study aimed to compare silver nanoparticles biosynthesized by two methods: the aqueous secretome of the fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* and the method using orange peel extract. The physicochemical properties and the biological potential of AgNPs were determined, specifically focusing on their antimicrobial and anticancer activities. A deeper understanding of the efficacy of these nanoparticles as therapeutic agents was sought, potentially leading to the development of novel strategies for combating microbial infections and treating cancer.

Both biosynthesized silver nanoparticles were evaluated for their antimicrobial potential using Gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*) and Gram-negative bacteria (*Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*). Gram-positive and Gram-negative microorganisms have structural differences in their cell walls, which can affect their susceptibility to antimicrobial agents.¹⁷ *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* are microorganisms commonly found in human infections and have significant public health implications.¹⁸ These microorganisms are associated with various infections, including skin infections, urinary tract infections, respiratory infections, and hospital-acquired infections.¹⁸

Additionally, both biosynthesized silver nanoparticles underwent evaluation for their potential as antitumoral agents, employing the human hepatocarcinoma cell line Huh-7 as the test model. Given that hepatocellular carcinoma (HCC) represents the foremost manifestation of liver cancer and ranks fifth among the most prevalent cancers worldwide, its impact is profound.¹⁹ Each year, around 700 000 individuals worldwide confront an HCC diagnosis.^{20,21} Against this backdrop, the primary objective of this investigation is to ascertain the impact on the viability of Huh-7 cells after their exposure to varying concentrations of AgNPs. Through these assessments, we seek to shed light on the potential utility of these nanoparticles in combating HCC, in addition to opening possibilities for new studies with cancer cell models.

2. Experimental section

2.1 Biosynthesis of silver nanoparticles

2.1.1 Biosynthesis of silver nanoparticles by fungal filtrate – AgNP@Fo. For the synthesis of silver nanoparticles (AgNP@Fo), the fungus *Fusarium oxysporum* with the original code: VR-039 was used. The microorganism was collected from the root of *Musa* sp. from the locality of Vale do Ribeira, in the municipality of Eldorado/São Paulo in Brazil.

The first step was to grow a culture of the fungus *Fusarium oxysporum* in Petri dishes using a culture medium of 0.5% yeast extract, 2% malt extract, and 2% agar. The inoculated medium was left for 7 days at 28 °C for fungus growth. After 7 days, a 500 mL liquid culture medium was made, consisting of 0.5% yeast extract and 2% malt extract. Approximately 1 cm² of the solid medium with the fungus was removed and transferred to the sterile liquid medium. The 500 mL culture medium was then incubated in a Shaker under 150 rpm agitation at 28 °C for 6 days. The biomass obtained was filtered using filter paper and washed with deionized water. Approximately 10 g of biomass was weighed and put into 100 mL of deionized water. This material was stirred at 150 rpm at 28 °C for 3 days. Next, the mixture might have taken on a pinkish color. The solution with biomass was then filtered using a Büchner funnel and filter paper (Qualy filter paper 9.0 cm diameter, 80 gm⁻² grammage, 205 µmol L⁻¹ thickness, 14 µmol L⁻¹ most pores), and the fungal filtrate (FF) was used for the synthesis of AgNP@Fo. Finally, AgNO₃ 1 mmol L⁻¹ solution was added, and the reaction mixture was kept at 28 °C under protection from light. The formation of AgNP@Fo was investigated by ultraviolet-visible (UV-Vis) spectroscopy in a range of 200 to 800 nm.

2.1.2 Biosynthesis of silver nanoparticles by orange peel extract – AgNP@OR. The orange extract was obtained by mixing 25 g of orange peel in 400 mL of distilled water. The system was boiled for 2 min. After cooling, solid residues were removed from the extract using a Büchner funnel and filter paper. For the synthesis of the nanoparticles, AgNO₃ 1 mmol L⁻¹ was used as the silver ion source, followed by shaking in a horizontal shaker for 2 h.

2.2 Characterization of the nanoparticles

The sizes of the nanoparticles influence their bioaccumulation and toxicity, and it is of broad importance to perform the characterization of the obtained nanomaterials. The particle diameters, polydispersity indexes, as well as zeta potential measurements were determined by Dynamic Light Scattering (DLS) in a Zetasizer nano-series equipment (Malvern Instruments). The surface plasmon resonance of the nanoparticles was studied using the UV-Vis spectroscopy method with an Agilent HP 8453 spectrophotometer in the wavelength range of 200 to 1000 nm. Furthermore, the morphology and size of silver nanoparticles were evaluated using Scanning Transmission Electron Microscopy (STEM) and Atomic Force Microscopy (AFM) techniques. For DLS, STEM and AFM analyses, the nanoparticles were diluted in MilliQ water 1:10 (v/v) and filtered using a 0.22 µm syringe filter. DLS data was acquired using the Zetasizer software, while microscopy analyses were performed using ImageJ.

2.3 Quantification of silver(I) in colloids of silver nanoparticles

AgNPs were quantified by adapting the method described by Gonzalez and collaborators.²² Initially, standard solutions of Ag⁺ with varying concentrations ranging from 1 to 15 ppm were prepared. A volume of 1.2 mL of Ag⁺ standard solutions or AgNP colloids was mixed with 200 µL of a NaAc/AcH buffer solution

(pH = 4) and 100 μL of a 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) solution (10 mmol L^{-1} in ethanol). When introducing TMB and a buffer solution (NaAc/AcH) to a transparent aqueous solution containing Ag^+ , a chemical transformation occurs, resulting in the formation of the oxidized state of TMB (oxTMB) and $\text{Ag}(0)$. These solutions were allowed to rest at 5 $^\circ\text{C}$ for 24 h. After the oxidation reaction of TMB by Ag^+ ions, the solutions were analyzed using a UV-Vis spectrophotometer (typical peaks of oxTMB at ~ 655 nm) (Fig. 1).

2.4 Antimicrobial activity of silver nanoparticles AgNP@Fo

The bacteria were obtained from the Tropical Culture Collection of the André Tosello Foundation (Campinas, São Paulo, Brazil), and used to determine the AgNP Minimum Inhibitory Concentrations (MIC), which refer to the lowest concentrations of the AgNPs that limit visible bacterial growth.

The 96-well microplate dilution technique was used to verify the antimicrobial activity of AgNPs. Each 96-well plate consists of 8 vertical rows (A to H) and 12 horizontal rows (1 to 12). The first vertical row was considered as the positive control (100 μL inoculum + 100 μL sterile culture medium) and the second vertical row as the negative control (100 μL sterile culture medium + 100 μL AgNP colloids). The AgNP stock colloids were diluted in a sterile culture medium, keeping the final volume at 200 μL , with the posterior addition of 50 μL of the inoculum suspension. The culture medium used was Mueller Hinton (MH), a widely used culture medium for Antimicrobial Susceptibility Testing (AST). The plates were incubated at 35 $^\circ\text{C}$ for 24 h, and then the reading was performed by visual verification of turbidity. All steps were repeated 3 times for each microorganism separately.

2.5 Nuclear magnetic resonance spectroscopy analyses

The method for acquiring NMR data from intracellular metabolic extracts of the bacteria with the lowest MIC value was adapted from the article by Stanisic and colleagues.²³

Acquisition of all 1D (^1H) and 2D Nuclear Magnetic Resonance – NMR spectra was done on a Bruker Avance III 600 MHz spectrometer, utilizing a TBI – Triple Resonance Broadband Inverse probe at 25 $^\circ\text{C}$. For the NMR analysis and subsequent metabolomics, 2 distinct groups were studied. In all groups, the bacteria was grown in 10 mL of BHI media. For the control group, bacterial cultures were grown for 24 h at 200 rpm and 32 $^\circ\text{C}$. To the culture media of the group treated with AgNP@Fo, 5 mL of bacterial culture was added, after 16 h of shaking. The final concentration of AgNP@Fo must correspond to half the value of the minimum inhibitory concentration (MIC) that will be evaluated. Then, the treated cultures were grown for another 8 h, reaching turbidity at 600 nm of 0.8. By adding methanol, in the ratio 1/1 (v/v) to the bacterial cultures, the growth of bacteria was quenched. Then, the suspensions were centrifuged for 10 min at 7000 $\times g$ at 4 $^\circ\text{C}$, and the cells were suspended in 30 mL of ice-cold PBS (20 mmol L^{-1} , pH 7.2, 0 $^\circ\text{C}$); this step was repeated twice. The cells were lysed by ultrasonication for 10 s (Ultrasonique). The obtained biological material was centrifuged at 17 000 $\times g$ for 2 min, then the supernatant was kept, cell residues were washed, and the supernatants were combined and lyophilized. Samples for NMR were prepared by dissolving 15 mg of the biological material into 600 mL of deuterium oxide and spectra were acquired.

2.6 Huh-7 cell culture

Human hepatoma cells (Huh-7, No. JCRB0403) were obtained from the Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank (JCRB, Japan). Huh-7 cells were cultured as a monolayer in a T25 cell culture flask containing 5 mL of Dulbecco's Modified Eagle's Medium Low Glucose (DMEM LG, Life Technologies, Canada) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco, South America), and 1% Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) (Gibco, Grand Island – USA). The cells were maintained in a Panasonic incubator at 37 $^\circ\text{C}$, 95% humidity, and 5% CO_2 . Cells were passed as required for maintenance when confluency

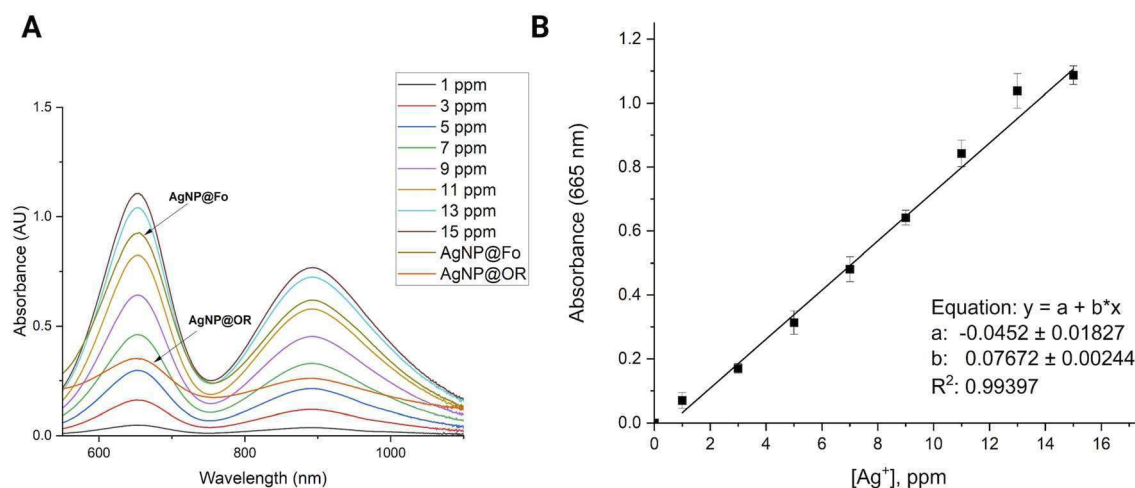


Fig. 1 Silver(I) concentration determination: (A) absorption spectra of silver(I) standards with increasing amounts of Ag^+ (0–15 ppm) in the presence of TMB (10 mmol L^{-1}). (B) Linear relationship between silver ion (Ag^+) concentration in (ppm) and detected absorbance at 665 nm.

reached approximately 80%. In all experiments, cells were cultured for a maximum of 1 month, after which a new vial of Huh-7 cells was thawed and used for 1 month. Cultures were determined to be free of mycoplasma at each thaw using the direct DNA staining method and inspected under fluorescence microscopy. All experiments were performed with cells free of mycoplasma.

2.6.1 Cell plating for exposure to AgNP@OR and AgNP@Fo. Huh-7 cells were cultured in 96-well plates at a density of 7.5 thousand cells per well in DMEM LG medium supplemented with 10% FBS and 1% Pen/Strep and incubated (37 °C and 5% CO₂). At least three runs of the MTT reductions and calcein AM assays were performed on three different days.

2.6.2 Cellular exposure to AgNP@OR and AgNP@Fo. After 24 h of cell plating, the culture medium was removed, and cells were incubated with 100 μL of AgNP@OR or AgNP@Fo at nine different concentrations ranging from 0.0015 up to 100 μmol L⁻¹. The nanoparticles were diluted in serum- and antibiotic-free DMEM low glucose medium (herein referred to as non-supplemented DMEM LG medium). It is worth noting that the nanoparticle colloid replaced up to 20% of the culture medium to avoid over-dilution of the medium, which can affect cell viability. Cells incubated with non-supplemented DMEM LG medium were used as a control group. The treated cells were incubated for 24 h at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere.

2.7 MTT assay

After 24 h cell exposure to AgNP@OR or AgNP@Fo, 10 μL of MTT solution (5 mg mL⁻¹) (Invitrogen, Oregon – USA) were added to three wells. In the blank group, 10 μL of non-supplemented LG-DMEM was added. Next, the plate was incubated at 37 °C in an atmosphere of 5% CO₂ and protected from light. After 2.5 h, the MTT and blank solutions were replaced by 100 μL of dimethyl sulfoxide – DMSO (Synth, Brazil) to solubilize the formazan crystals. Then, the plate was kept under agitation for 15 min. After this, the absorbance reading (at a wavelength of 570 nm) of each well (treated with MTT and blank) was performed in the Cytation 5 Hybrid Multidetector Reader (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA).²⁴

The results were extracted into Excel spreadsheets, where the calculations were performed to obtain cell viability as follows:²⁵

$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{(\text{Abs of AgNP}) - (\text{Abs of blank})}{(\text{Abs of negative control}) - (\text{Abs of blank})} \times 100 \quad (1)$$

For the viability calculation, at least three independent replicates were performed, each of the replicates contained triplicates of wells (for example, three wells treated with AgNP@OR or AgNP@Fo at each of the concentrations of the curve, three wells treated with negative control, in this case, non-supplemented DMEM medium), three wells were the blank, where there are cells and treatment, but without the addition of MTT. In an independent repeat, the arithmetic mean of the three wells for each AgNP was used to calculate the arithmetic mean of the relative cell viability. And, the final arithmetic mean

of cell viability for each AgNP was calculated from the three independent replicates.

Then, the calculated cell viability data and the respective concentrations of AgNP@OR and AgNP@Fo were plotted in GraphPad Prism 8.0.2.²⁴ software to perform IC₅₀ calculation by linear regression log(inhibitor) vs. response – variable slope (four parameters).

2.7.1 Calcein-AM assay. After 24 h of cell exposure to AgNP@OR or AgNP@Fo, treatments were replaced by 50 μL of a solution of calcein-AM (50 μmol L⁻¹, Invitrogen, USA) in FluoroBrite DMEM (Gibco, USA) to three wells. In the blank group, 50 μL of FluoroBrite DMEM was added to the other three wells. After 30 min of incubation, calcein fluorescence emission (λ_{ex/em} = 488/528 nm) was measured using Cytation 5 Hybrid Multidetector Reader (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA).^{26,27}

The results were extracted into Excel spreadsheets, where the calculations were performed to obtain cell viability as follows:²⁵

$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{(\text{FIAv AgNP}) - (\text{FIAv blank})}{(\text{FIAv negative control}) - (\text{FIAv blank})} \times 100 \quad (2)$$

For this calculation were used:

- Average of at least three values of calcein fluorescence intensities (FIAv) referring to the treatment in triplicate with AgNP@OR or AgNP@Fo at each of its concentrations.
- FIAv of blank (mean of three wells without MTT addition);
- FIAv of negative control (cells treated with non-supplemented DMEM LG medium).

Then, the calculated cell viability data and the respective concentrations of AgNP@OR and AgNP@Fo were plotted in GraphPad Prism 8.0.2 software to perform IC₅₀ calculation by linear regression log(inhibitor) vs. response – variable slope (four parameters).

2.8 Imaging assay based on commercial live/dead cell viability using the image of Hoechst, propidium iodide and calcein

In addition to MTT and calcein AM assay, an image-based assay using the dyes – Hoechst, propidium iodide and calcein was performed to evaluate cell viability. Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich®) is used to determine the total cell count as it binds DNA from living or non-living cells. Propidium iodide (PI) (ThermoFisher®) also binds DNA, but it is impermeant to healthy cells. Therefore, PI-stained cells are considered non-viable cells. Calcein-AM, when converted to calcein by intracellular esterases indicate viable cells.

After 24 h of cell exposure to AgNP@OR or AgNP@Fo solutions, treatments were replaced by 50 μL of a solution containing calcein (1 : 2000, v/v), PI (1 : 1000 v/v) and Hoechst (1 : 1000 v/v) in FluoroBrite DMEM. The plates were incubated for 30 min at 37 °C in an atmosphere of 5% CO₂ and protected from light. Then, fluorescence images of each well were acquired with the 10× objective using the image multi-mode reader of Cytation 5 (Biotek Instruments, USA). The filters used for imaging were: GFP for calcein (excitation/emission = 469/525 nm), PI

filter for PI (excitation/emission = 531/647 nm), DAPI filter for Hoechst (excitation/emission = 377/447 nm). All images in the GFP channel had their background subtracted in Image J (process > subtract background), with a rolling ball radius of 1800 pixels. It also reduced the brightness of the images to -38 . Phase contrast images were also obtained with the $10\times$ objective, which were also acquired.^{24–27}

3. Results and discussions

3.1 Physicochemical characterization of AgNP@Fo and AgNP@OR

To evaluate the physicochemical characteristics of bio-synthesized silver nanoparticles, we determined their hydrodynamic radii, zeta potentials, and polydispersity indexes. By

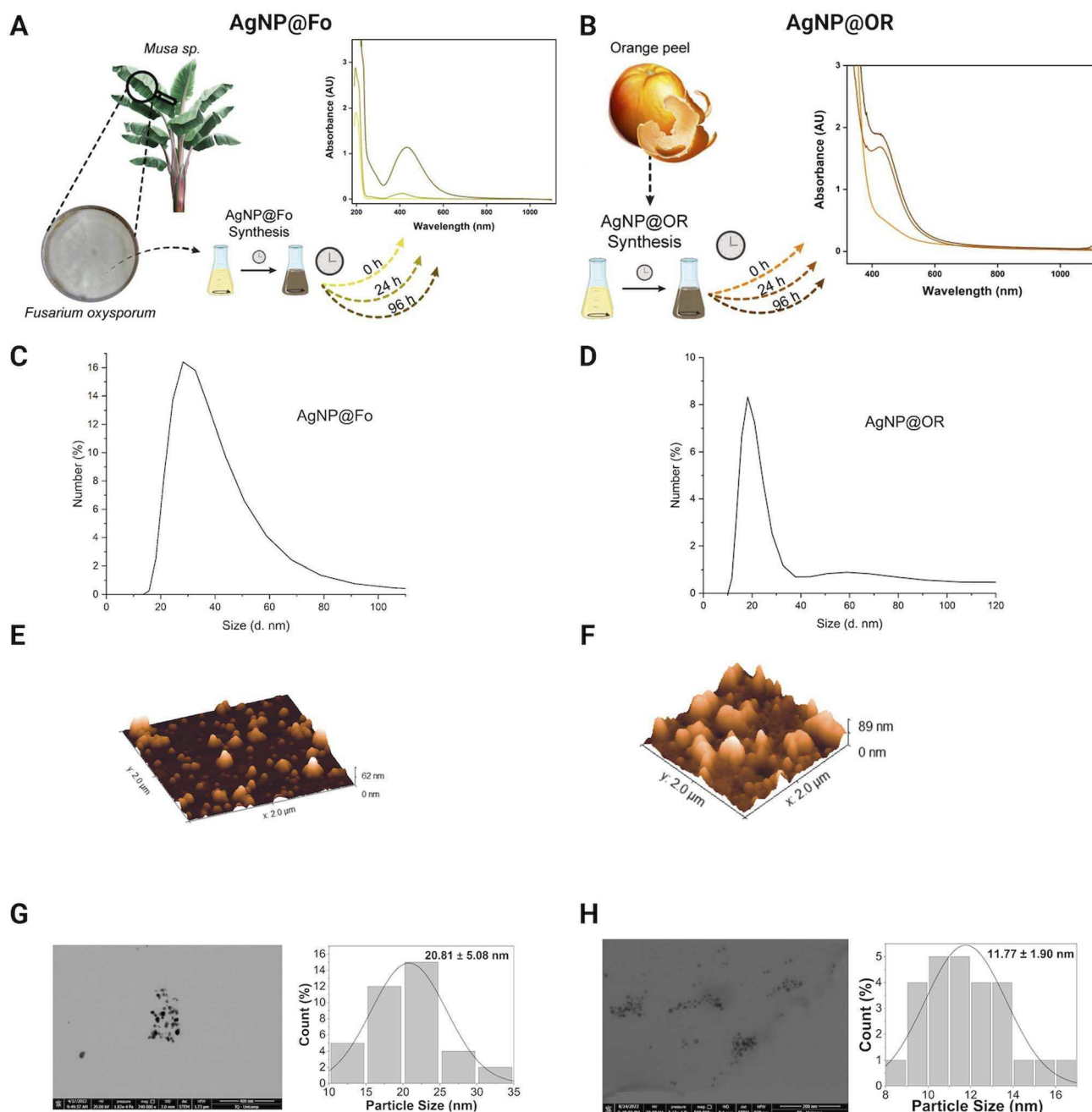


Fig. 2 Physicochemical characterization of synthesized silver nanoparticles using *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubeense* (AgNP@Fo) and orange peel extract (AgNP@OR). Characterization techniques: (A) UV-Vis absorption of silver nanoparticles (AgNP@Fo) at 433 nm, (B) UV-Vis absorption of AgNP@OR at 426 nm, (C) Dynamic Light Scattering (DLS) graph of AgNP@Fo showing an average size of 56.43 ± 19.18 nm, (D) DLS graph of AgNP@OR showing an average size of 39.97 ± 19.72 nm, (E) Atomic Force Microscopy (AFM) of AgNP@Fo revealing spherical morphology, (F) AFM of AgNP@OR displaying spherical morphology, (G) Scanning Transmission Electron Microscopy (STEM) of AgNP@Fo with an average size of 20.81 ± 5.08 nm, (H) STEM of AgNP@OR with an average size of 11.77 ± 1.90 nm.

assessing the nanoparticle size using DLS and STEM, we can understand the dimensions of the particles, which play a crucial role in their interactions with biological systems and other materials.²⁸ The zeta potential measurements provide information about the surface charge of the nanoparticles, revealing the presence of functional groups that influence their stability and potential for aggregation.^{28,29} Additionally, the determination of the polydispersion index provides insights to the uniformity of particle sizes within the solution, indicating the level of homogeneity in the nanoparticle dispersion.²⁹

The formation of AgNPs was monitored exploring UV-Vis spectra (Fig. 2A and B). The wavelengths from 350 to 500 nm, characteristic for silver nanoparticles,²⁸ were observed. Some studies indicate that spherical silver nanoparticles exhibit a plasmon absorption band near 400 nm.^{30,31} AgNP@Fo showed the maximum at 433 nm indicative for the spherical morphology of the nanomaterial. Similarly, in the case of AgNP@OR, a surface plasmon resonance (SPR) was detected around 426 nm. The spherical morphologies of the nanoparticles were confirmed in AFM (Fig. 2E and F) and STEM (Fig. 2G and H).

After 96 h of biosynthesis, AgNP@Fo exhibited a medium nanoparticle size of 56.43 ± 19.18 nm, determined using DLS (Fig. 2C), and 20.81 ± 5.08 nm using STEM (Fig. 2G). The main difference between DLS and STEM lies in the approach used to measure the size of nanoparticles. DLS provides information about the average hydrodynamic size of particles in solution, while STEM offers direct images of the size and shape of individual nanoparticles.^{26,27}

The zeta potentials of these nanoparticles, when diluted in Milli-Q water at a 1 : 10 v/v ratio, was measured and negative zeta potential values were attributed to the presence of carboxylate groups in the biological samples, playing a role in the stabilization of AgNPs.²⁶ The zeta potential of AgNP@Fo was -26.8 ± 7.55 mV. This stabilization led to a polydispersion index (PDI) of 0.163, indicating a relatively homogeneous dispersion of nanoparticles within the colloid. The concentration of AgNP@Fo was calculated to be 0.401 ± 0.099 mmol L⁻¹ using the calibration curve depicted in Fig. 1, closely aligning with the theoretically expected concentration of 0.5 mmol L⁻¹, thereby falling within the anticipated range, as indicated by Fig. S1 and Table S1.†

On the other hand, AgNP@OR nanoparticles showed smaller average sizes 39.97 ± 19.72 nm, determined using DLS (Fig. 2D), and 11.77 ± 1.90 nm using STEM (Fig. 2H). The zeta potential for these nanoparticles was -26.2 ± 2.87 mV, demonstrating a similar negative charge as observed for the AgNP@Fo. The

sample exhibited a PDI value of 0.414, consistent with previous research suggesting that AgNPs synthesized from fruit and vegetable extracts often display moderate PDIs, from 0.3 to 0.5.²⁹ Additionally, the concentration of AgNP@OR was determined to be 0.465 ± 0.01 mmol L⁻¹ (Fig. S1 and Table S1†).

3.2 Antimicrobial activity

AgNP@Fo demonstrated significant antimicrobial activity, with minimum inhibitory concentrations (MICs) ranging from 0.84 to 1.68 $\mu\text{g mL}^{-1}$, exhibiting lower MIC values for Gram-negative bacteria (Table 1 and Fig. S2†). Nonetheless, AgNP@OR exhibited a broader range of MIC values, ranging from 10.8 to 27.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Interestingly, AgNP@OR showed no antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* within the tested concentration range, as summarized in Table 1 and Fig. S3.† The mechanism by which silver nanoparticles (AgNPs) combat bacteria is not fully comprehended at present. Nevertheless, there exist several theories elucidating the antibacterial effects of silver nanoparticles: (1) production of reactive oxygen species, (2) liberation of Ag⁺ ions from AgNPs causing protein denaturation by binding with sulfhydryl groups, and (3) attachment of AgNPs to bacteria, resulting in subsequent damage to the bacterial structures.^{32–36}

Using fungi as a reducing agent and stabilizer of biogenic silver nanoparticles has become very attractive due to the production of large amounts of proteins, easy handling and low toxicity of the residues.^{37,38} The antimicrobial activity is believed to result from the tendency of nanoparticles to interact with bacteria. AgNPs accumulate on the surfaces of the bacterial membrane, causing the inhibition of cellular proteins, consequently leading to bacterial cell death.³⁸ According to the obtained MIC values, the antimicrobial activity of AgNP@Fo is quite promising and exhibits a greater antimicrobial potential, which can be up to around 10 times more potent, compared to certain published studies that evaluated AgNPs synthesized under different conditions, making a significant contribution to this field of study.^{32,37}

Using the ¹H-NMR, we aimed to evaluate the change in the metabolic profile of *S. aureus* in response to the action of silver nanoparticles (AgNP@Fo) (Fig. 3). These results aim to improve our understanding of the impact of AgNP@Fo on bacteria at a metabolic level and can be reproduced for the other bacteria tested.

The overlapping of metabolic profiles between the control sample (which did not undergo treatment with AgNP@Fo) and the sample treated with nanoparticles is illustrated in Fig. 3A. To confirm the difference between these groups, we employed

Table 1 Biological MIC tests evaluated for AgNP@Fo and AgNP@OR against different bacterial strains

Microorganism	MIC AgNP@Fo ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	MIC AgNP@OR ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (CCT 1476) (Gram-negative)	0.84	27.0
<i>Staphylococcus aureus</i> (CCT1485) (Gram-positive)	1.68	—
<i>Escherichia coli</i> (CCT1457) (Gram-negative)	0.84	27.0
<i>Enterococcus faecalis</i> (CCT 1494) (Gram-positive)	1.68	10.8

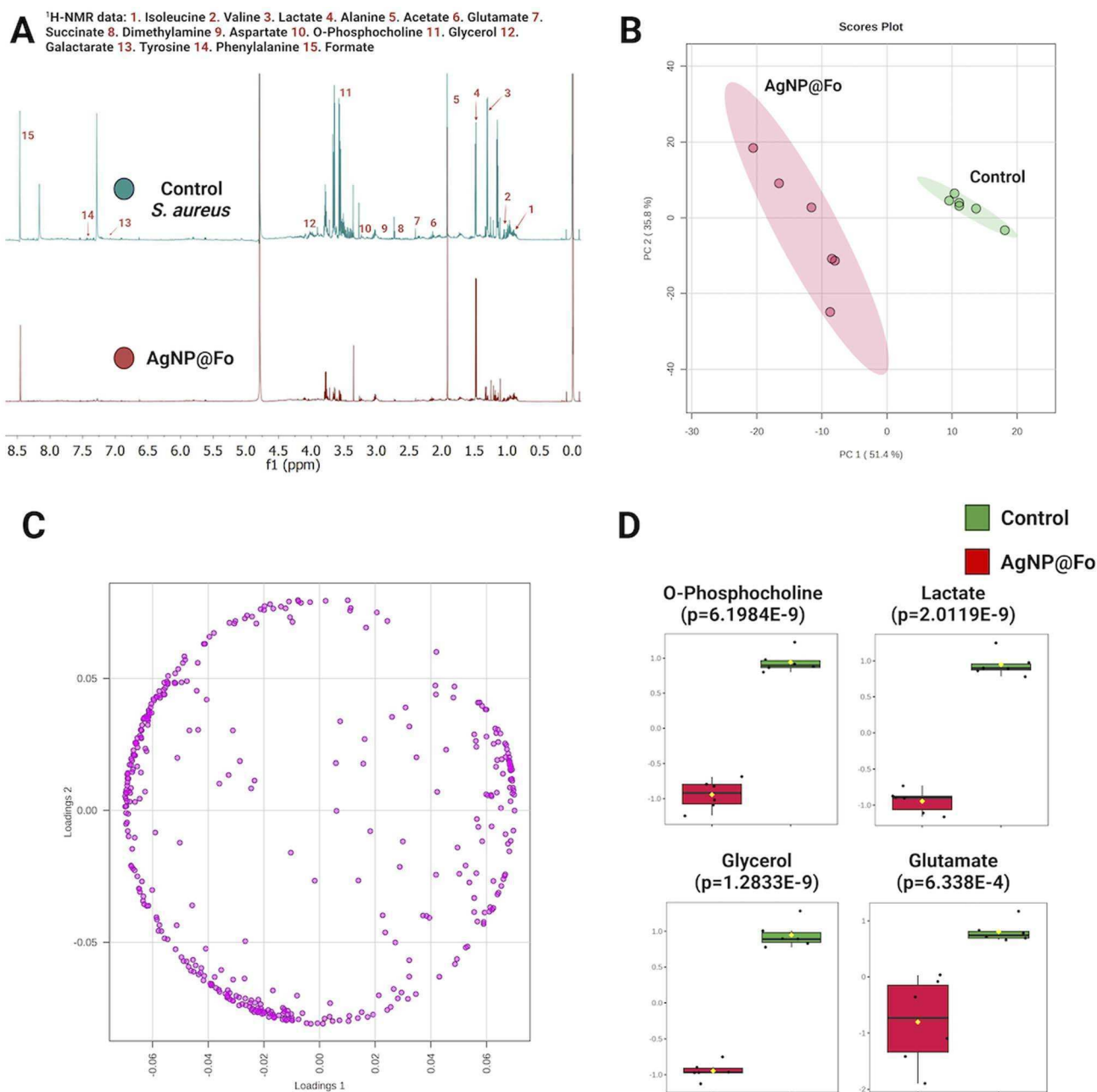


Fig. 3 Comparative analysis of control and AgNP@Fo treated groups. (A) Overlay of ¹H NMR data of *S. aureus* extract (green line), after addition of AgNP@Fo (red line), (B) PCA: group differentiation – PC 1 (51.4%) and PC 2 (35.8%), (C) PCA loading plot: variable contributions, (D) high-impact metabolites: *t*-test analysis.

a chemometrics analysis, represented in the Principal Component Analysis (PCA) plot in Fig. 3B. This analysis confirmed that AgNP@Fo nanoparticles had a significant impact on the metabolic level of bacterial cells. In Fig. 3C, we demonstrate the corresponding loading plot of the PCA, which shows the individual contributions of metabolites to the observed variation in metabolic data. This allows us to identify the metabolites that most influenced the separation between the control and AgNP@Fo-treated groups.

To assess which metabolites were most affected, meaning where there was a more significant variation in relative

concentrations, we conducted a *t*-test analysis (Fig. 3D). In this analysis, we identified a pronounced decrease in the concentrations of metabolites such as phosphocholine, lactate, glycerol, and glutamate. These metabolites play essential roles in crucial metabolic pathways for bacterial survival. For example, phosphocholine³⁹ is fundamental in cell membrane synthesis, lactate is involved in energy production,⁴⁰ glycerol plays a central role in lipid biosynthesis,⁴¹ and glutamate participates in amino acid metabolism and the tricarboxylic acid cycle.⁴² The significant reduction of these metabolites has important

implications for understanding the effects of AgNP@Fo nanoparticles on bacterial metabolism.

The variance in biological potential observed between AgNP@Fo and AgNP@OR might be linked to proteins secreted by the *Fusarium oxysporum* fungus and those present in orange biomass, potentially serving as both reducing and stabilizing agents. In prior research conducted by our research group,

using a distinct strain of *Fusarium oxysporum*⁴³ and orange biomass⁴⁴ for silver nanoparticle biosynthesis, the anchoring of these proteins through nitrogen and sulfur-containing groups was noted. Understanding the protein anchoring process is crucial in determining how nanoparticles interact with their environment. This interaction could impact the controlled release of silver ions, thus influencing the antimicrobial activity

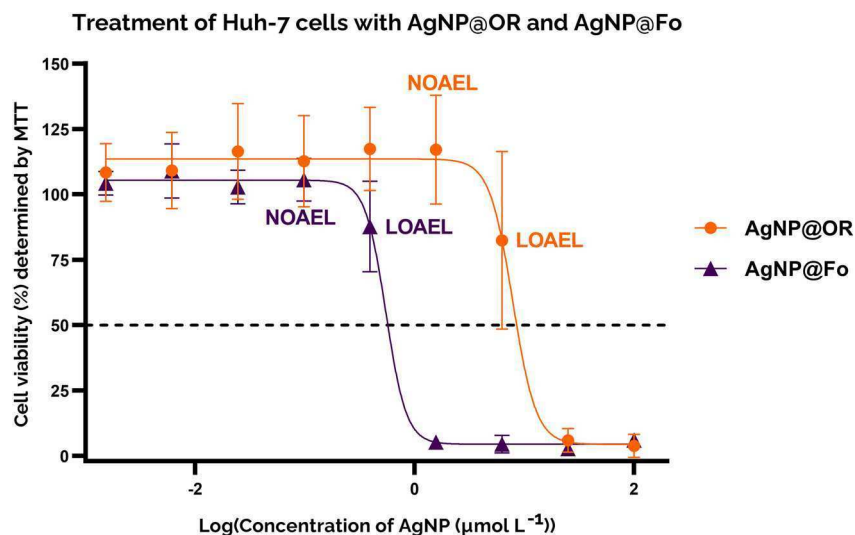


Fig. 4 Determination of AgNP@OR and AgNP@Fo IC₅₀ in Huh-7 hepatocellular carcinoma cells using the MTT assay. Representative non-linear regression plot of 7 independent assays. Cells were treated with AgNP@OR or AgNP@Fo at the following concentrations: 0.0015 μmol L⁻¹; 0.0061 μmol L⁻¹; 0.024 μmol L⁻¹; 0.097 μmol L⁻¹; 0.39 μmol L⁻¹; 1.56 μmol L⁻¹; 6.25 μmol L⁻¹; 25 μmol L⁻¹; 100 μmol L⁻¹. Cells were incubated for 24 h at 37 °C and 5% CO₂. Cell viability was assessed by the MTT assay. All concentrations were analyzed in triplicates. The results for AgNP@OR are shown in orange spheres and AgNP@Fo in purple triangles. The viability of cells treated with a non-supplemented DMEM LG culture medium was considered 100%.

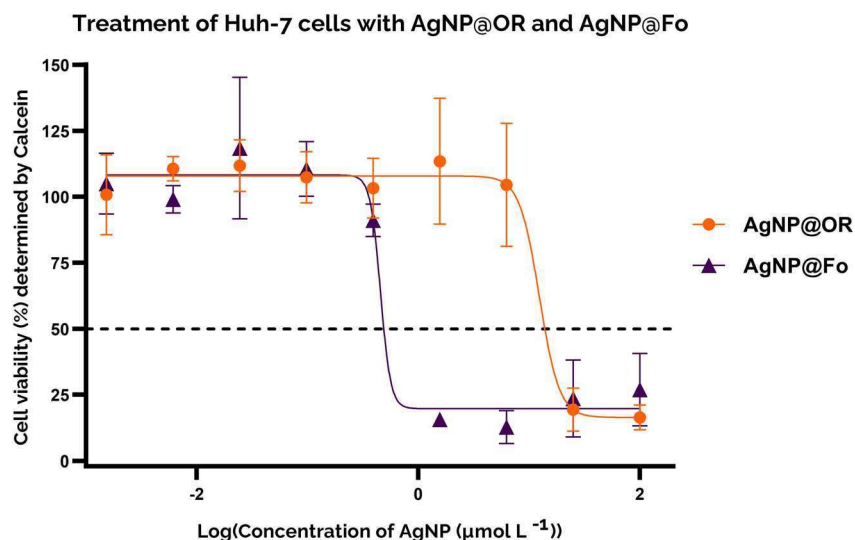


Fig. 5 Determination of AgNP@OR and AgNP@Fo IC₅₀ in Huh-7 hepatocellular carcinoma cells using the calcein-AM assay. Cells were treated with AgNP@OR or AgNP@Fo at the following concentrations: 0.0015 μmol L⁻¹; 0.0061 μmol L⁻¹; 0.024 μmol L⁻¹; 0.097 μmol L⁻¹; 0.39 μmol L⁻¹; 1.56 μmol L⁻¹; 6.25 μmol L⁻¹; 25 μmol L⁻¹; 100 μmol L⁻¹. Incubation with the treatments lasted for 24 h at 37 °C and 5% CO₂. All concentrations were analyzed in triplicates. Cell viability was assessed by the calcein-AM assay. The viability of cells treated with a non-supplemented DMEM LG culture medium was considered 100%. Representative non-linear regression plots of 4 independent assays with AgNP@OR (orange spheres) and with AgNP@Fo (purple triangles) are illustrated.

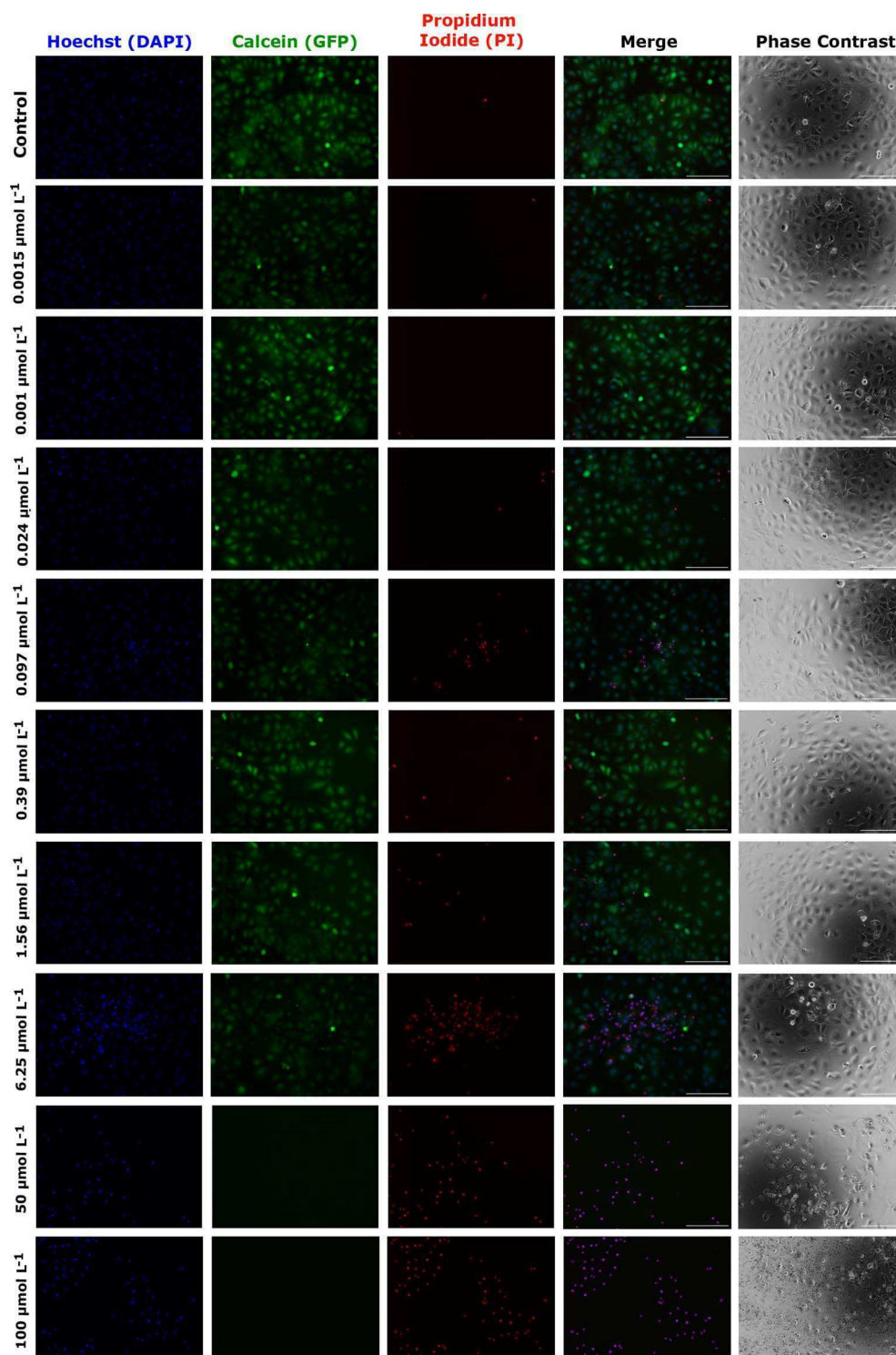


Fig. 6 Representative images of the live/dead cell viability assay in Huh-7 cells, treated with AgNP@OR, obtained by fluorescence microscopy and phase contrast. Images obtained with the 10 \times objective. Lines: each line represents one of the triplicate wells treated with one of the nine concentrations of AgNP@OR or with control (culture medium), respectively labeled on the left side of the image. Columns: 1 – images in the DAPI filter, cells (nuclei) stained with Hoechst 33342 (total cells); 2 – images on the GFP filter, cells stained with calcein (viable cells); 3 – PI filter images, cells (nuclei) stained with propidium iodide (non-viable cells, with damage to the plasmatic membrane); 4 – images of the merge of the three filters: DAPI, GFP, and PI; 5 – phase contrast images in the same well as those obtained by fluorescence, but in a different site. The white line in the lower right corner of the images in columns 4 and 5 indicates the image scale referring to 200 μm .

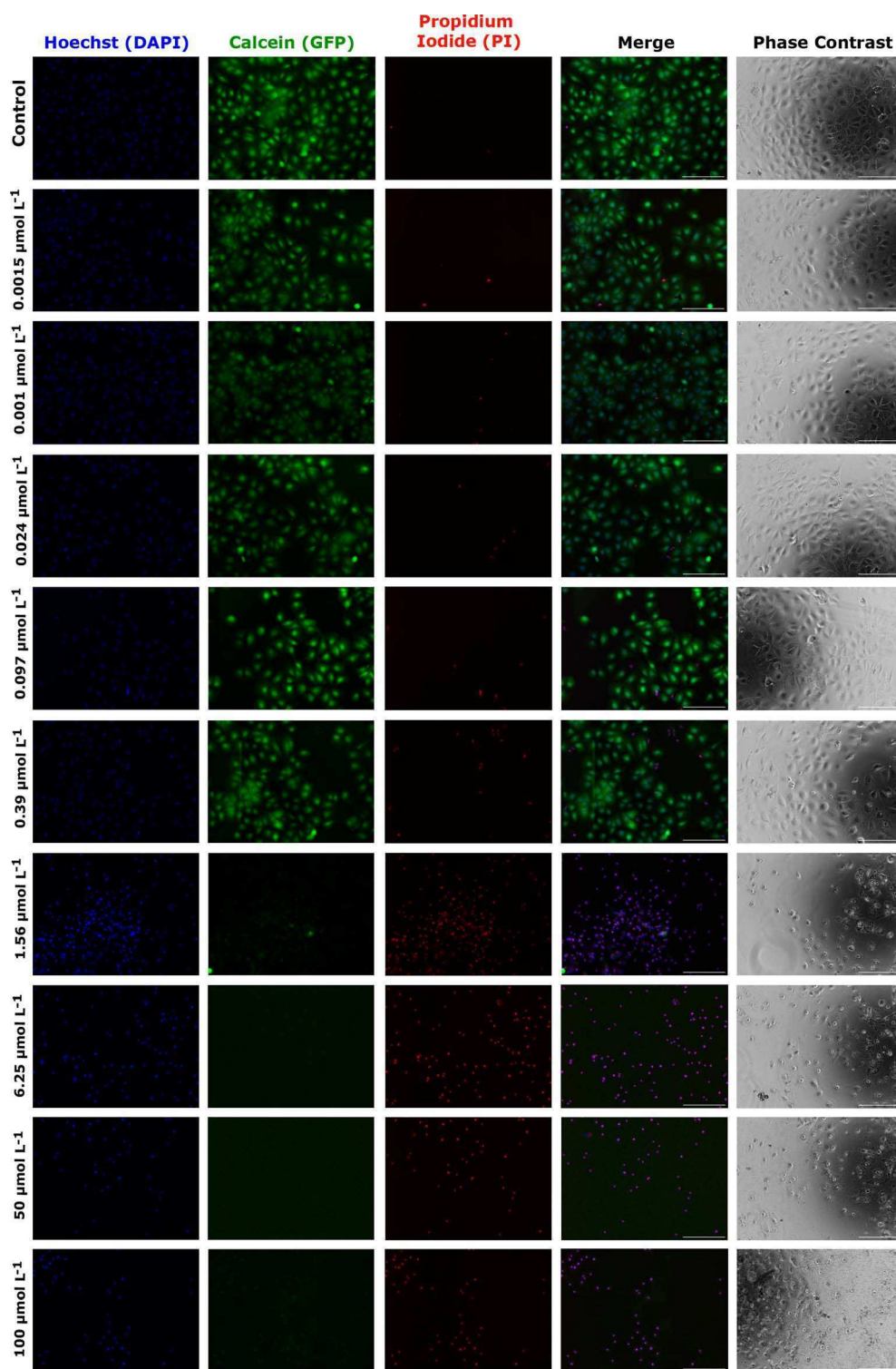


Fig. 7 Representative images of the live/dead cell viability assay in Huh-7 cells, treated with AgNP@Fo, obtained by fluorescence microscopy and phase contrast. Images obtained with the 10 \times objective. Lines: each line represents one of the triplicate wells treated with one of the nine concentrations of AgNP@Fo or with control (culture medium), respectively labelled on the left side of the image. Columns: 1 – images in the DAPI filter, cells (nuclei) stained with Hoechst 33342 (total cells); 2 – images on the GFP filter, cells stained with calcein (viable cells); 3 – PI filter images, cells (nuclei) stained with propidium iodide (non-viable cells, with damage to the plasmatic membrane); 4 – images of the merge of the three filters: DA, PI, GFP, and PI; 5 – phase contrast images in the same well as those obtained by fluorescence, but in a different site. The white line in the lower right corner of the images in columns 4 and 5 indicates the image scale referring to 200 μm .

of the nanoparticles. The way proteins bind to the nanoparticles may not only affect particle stability but also their potential for internalization by microorganisms, a factor critical to their antimicrobial effectiveness.^{43,44}

3.3 Cytotoxicity evaluation of AgNP@OR and AgNP@Fo in Huh-7 cells

To gain insight into the cytotoxicity profile of AgNP@OR and AgNP@Fo, Huh-7 cells were used and the half-maximal concentration for cell viability (IC_{50}) was determined by MTT and calcein assay. The treatment concentrations of AgNP@OR and AgNP@Fo ranged from 0.0015 to 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Other relevant parameters were calculated, such as the No Observable Adverse Effect Level (NOAEL), the highest dose at which the harmful effect is not observed and the Lowest Observable Adverse Effect Level (LOAEL), the lowest dose at which the harmful effect is observed.^{44,45}

For the MTT assay, the IC_{50} values for Huh-7 exposure to AgNP@OR and AgNP@Fo for 24 h were determined using a nine-point nonlinear regression model with GraphPad Prism 8.0.2 software (Fig. 4). For AgNP@OR, the NOAEL was calculated to be 1.56 $\mu\text{mol L}^{-1}$, the LOAEL 6.25 $\mu\text{mol L}^{-1}$, and the IC_{50} value was 7.833 $\mu\text{mol L}^{-1}$. For AgNP@Fo, the NOAEL was calculated at 0.097 $\mu\text{mol L}^{-1}$, LOAEL 0.39 $\mu\text{mol L}^{-1}$, and the IC_{50} value was 0.545 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Therefore, the cytotoxicity profile determined using the MTT assay suggests that AgNP@Fo has significantly higher cytotoxicity towards Huh-7 cells than AgNP@OR.

For the calcein assay, the cytotoxic profile was determined using a similar approach to the MTT assay; for comparison, the same concentrations of AgNP@OR and AgNP@Fo were tested, and the same parameters were determined (Fig. 5). For AgNP@OR, the NOAEL was determined to be 6.25 $\mu\text{mol L}^{-1}$, the LOAEL 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$, and the IC_{50} value was 12.36 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Compared to the values determined by MTT, the NOAEL and LOAEL values were one tested concentration higher, and the IC_{50} value was similar. For AgNP@Fo, the NOAEL was determined to be 0.097 $\mu\text{mol L}^{-1}$, the LOAEL 0.39 $\mu\text{mol L}^{-1}$, and the IC_{50} value was 0.4544 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Compared to the values determined by MTT, the NOAEL and LOAEL values were the same, and the IC_{50} value was similar. Therefore, the MTT and calcein results agreed, suggesting that AgNP@Fo is more cytotoxic than AgNP@OR, increasing the robustness of the results.

As an alternative and complementary measure of cytotoxic response, the fluorescence and phase contrast images of cells stained with calcein, PI, and Hoechst were also used to monitor the toxic response of Huh-7 cells to AgNP@OR and AgNP@Fo MTT exposure. Fig. 6 shows that from a concentration of 6.25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ AgNP@OR, more Huh-7 cells have a nucleus stained with PI, indicating non-viable cells, *i.e.*, cells that lose the integrity of plasma membrane. From the concentration of 6.25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ AgNP@OR, no cells stained with calcein were observed, *i.e.*, no viable cells. In the phase contrast images, it can be seen that cells treated with AgNP@OR at 6.25 and 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ have a different morphology than the healthy cells treated with the negative control (culture medium); they are

smaller, rounded, and detached. Fig. 7 shows that from a concentration of 0.39 $\mu\text{mol L}^{-1}$ AgNP@Fo, a higher number of Huh-7 cells have a cell nucleus stained with the PI fluorophore. From a concentration of 1.56 $\mu\text{mol L}^{-1}$ AgNP@Fo, no cells are stained with calcein, *i.e.*, viable cells. In the phase-contrast images, cells treated with concentrations greater than 1.56 $\mu\text{mol L}^{-1}$ AgNP@Fo show a different morphology than healthy cells treated with the negative control (culture medium), being smaller, rounded, and detached from the bottom.

AgNP@Fo was approximately 20 times more cytotoxic than AgNP@OR, this was supported by the MTT assay, the calcein-AM assay and fluorescence images. One possible explanation for the cytotoxicity profile differences between AgNP@OR and AgNP@Fo is a consequence of the physicochemical properties of nanoparticles. As both nanoparticles are very similar in size and shape (the size of AgNP@Fo is 56.43 ± 19.18 nm and the size of AgNP@OR is 39.97 ± 19.72 nm, both being spherical), the differences in cytotoxicity could be due to surface modifications of these two particles and their interaction with Huh-7 cells. To fully understand the reasons for this discrepancy in anticancer activity between nanoparticles, further in-depth investigations are needed to identify the specific chemical compounds present in each type of nanoparticles, as well as their biological properties and mechanisms of action. Based on these findings, it will be possible to develop more effective and targeted cancer treatments.^{43–51}

In summary, this study aimed to explore the antimicrobial and anticancer potential to improve our understanding of the impact of biogenic silver nanoparticles. In addition, it paves the way for future investigations into the AgNP interactions with cancer cells, thus broadening the horizons for advanced research in this area.

4. Conclusions

In summary, our results support the hypothesis that the biosynthesis of the silver nanoparticles determines their biological role. AgNP@Fo showed impressive antimicrobial activity, with MIC values approximately 10-fold lower than AgNP@OR. Additionally, AgNP@Fo showed almost 20 times higher cytotoxicity than AgNP@OR in Huh-7 cells, with an IC_{50} value of 0.545 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Elucidating the mechanisms underlying these activities would undoubtedly improve our understanding of the relationship between physicochemical properties and biological applications. This knowledge, along with safety and efficacy in clinical trials, is paramount to improving the rational development of nanomaterial applications.

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Acknowledgements

The authors thank the funding by Sao Paulo Research Foundation (FAPESP, Grants #2023/02338-0, #2022/07854-4, #2020/

01218-3, #2023/06874-4 and #2020/08615-8) and CNPq (INCTBio) for financial support.

References

- 1 C. Selvaraj, S. Sakkiah, W. Tong and H. Hong, *Food Chem. Toxicol.*, 2018, **112**, 495–506.
- 2 H. Liu, H. Zhang, J. Wang and J. Wei, *Arabian J. Chem.*, 2020, **13**, 1011–1019.
- 3 R. H. Ahmed and D. E. Mustafa, *Int. Nano Lett.*, 2020, **10**, 1–14.
- 4 L. A. B. Ferreira, F. Garcia-Fossa, A. Radaic, N. Durán, W. J. Fávaro and M. B. de Jesus, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2020, **151**, 162–170.
- 5 K. Jadhav, S. Deore, D. Dhamecha, R. Hr, S. Jagwani, S. Jalalpure and R. Bohara, *ACS Biomater. Sci. Eng.*, 2018, **4**, 892–899.
- 6 B. Plackal Adimuriyil George, N. Kumar, H. Abrahamse and S. S. Ray, *Sci. Rep.*, 2018, **8**, 14368.
- 7 S. Gurunathan, K. J. Lee, K. Kalishwaralal, S. Sheikpranbabu, R. Vaidyanathan and S. H. Eom, *Biomaterials*, 2009, **30**, 6341–6350.
- 8 G. Magdy, E. Aboelkassim, S. Elhaleem and F. Belal, *Microchem. J.*, 2024, **196**, 109615.
- 9 G. Magdy, E. Aboelkassim, R. A. El-Domany and F. Belal, *Sci. Rep.*, 2022, **12**, 21395.
- 10 C. Quintero-Quiroz, N. Acevedo, J. Zapata-Giraldo, L. E. Botero, J. Quintero, D. Zárate-Trivinõ, J. Saldarriaga and V. Z. Pérez, *Biomater. Res.*, 2019, **23**, 27.
- 11 R. Vishwanath and B. Negi, *Curr. Res. Green Sustainable Chem.*, 2021, **4**, 100205.
- 12 R. Majumdar and P. K. Kar, *Sci. Rep.*, 2023, **13**, 7415.
- 13 M. Guilger, T. Pasquoto-Stigliani, N. Bilesky-Jose, R. Grillo, P. C. Abhilash, L. F. Fraceto and R. De Lima, *Sci. Rep.*, 2017, **7**, 44421.
- 14 M. Guilger-Casagrande and R. de Lima, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 2019, **7**, 287.
- 15 N. Rodríguez-Barajas, U. de Jesús Martín-Camacho and A. Pérez-Larios, *Curr. Top. Med. Chem.*, 2022, **22**, 2506–2526.
- 16 V. Mulens-Arias, J. M. Rojas and D. F. Barber, *Nanomaterials*, 2020, **10**, 837.
- 17 M. A. Pfaller, R. K. Flamm, L. R. Duncan, J. M. Streit, M. Castanheira and H. S. Sader, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 2018, **91**, 77–84.
- 18 R. Soltani, H. Fazeli, R. B. Najafi and A. Jelokhanian, *Iran. J. Pharm. Res.*, 2017, **16**, 290–296.
- 19 C. C. Chen, C. Y. Chen, S. H. Ueng, C. Hsueh, C. T. Yeh, J. Y. Ho, L. F. Chou and T. H. Wang, *Cell Death Dis.*, 2018, **9**, 543.
- 20 M. Kawamoto, T. Yamaji, K. Saito, Y. Shirasago, K. Satomura, T. Endo, M. Fukasawa, K. Hanada and N. Osada, *Front. Genet.*, 2020, **11**, 546106.
- 21 R. Laube, A. H. Sabih, S. I. Strasser, L. Lim, M. Cigolini and K. Liu, *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 2021, **36**, 618–628.
- 22 R. A. González-Fuenzalida, Y. Moliner-Martínez, M. González-Béjar, C. Molins-Legua, J. Verdú-Andres, J. Pérez-Prieto and P. Campins-Falcó, *Anal. Chem.*, 2013, **85**, 10013–10016.
- 23 D. Stanistic, N. L. Fregonesi, C. H. N. Barros, J. G. M. Pontes, S. Fulaz, U. J. Menezes, J. L. Nicoleti, T. L. P. Castro, N. Seyffert, V. Azevedo, N. Durán, R. W. Portela and L. Tasic, *RSC Adv.*, 2018, **8**, 40778–40786.
- 24 T. Omanovic Kolaric, T. Kizivat, V. Mihaljevic, M. Zjalic, I. Bilic-Curcic, L. Kuna, R. Smolic, A. Vcev, G. Y. Wu and M. Smolic, *Curr. Issues Mol. Biol.*, 2022, **44**, 3465–3480.
- 25 S. Kamiloglu, G. Sari, T. Ozdal and E. Capanoglu, *Food Front.*, 2020, **1**, 332–349.
- 26 M. L. Swift, *J. Chem. Inf. Model.*, 1997, **37**, 411–412.
- 27 M. Tenopoulou, T. Kurz, P. T. Doulias, D. Galaris and U. T. Brunk, *Biochem. J.*, 2007, **403**, 261–266.
- 28 M. K. Rasmussen, J. N. Pedersen and R. Marie, *Nat. Commun.*, 2020, **11**, 23337.
- 29 M. Danaei, M. Dehghankhold, S. Ataei, F. Hasanzadeh Davarani, R. Javanmard, A. Dokhani, S. Khorasani and M. R. Mozafari, *Pharmaceutics*, 2018, **10**, 57.
- 30 P. V. Kamat, *J. Phys. Chem. B*, 2002, **106**, 7729–7744.
- 31 J. J. Mock, M. Barbic, D. R. Smith, D. A. Schultz and S. Schultz, *J. Chem. Phys.*, 2002, **116**, 6755–6759.
- 32 C. H. N. Barros, S. Fulaz, D. Stanistic and L. Tasic, *Antibiotics*, 2018, **7**, 69.
- 33 S. S. dos Santos, R. A. A. de Couto, I. R. da Silva, M. R. M. Aouada, V. R. L. Costantino, L. P. da Costa and G. F. Perotti, *J. Braz. Chem. Soc.*, 2023, **34**, 705–712.
- 34 L. Du, X. Lei, J. Wang, L. Wang, Q. Zhong, X. Fang, P. Li, B. Du, Y. Wang and Z. Liao, *Int. Rev. Immunol.*, 2022, **41**, 45–56.
- 35 G. Gahlawat and A. R. Choudhury, *RSC Adv.*, 2019, **9**, 12944–12967.
- 36 S. K. Kailasa, T. J. Park, J. V. Rohit and J. R. Koduru, *Nanopart. Pharmacother.*, 2019, **15**, 2555–2562.
- 37 R. M. Elamawi, R. E. Al-Harbi and A. A. Hendi, *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 2018, **28**, 28.
- 38 D. Wang, B. Xue, L. Wang, Y. Zhang, L. Liu and Y. Zho, *Sci. Rep.*, 2021, **11**, 10356.
- 39 F. Pizzo, D. Gadaleta and E. Benfenati, *Methods Mol. Biol.*, 2022, **1425**, 163–176.
- 40 Y. Kadowaki, T. Hirano, K. Fujita, T. Kawano, T. Matsunaga, K. Yoshinaga and M. Suzuki, *Auris, Nasus, Larynx*, 2021, **48**, 57–64.
- 41 K. Vinasco, H. M. Mitchell, N. O. Kaakoush and N. Castaño-Rodríguez, *Biochim. Biophys. Acta, Rev. Cancer*, 2019, **1872**, 188309.
- 42 M. Zhao, Z. Jiang, H. Cai, Y. Li, Q. Mo, L. Deng, H. Zhong, T. Liu, H. Zhang, J. X. Kang and F. Fenga, *mBio*, 2020, **11**, 190.
- 43 D. Ballottin, S. Fulaz, F. Cabrini, J. Tsukamoto, N. Durán, O. L. Alves and L. Tasic, *Mater. Sci. Eng., C*, 2017, **75**, 582–589.
- 44 C. H. N. de Barros, G. C. F. Cruz, W. Mayrink and L. Tasic, *Nanotechnol., Sci. Appl.*, 2018, **11**, 1–14.
- 45 Y. Yong, Y. Zhou, K. Liu, G. Liu, L. Wu and B. Fang, *Front. Microbiol.*, 2021, **12**, 759170.

- 46 T. H. Tseng, C. J. Wang, Y. J. Lee, Y. C. Shao, C. H. Shen, K. C. Lee, S. Y. Tung and H. C. Kuo, *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, **23**, 5102.
- 47 L. Tasic, N. Durán, W. J. Fávoro, S. Alborés and T. S. da Costa, *J. Braz. Chem. Soc.*, 2023, **34**, 897–905.
- 48 P. E. Porporato, N. Filigheddu, J. M. B. S. Pedro, G. Kroemer and L. Galluzzi, *Cell Res.*, 2018, **28**, 265–280.
- 49 X. Fu, Y. Shi, T. Qi, S. Qiu, Y. Huang, X. Zhao, Q. Sun and G. Lin, *Signal Transduction Targeted Ther.*, 2020, **5**, 262.
- 50 J. Wang, Y. Li and G. Nie, *Nat. Rev. Mater.*, 2021, **6**, 766–783.
- 51 A. B. B. Oliveira, F. R. De Moraes, N. M. Candido, I. Sampaio, A. S. Paula, A. De Vasconcellos, T. C. Silva, A. H. Miller, P. Rahal, J. G. Nery and M. F. Calmon, *J. Proteome Res.*, 2016, **15**, 4337–4348.