

Síntesis verde de nanopartículas de oro con polifenoles de cáscaras de Xoconostle y su actividad antiproliferativa en líneas celulares de carcinoma de pulmón humano (A549)

Green synthesis of gold nanoparticles with polyphenols from Xoconostle husks and their antiproliferative activity in human lung carcinoma cell lines (A549).

Beatriz del Carmen Coutiño Laguna^{1,2*}, Sandra Cecilia Esparza González¹, Adriana Carolina Flores Gallegos¹, Juan Alberto Ascasio Valdés¹, Iliná Anna¹, Aidé Sáenz Galindo¹, Adali Olivia Castañeda Facio¹, Thania Alejandra, Urrutia Hernández² y Raúl Rodríguez Herrera¹

¹ Universidad Autónoma de Coahuila. Boulevard V. Carranza y J. Cárdenas Valdés s/n, Col. República, CP 25280, Saltillo, Coahuila, México. Tel. (844) 416-1238 y 416-9213

² Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Rancho Universitario. Av. Universidad Km. 1, Ex-Hda. de Aquetzalpa AP, 32. CP 43600, Tulancingo, Hgo. Tel. (01 775) 755 2755.
beatriz_coutino@uaeh.edu.mx*

Resumen

El cáncer de pulmón es una de las principales causas de muerte por cáncer en todo el mundo. Aunque la eficacia de los tratamientos actuales es implacablemente parcial, las tasas de mortalidad siguen siendo elevadas. Así pues, la nanotecnología a través de la nanomedicina es una herramienta prometedora en distintos campos de las ciencias de la vida para el tratamiento de diversas enfermedades. En este sentido, se sintetizaron nanopartículas de oro (AuNPs) como nanopartículas anticancerígenas biológicamente activas mediante el método de síntesis verde, simple y respetuoso con el medio ambiente utilizando polifenoles de cáscaras de xoconostle (Xo) y se caracterizaron mediante análisis de difracción de rayos X (XRD) que reveló la naturaleza cristalina de las AuNPs. Las medidas de microscopía electrónica de transmisión (TEM) mostraron que las AuNPs biosintetizadas de Xo eran principalmente esféricas con un tamaño medio de 5-100 nm, el análisis de dispersión dinámica de la luz (DLS) indicó que las AuNPs tenían un tamaño de 100 nm. Tras la caracterización de las Xo-AuNPs, se evaluó su potencial citotóxico frente a líneas celulares de cáncer de pulmón (A549) y de fibroblastos NIH3T3 empleando ensayos MTT y LDH. El ensayo MTT reveló que las AuNPs producen toxicidad en función de la dosis contra el crecimiento de las células A549 e indicó la naturaleza no tóxica de las Xo-AuNPs para las células de fibroblastos NIH3T3 a 500 µg/mL. Estos resultados indican que las Xo-AuNPs son agentes estabilizadores apropiados y poseen potentes efectos antiproliferativos contra A549. Por lo tanto, las Xo-AuNPs dopados de polifenoles los cuales potencializan sus actividades antiproliferativas, podrían ser portadores prometedores de fármacos y una estrategia terapéutica contra el cáncer.

Abstract

Cancer is one of the leading causes of cancer deaths worldwide. Although the efficiency of current treatments is relentlessly partial, mortality rates are still high. Thus, nanotechnology through nanomedicine is a promising tool for different fields of life sciences for the treatment of various diseases. In this regard, gold nanoparticles (AuNPs) as anticancer biologically active nanoparticles were synthesized through the green, simple and environmentally friendly synthesis method using polyphenols from xoconostle (Xo) husks they were characterized by X-ray diffraction (XRD) analysis revealed the crystalline nature of AuNPs, by Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy for determining the functional groups responsible for reducing gold ions and capping AuNPs, Transmission electron microscopy (TEM) measurements showed that the biosynthesized Xo-AuNPs were mainly spherical with an average size of 5-100 nm, and dynamic light scattering (DLS) analysis indicated that AuNPs had an approximate size around 100 nm. After the characterization of these synthesized AuNPs, their cytotoxic potential was evaluated against lung cancer cell lines (A549) and NIH3T3 fibroblast cells line employing MTT and LDH tests. MTT assay revealed that AuNPs produce toxicity based on the dose-dependent against A549 cells growth and indicated the non-toxic nature of AuNPs for NIH3T3 fibroblast cells at 500 µg/mL. These results point out that the Xo-AuNPs are apposite stabilizing agents and possess potent antiproliferative effects against A549 cell lines. Therefore, polyphenol-doped Xo-AuNPs, which enhance their antiproliferative activities, could be promising drug carriers and a therapeutic strategy against cancer.

Palabras clave: Antiproliferativo, líneas celulares de carcinoma de pulmón humano (A549), *Cylindropuntia imbricata*, nanopartículas de oro (AuNPs), polifenoles.

Keywords: Antiproliferative, human lung carcinoma cell lines (A549), *Cylindropuntia imbricata*, gold nanoparticles (AuNPs), polyphenols.

Introducción

En la actualidad, el cáncer sigue siendo una grave amenaza para la salud pública, con tasas de mortalidad en aumento tanto en los países desarrollados como en los países en desarrollo, con 9,6 millones de muertes por cáncer y 18,1 millones de nuevos casos en todo el mundo en 2018 (Bray et al., 2018; Datkhile et al., 2021). Sin embargo, para 2027 se estima que la tasa de mortalidad aumentará en un 70%, causada principalmente por el cáncer de mama, próstata, pulmón y colorrectal. Entre los principales tipos de cáncer, el cáncer de pulmón (CP) contribuye a una cuarta parte de las tasas de mortalidad por cáncer, y también tiene una tasa de supervivencia de solo el 17,8% (Zhang et al., 2019). El CP se considera la principal causa de muerte en todo el mundo, afectando tanto a hombres como a mujeres por ser uno de los cánceres más letales y extendidos (Momchilova et al., 2022; B. Sun et al., 2019), caracterizado por dos tipos principales de cáncer de pulmón, siendo el más común el CP de células no pequeñas de crecimiento lento. Mientras que el CP de células pequeñas es más agresivo y menos frecuente (Knox, 2021; Momchilova et al., 2022). En este sentido, recientemente la aplicación de la nanotecnología en nanomedicina busca revolucionar los materiales y técnicas para el diagnóstico y tratamiento del cáncer, ya que la nanotecnología tiene la capacidad de aumentar la selectividad y aumentar el efecto de los tratamientos para atacar y estimular la muerte de las células cancerosas minimizando los efectos secundarios en las células sanas (Gmeiner & Ghosh, 2014; Lorenzo-Anota et al., 2021). Por otro lado, diversos estudios indican que las plantas poseen metabolitos secundarios tales como alcaloides, esteroides, y compuestos fitoquímicos (flavonoides). Estos últimos actúan como agentes reductores y convierten las sales metálicas en nanopartículas metálicas (Singh et al., 2021). Además, ejercen actividades biológicas y ayudan a prevenir diversas enfermedades como la osteoporosis, diabetes mellitus, cáncer, enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas (Abbas et al., 2017). Por lo tanto, los frutos de *C. imbricata* poseen compuestos bioactivos como ácidos fenólicos, ácido cafeoil tartárico, ácido 5-5'-dehidrodiferúlico, flavonoides como sinensetina, catequina, dihidroquercetina, quercetina, delphinidina y algunos taninos, que han demostrado ejercer capacidades antioxidantes (Coutiño-Laguna et al., 2022). De manera que pueden ejercer propiedades medicinales y mecanismos de acción para combatir enfermedades como la diabetes y el cáncer (Balandrán-Quintana et al., 2019).

Introduction

Today, cancer remains a serious public health threat, with mortality rates rising in both developed and developing countries, with 9.6 million cancer deaths and 18.1 million new cases worldwide in 2018 (Bray et al., 2018; Datkhile et al., 2021). However, by 2027, the mortality rate is estimated to increase by 70%, caused mainly by breast, prostate, lung and colorectal cancer. Among the major cancer types, lung cancer (LC) contributes to a quarter of cancer mortality rates, and also has a survival rate of only 17.8% (Zhang et al., 2019). LC is considered the leading cause of death worldwide, affecting both men and women as one of the most lethal and widespread cancers (Momchilova et al., 2022; Sun et al., 2019), characterized by two main types of lung cancer, the most common being slow-growing non-small cell LC. While small cell LC is more aggressive and less frequent (Knox, 2021; Momchilova et al., 2022). In this sense, recently the application of nanotechnology in nanomedicine seeks to revolutionize materials and techniques for the diagnosis and treatment of cancer, as nanotechnology has the ability to increase the selectivity and enhance the effect of treatments to target and stimulate the death of cancer cells while minimising side effects on healthy cells (Gmeiner & Ghosh, 2014; Lorenzo-Anota et al., 2021). On the other hand, several studies indicate that plants possess secondary metabolites such as alkaloids, steroids, and phytochemical compounds (flavonoids). The latter act as reducing agents and convert metal salts into metal nanoparticles (Singh et al., 2021). In addition, they exert biological activities and help prevent various diseases such as osteoporosis, diabetes mellitus, cancer, cardiovascular and neurodegenerative diseases (Abbas et al., 2017). Therefore, the fruits of *C. imbricata* possess bioactive compounds such as phenolic acids, caffeoyl tartaric acid, 5-5'-dehidrodiferulic acid, flavonoids such as sinensetin, catechin, dihydroquercetin, quercetin, delphinidin and some tannins, which have been shown to exert antioxidant capacities (Coutiño-Laguna et al., 2022). Thus, they may exert medicinal properties and mechanisms of action to combat diseases such as diabetes and cancer (Balandrán-Quintana et al., 2019).

Materiales y métodos

Los frutos de Xoconostle *Cylindropuntia imbricata* (Haw.) F.M. Knuth (Xo) fueron colectados en el poblado «El Garambullo» ubicado a la latitud: 25°03'46.0 »N, longitud: -101°29'27.9 »W, y altitud: 2050 msnm. La obtención del extracto y fracción rica en polifenoles a partir de cáscaras de Xo se realizó de acuerdo con el método descrito en estudios previos utilizando el equipo de extracción asistida por ultrasonido-microondas (UMAE) (Coutiño-Laguna et al., 2022). La síntesis de las AuNPs utilizando extracto de *C. imbricata* se derivó por reducción de Au^{3+} a Au^0 utilizando solución de HAuCl_4 de 1 mM de Hidrógeno tetracloroaurato (III) trihidrato ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) según la metodología descrita por Mukherjee et al., 2012. Las caracterizaciones de las Xo-AuNPs se realizaron con la ayuda de diferentes técnicas nanotecnológicas. La fase cristalina y la composición de las AuNPs sintetizadas se midieron mediante análisis de difracción de rayos X (DRX), la detección de enlaces covalentes de posibles grupos funcionales de biomoléculas de cáscara se examinó mediante espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR), el tamaño y el diámetro dinámico de las nanopartículas mediante tecnología de dispersión dinámica de luz (DLS). Por último, se utilizó microscopía electrónica de transmisión (TEM) para determinar el tamaño y la morfología de las Xo-AuNPs. Tras la caracterización de las AuNPs sintetizadas, se evaluó su potencial citotóxico frente a líneas celulares de cáncer de pulmón (A549) y fibroblastos NIH3T3 mediante ensayos MTT (Datkhile et al., 2021) y LDH (Gurunathan et al., 2014).

Materials and methods

Xoconostle *Cylindropuntia imbricata* (Haw.) F.M. Knuth fruits (Xo) were collected at the “El Garambullo” town located at latitude: 25°03'46.0"N, longitude: -101°29'27.9"W, and altitude: 2050 masl. The extract and polyphenols rich fraction obtention from Xo husks were carried out according to the method described in previous studies using the equipment Ultrasound–Microwave assisted extraction (UMAE) (Coutiño-Laguna et al., 2022). The synthesis of the AuNPs using *C. imbricata* extract was derived by reduction of Au^{3+} to Au^0 using HAuCl_4 solution of 1 mM Hydrogen tetrachloroaurate (III) trihydrate ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) according to the methodology described by Mukherjee et al., 2012. Therefore, Characterizations of Xo-AuNPs were done with the help of different nanotechnology techniques. The crystalline phase and composition of synthesized AuNPs were measured by X-ray diffraction (XRD) analysis, Detection of covalent bonds of possible functional groups from husks biomolecules were examined by Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy, Size and dynamic diameter of the nanoparticles using dynamic light scattering (DLS) technology. Finally, Transmission electron microscopy (TEM) was used to determine the size, and morphology of Xo-AuNPs. Following, characterization of these synthesized AuNPs, their cytotoxic potential against lung cancer cell lines (A549) and NIH3T3 fibroblasts was evaluated using MTT assay (Datkhile et al., 2021) and LDH assays (Gurunathan et al., 2014).

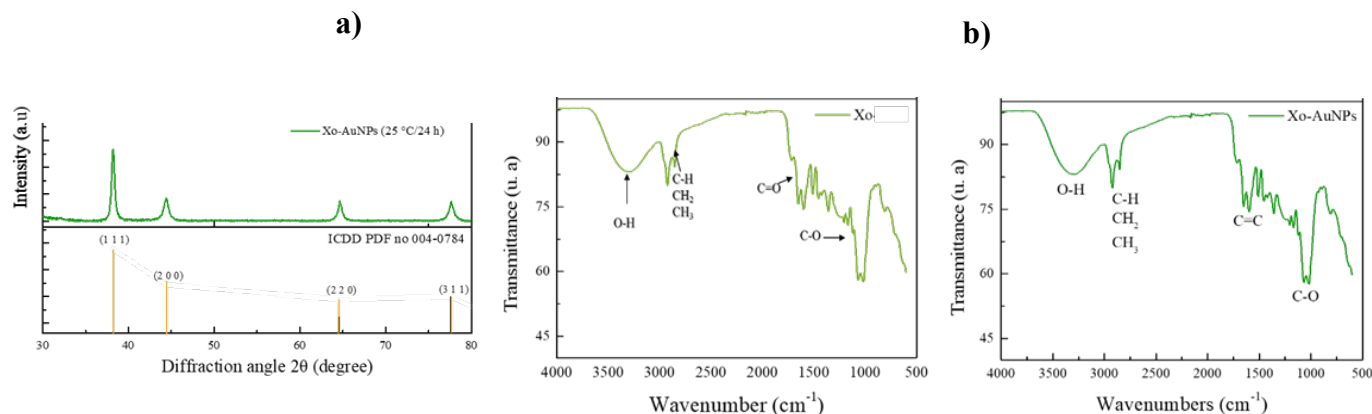
Resultados y discusión

Las nanopartículas de oro (AuNPs) sintetizadas mediante el método de síntesis verde utilizando polifenoles de cáscaras de xoconostle (Xo) demostraron que pueden actuar como agentes reductores para la conversión de iones Au^{3+} en Au^0 , debido a la presencia de O-H en los polifenoles, esos electrones se transfieren a Au^{3+} y se reducen a Au^0 (Doan et al., 2020; Latha et al., 2019). La caracterización de las Xo-AuNPs mediante el análisis XRD reveló la naturaleza cristalina de las AuNPs mediante picos predominantes en el patrón de difracción XRD, característicos en ángulos 2θ de 38°, 44°, 64° y 77°, que pueden correlacionarse y que están indexados en los planos típicos de reflexión de Bragg de XRD en (1 1 1), (2 0 0), (2 2 0) y (3 1 1) y reflejados con el archivo de datos estándar (ICDD PDF no 004-0784) (Ver Fig. 1a). El FTIR reveló espectros de las Xo-AuNPs (Fig. 1b) observando bandas anchas centradas en $3380\text{--}3100\text{ cm}^{-1}$ que se asignan a las vibraciones de estiramiento de los grupos O-H de alcaloides, lignanos, esteroides y principalmente a flavonoides, presentados en los polifenoles de la cáscara (Doan et al., 2020). El tamaño y la forma de las nanopartículas se confirmaron mediante análisis TEM (Fig. 1c), que demuestran que las Xo-AuNPs tienen forma esférica y son casi monodispersas, aunque en algunos casos se aprecia una pequeña agregación, y sus tamaños medios son de ~50-100 nm, resultados que concuerdan con las diferentes familias de planos cristalográficos (111), (200), (220) y (311) de la estructura cúbica pura centrada en la cara del oro (Latha et al., 2019). Los diferentes tamaños hidrodinámicos de las AuNPs medidos por DLS y TEM indicaron que las AuNPs sintetizadas con polifenoles de las cáscara de Xo podían estar rodeadas por una densa capa de polifenoles como: quercetina, kaempferol, ácido elágico, epicatequina, y otros. Estos compuestos juegan un papel importante en la separación de las AuNPs, evitando la coagulación y aglomeración para mantenerlas estables en suspensión coloidal y obteniendo posibles formas esféricas (Doan et al., 2020; Mukherjee et al., 2012), debió probablemente a la envoltura de polifenoles (De Matteis et al., 2021). Finalmente, El IC_{50} de las Xo-AuNPs necesario para inhibir el crecimiento de las células A549 tras 24 h de exposición fue de 439 $\mu\text{g/mL}$.

para las Xo-AuNPs y se observó una inhibición máxima del crecimiento (~50-60 %) de las células A549. Curiosamente, se observó que las células NIH3T3 tratadas con Xo-AuNPs no mostraban efectos citotóxicos significativos que redujeran la viabilidad celular a concentraciones de 62.5-500 µg/mL. Sin embargo, las nanopartículas exhibieron un efecto citotóxico a la concentración más alta (1000 µg/mL) para Xo-AuNPs, lo que sugiere que las AuNPs sintetizadas poseen propiedades biocompatibles para la entrega de polifenoles (Gurunathan et al., 2014; B. Sun et al., 2019), y son inductores selectivos de muerte celular solo en células cancerosas (Ahn et al., 2018; B. Sun et al., 2019). Al causar efectos citotóxicos como la disminución de la función mitocondrial y la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) (Botha et al., 2019; Siva et al., 2021). Estos resultados indican que las Xo-AuNPs son agentes estabilizadores apropiados y poseen potentes efectos antiproliferativos contra las líneas celulares A549.

Results and Discussion

Gold nanoparticles (AuNPs) synthesized by green synthesis method using polyphenols from xoconostle (Xo) shells showed that they can act as reducing agents for the conversion of Au^{3+} ions to Au^0 , due to the presence of O-H in the polyphenols, those electrons are transferred to Au^{3+} and reduced to Au^0 (Doan et al., 2020; Latha et al., 2019). Characterization of Xo-AuNPs by (XRD) analysis revealed the crystalline nature of AuNPs by predominant peaks in the XRD diffraction pattern, characteristic at 2θ angles of 38° , 44° , 64° and 77° , which can be correlated and which are indexed in the typical XRD Bragg reflection planes at (1 1 1), (2 0 0), (2 2 0) and (3 1 1) and mirrored with the standard data file (ICDD PDF no 004-0784) (See Fig. 1a). FTIR revealed spectra of the Xo-AuNPs (Fig. 1b) observing broad bands centred at $3380\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$ that are assigned to the stretching vibrations of the O-H groups of alkaloids, lignans, steroids and mainly flavonoids, present in the shell polyphenols (Doan et al., 2020). The size and shape of the nanoparticles were confirmed by TEM analysis (Fig. 1c), which show that the Xo-AuNPs are spherical in shape and almost monodisperse, although in some cases a small aggregation is visible, and their average sizes are ~50-100 nm, results that agree with the different crystallographic plane families (111), (200), (220) and (311) of the pure cubic structure centred on the gold face (Latha et al., 2019). The different hydrodynamic sizes of AuNPs measured by DLS (Fig. 1d) and TEM indicated that the AuNPs synthesized with Xo shell could be surrounded by a dense layer of polyphenols such as: quercetin, kaempferol, ellagic acid, epicatechin, and others. These compounds play an important role in the separation of AuNPs, preventing coagulation and agglomeration to keep them stable in colloidal suspension and obtaining possible spherical shapes (Doan et al., 2020; Mukherjee et al., 2012), probably due to the polyphenol envelope (De Matteis et al., 2021). Finally, The IC_{50} of Xo-AuNPs required to inhibit A549 cell growth after 24 h of exposure was 439 µg/mL for Xo-AuNPs and a maximum growth inhibition (~50-60 %) of A549 cells was observed (Fig. 1e). Interestingly, it was observed that NIH3T3 cells treated with Xo-AuNPs did not show significant cytotoxic effects that reduced cell viability at concentrations of 62.5-500 µg/mL. However, the nanoparticles exhibited a cytotoxic effect at the highest concentration (1000 µg/mL) for both Xo-AuNPs, suggesting that the synthesized AuNPs possess biocompatible properties for polyphenol delivery (Gurunathan et al., 2014; Sun et al., 2019), and are selective inducers of cell death only in cancer cells (Ahn et al., 2018; B. Sun et al., 2019). By causing cytotoxic effects such as decreased mitochondrial function and lactate dehydrogenase (LDH) release (Botha et al., 2019; Siva et al., 2021). These results indicate that Xo-AuNPs are suitable stabilizing agents and possess potent anti-proliferative effects against A549 cell lines.



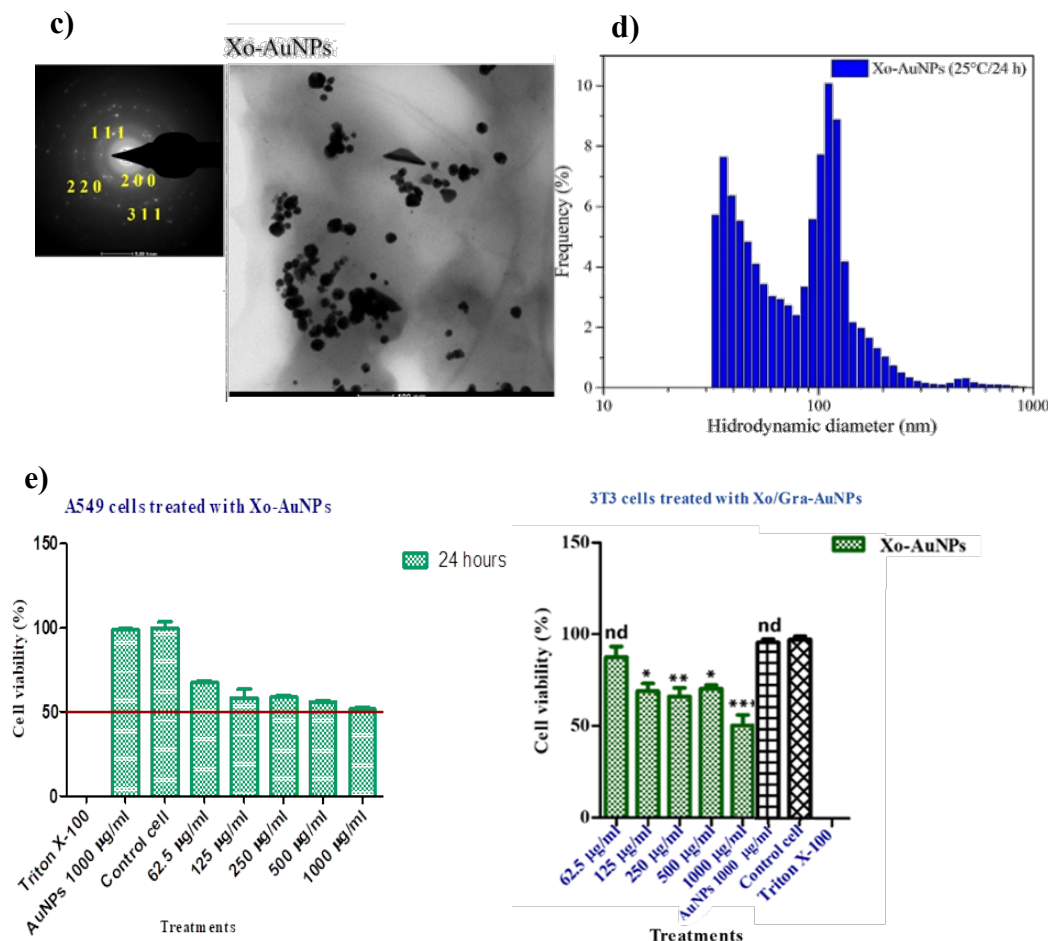


Figura 1. a) Patrón de difracción de rayos X de las AuNPs sintetizadas con polifenoles obtenidos de Xo; b) FT-IR PRF obtenido de los extractos de cáscara de Xo antes de la síntesis, y espectros FT-IR de las Xo-AuNPs; c) Análisis TEM de las Xo-AuNPs; d) Histograma de distribución de tamaños de las Xo-AuNPs obtenidos a partir de las distribuciones de diámetros DLS; e) Efecto de las Xo-AuNPs sintetizadas sobre la viabilidad celular de las células humanas de cáncer de pulmón A549 y de las células NIH3T3.

Figure 1. a) X-ray diffraction pattern of synthesized AuNPs with polyphenols obtained from Xo; b) FT-IR PRF obtained from Xo husk extracts before the synthesis, and FT-IR spectra of Xo-AuNPs; c) TEM analysis of Xo-AuNPs; d) Size distribution histogram of Xo-AuNPs obtained from DLS diameter distributions; e) Effect of synthesized Xo-AuNPs on cell viability of A549 human lung cancer cells and NIH3T3 cells.

Conclusiones

Las Xo-AuNPs sintetizadas poseen formas esférica de pequeño tamaño, rodeadas por una capa visible de polifenoles. En consecuencia, se corrobora que las Xo-AuNPs sintetizadas indujeron citotoxicidad en células A549, demostrando que las AuNPs penetraron a través de la membrana celular y causaron cambios ultraestructurales como efecto citotóxico por la liberación de la enzima LDH desde el citoplasma celular al medio de cultivo resultando en daño de la membrana y lisis celulares, pero sin causar daño citotóxico significativo en células NIH3T3. Por lo tanto, estos resultados indican que las Xo-AuNPs son agentes estabilizadores apropiados y poseen potentes efectos antiproliferativos contra las líneas celulares A549.

Conclusions

The synthesized Xo-AuNPs possess small spherical shapes, surrounded by a visible layer of polyphenols. Consequently, this research corroborates that the synthesized Xo-AuNPs induced cytotoxicity in A549 cells, demonstrating that the AuNPs penetrated through the cell membrane and caused ultrastructural changes as a cytotoxic effect by the release of the LDH enzyme from the cell cytoplasm into the culture medium resulting in cell membrane damage and cell lysis, but without causing significant cytotoxic damage in NIH3T3 cells. Therefore, these results indicate that Xo-AuNPs are suitable stabilizing agents and possess potent anti-proliferative effects against A549 cell lines.

Agradecimientos

BCCL agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo financiero durante sus estudios de doctorado. Se recibió apoyo financiero de SAGARPA-CONACyT a través del proyecto: 'Obtención, purificación y escalado de compuestos de extractos bioactivos con valor industrial, obtenidos usando tecnología avanzada de extracción y a partir de cultivos, subproductos y recursos naturales poco valorados' SAGARPA-CONACyT 2015-4-266936.

Acknowledgements

BCCL thanks the National Council of Science and Technology (CONACYT) for the financial support during her Ph. D. studies. Financial support was received from SAGARPA-CONACyT through the project: "Obtención, purificación y escalado de compuestos de extractos bioactivos con valor industrial, obtenidos usando tecnología avanzadas de extracción y a partir de cultivos, subproductos y recursos naturales poco valorados" SAGARPA-CONACyT 2015-4-266936.

Bibliografía/Referencias

- Abbas, M., Saeed, F., Anjum, F. M., Afzaal, M., Tufail, T., Bashir, M. S., Ishtiaq, A., Hussain, S., & Suleria, H. A. R. (2017). Natural polyphenols: An overview. *International Journal of Food Properties*, 20(8), 1689–1699. <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1220393>
- Ahn, E. Y., Hwang, S. J., Choi, M. J., Cho, S., Lee, H. J., & Park, Y. (2018). Upcycling of jellyfish (*Nemopilema nomurai*) sea wastes as highly valuable reducing agents for green synthesis of gold nanoparticles and their antitumor and anti-inflammatory activity. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 46(sup2), 1127–1136. <https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1480490>
- Balandrán-Quintana, R. R., González-León, A., Islas-Rubio, A. R., Madera-Santana, T. J., Soto-Valdez, H., Mercado-Ruiz, J. N., Peralta, E., Robles-Osuna, L. E., Vásquez-Lara, F., Carvallo-Ruiz, T., Granados-Nevarez, M. C., Martínez-Núñez, Y. Y., & Montoya-Ballesteros, L. C. (2019). An overview of cholla (*Cylindropuntia* spp.) from Sonora, Mexico. *Journal of the Professional Association for Cactus Development*, 20(20), 162–176. <https://doi.org/10.56890/jpacd.v20i.35>
- Botha, T. L., Elemike, E. E., Horn, S., Onwudiwe, D. C., Giesy, J. P., & Wepener, V. (2019). Cytotoxicity of Ag, Au and Ag-Au bimetallic nanoparticles prepared using golden rod (*Solidago canadensis*) plant extract. *Scientific Reports*, 9(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40816-y>
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Coutiño-Laguna, B. del C., Flores Gallegos, A. C., Ascacio Valdés, J. A., Iliná, A., Galindo, A. S., Castañeda Facio, A. O., Esparza González, S. C., & Herrera, R. R. (2022). Physicochemical and functional properties of the undervalued fruits of cactus *Cylindropuntia imbricate* ("xoconostle") and antioxidant potential. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 39(December 2021). <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102245>
- Datkhile, K. D., Patil, S. R., Durgawale, P. P., Patil, M. N., Hinge, D. D., Jagdale, N. J., Deshmukh, V. N., & More, A. L. (2021). Biogenic synthesis of gold nanoparticles using *Argemone mexicana* L. and their cytotoxic and genotoxic effects on human colon cancer cell line (HCT-15). *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s43141-020-00113-y>
- De Matteis, V., Cascione, M., Rizzello, L., Manno, D. E., Di Guglielmo, C., & Rinaldi, R. (2021). Synergistic effect induced by gold nanoparticles with polyphenols shell during thermal therapy: Macrophage inflammatory response and cancer cell death assessment. *Cancers*, 13(14). <https://doi.org/10.3390/cancers13143610>
- Doan, V. D., Huynh, B. A., Nguyen, T. D., Cao, X. T., Nguyen, V. C., Nguyen, T. L. H., Nguyen, H. T., & Le, V. T. (2020). Biosynthesis of Silver and Gold Nanoparticles Using Aqueous Extract of *Codonopsis pilosula* Roots for Antibacterial and Catalytic Applications. *Journal of Nanomaterials*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/8492016>
- Gmeiner, W. H., & Ghosh, S. (2014). Nanotechnology for cancer treatment. *Nanotechnology Reviews*, 3(2), 111–122. <https://doi.org/10.1515/ntrev-2013-0013>

- Gurunathan, S., Han, J. W., Park, J. H., & Kim, J. H. (2014). A green chemistry approach for synthesizing biocompatible gold nanoparticles. *Nanoscale Research Letters*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-9-248>
- Knox, J. (2021). Types of Lung Cancer Squamous Cell Lung Cancer. *Verywellhealth*, 1–9. <https://www.lungevity.org/for-patients-caregivers/lung-cancer-101/types-of-lung-cancer/squamous-cell-lung-cancer>
- Lorenzo-Anota, H. Y., Zarate-Triviño, D. G., Uribe-Echeverría, J. A., Ávila-ávila, A., Rangel-López, J. R., Martínez-Torres, A. C., & Rodríguez-Padilla, C. (2021). Chitosan-coated gold nanoparticles induce low cytotoxicity and low ros production in primary leucocytes, independent of their proliferative status. *Pharmaceutics*, 13(7). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13070942>
- Momchilova, A., Pankov, R., Staneva, G., Pankov, S., Krastev, P., Vassileva, E., Hazarosova, R., Krastev, N., Robev, B., Nikolova, B., & Pinkas, A. (2022). Resveratrol Affects Sphingolipid Metabolism in A549 Lung Adenocarcinoma Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 1–15. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ijms231810870>
- Singh, T., Jayaprakash, A., Alsuwaidi, M., & Madhavan, A. A. (2021). Green synthesized gold nanoparticles with enhanced photocatalytic activity. *Materials Today: Proceedings*, 42, 1166–1169. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.12.531>
- Mukherjee, Sudip, Sushma, V., Patra, S., Barui, A. K., Bhadra, M. P., Sreedhar, B., & Patra, C. R. (2012). Green chemistry approach for the synthesis and stabilization of biocompatible gold nanoparticles and their potential applications in cancer therapy. *Nanotechnology*, 23(45). <https://doi.org/10.1088/0957-4484/23/45/455103>
- Sun, B., Hu, N., Han, L., Pi, Y., Gao, Y., & Chen, K. (2019). Anticancer activity of green synthesised gold nanoparticles from *Marsdenia tenacissima* inhibits A549 cell proliferation through the apoptotic pathway. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 47(1), 4012–4019. <https://doi.org/10.1080/21691401.2019.1575844>