

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
DOUTORADO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM CLÍNICA INTEGRADA

ROBERTA FERRETI BONAN DANTAS BATISTA

**PROPRIEDADES ANTIMICROBIANA E ANTITUMORAL *IN VITRO* DE
NANOFIBRAS DE TITÂNIO CONTENDO NANOPARTÍCULAS DE PRATA
PRODUZIDAS POR FIAÇÃO POR SOPRO EM SOLUÇÃO**

Recife
2019

ROBERTA FERRETI BONAN DANTAS BATISTA

**PROPRIEDADES ANTIMICROBIANA E ANTITUMORAL *IN VITRO* DE
NANOFIBRAS DE TITÂNIO CONTENDO NANOPARTÍCULAS DE PRATA
PRODUZIDAS POR FIAÇÃO POR SOPRO EM SOLUÇÃO**

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de doutora em Odontologia.

Área de concentração: Clínica Integrada.

Orientador: Prof. Dr. Danyel Elias da Cruz Perez

Coorientador: Prof. Dr. Romualdo Rodrigues Menezes

Recife

2019

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

B333p Batista, Roberta Ferreti Bonan Dantas.
 Propriedades antimicrobiana e antitumoral *in vitro* de nanofibras de
 titânio contendo nanopartículas de prata produzidas por fiação por sopro
 em solução / Roberta Ferreti Bonan Dantas Batista. – 2019.
 80 f.: il.

 Orientador: Danyel Elias da Cruz Perez.
 Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
 Programa de Pós-graduação em Odontologia. Recife, 2019.

 Inclui referências e apêndices.

 1. Titânio. 2. Prata. 3. Nanotecnologia. 4. Fiação por sopro em
 solução. 5. Atividade antitumoral. I. Perez, Danyel Elias da Cruz
 (Orientador). II. Título.

617.6 CDD (20.ed.) UFPE (CCS2019-219)

ROBERTA FERRETI BONAN DANTAS BATISTA

**PROPRIEDADES ANTIMICROBIANA E ANTITUMORAL *IN VITRO* DE
NANOFIBRAS DE TITÂNIO CONTENDO NANOPARTÍCULAS DE PRATA
PRODUZIDAS POR FIAÇÃO POR SOPRO EM SOLUÇÃO**

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de doutora em Odontologia.

Aprovado em: 21/08/2019

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Danyel Elias da Cruz Perez (Orientador)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Gustavo Pina Godoy (Examinador interno)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Luiz Alcino Monteiro Gueiros (Examinador interno)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Sabrina Garcia de Aquino (Examinador externo)

Universidade Federal da Paraíba

Prof. Dr. Robinsom Viégas Montenegro (Examinador externo)

Dedico esse trabalho ao meu filho Guilherme, por me fazer renascer no papel de mãe e por me preencher com esse novo amor tão grandioso e sublime.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sempre guiar meus passos nessa grande jornada. Aos meus pais, Evinha e Laercio (*in memorian*), meu esposo André, meu irmão Paulo, minha cunhada Silvana e minha sobrinha Bia, por representarem minha base sólida, baseada no amor, para onde eu sempre me volto em todos os momentos da minha vida, com quem eu compartilho minhas alegrias e tristezas, e onde eu encontro sempre o apoio de que preciso.

Ao professor e orientador, Danyel Elias da Cruz Perez, por todos os ensinamentos, pela disponibilidade e confiança. Um grande exemplo a ser seguido, pelo caráter formidável e pelo profissionalismo baseado na dedicação e paixão pelo que faz. Muito obrigada!

Ao professor e coorientador, Romualdo Rodrigues Menezes, pelos anos de convivência, pela amizade, pelos ensinamentos e suporte indispensáveis pela execução desse trabalho. Obrigada!

À Dra Sabrina Daniela Silva e ao Dr. Paulo Rogério Ferreti Bonan pelo suporte técnico-científico na execução dos testes de citotoxicidade.

Ao Professor Eliton Souto de Medeiros, pelo apoio em todas as ocasiões em que precisei, e pela genialidade de suas criações, em especial o solution blow spinning.

À Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, na pessoa do reitor Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado e ao Programa de Pós-graduação em Odontologia, na pessoa do coordenador Prof. Dr. Jair Carneiro Leão, pela oportunidade, pelo acolhimento e ensinamentos transmitidos.

A todos os docentes e técnicos do Programa de Pós-graduação em Odontologia por todo apoio e suporte fornecidos. A todos os amigos da Pós-Graduação pelos grandes momentos de aprendizado e diversão compartilhados.

Às amigas Rosiane e Mariaugusta por toda ajuda durante a produção das nanofibras.

Aos amigos que eu fiz pela vida, por existirem e fazerem tudo parecer mais leve.

RESUMO

A nanotecnologia é um campo multidisciplinar, responsável por inovações no que se refere à prevenção e combate de diversas doenças, incluindo o diagnóstico e terapia de combate ao câncer. O objetivo geral do estudo foi produzir nanofibras de dióxido de titânio dopadas com nanopartículas de prata (Ag/TiO₂), utilizando a técnica de fiação por sopro em solução (SBS), verificar as propriedades microestruturais e físicas das nanofibras produzidas, além de investigar *in vitro* a sua atividade antimicrobiana e antitumoral. As nanofibras de Ag/TiO₂ foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia eletrônica de transmissão (MET), adsorção/dessorção de N₂, difração de raios-X (DRX), espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS), ângulo de contato e espectrometria de emissão atômica por plasma acoplado indutivamente (ICP-AES). Além disso, foi avaliada *in vitro* a atividade antimicrobiana das nanofibras, através da técnica de difusão em disco, frente a *Staphylococcus aureus* (ATCC25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 14506) e *Escherichia coli* (ATCC 25922). A atividade citotóxica em linhagens de carcinoma escamoso oral de murino (AT-84) e de macrófagos (ATCC RAW 264.7) foi verificado, através da avaliação da morfologia celular (microscopia de contraste de fase), após 72 e 120h (linhagem tumoral) e 24h (macrófagos), em contato com 5 e 50mg.mL⁻¹ das nanofibras. A capacidade de migração da linhagem tumoral foi observada, através do teste de ferida, após contato por 48h, com 5 e 50mg.mL⁻¹ das nanofibras. Por fim, a expressão gênica de mTrp53, mMyc, mCasp8, mCasp9, mBax, mBcl2 e mGapdh, através da reação em cadeia da polimerase em tempo real, foi investigada. As nanofibras de TiO₂ com nanopartículas de prata (diâmetro médio de 15nm) foram produzidas com sucesso e apresentaram estrutura cristalina compatível com a fase do rutilo, além de característica mesoporosa e super-hidrofílica. A liberação de íons Ag⁺ nas concentrações de 5 mg.mL⁻¹ e 50 mg.mL⁻¹ de nanofibras de Ag/TiO₂ foi próxima a 0,08 µg.mL⁻¹ e 0,18 µg.mL⁻¹, respectivamente. Além disso, as nanofibras produzidas apresentaram atividade antimicrobiana contra os microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli*. A citotoxicidade em macrófagos e em células tumorais foi dependente da dose das nanofibras utilizada. A concentração de 5 mg.mL⁻¹ gerou supressão parcial da proliferação e da migração de células tumorais, enquanto a concentração de 50 mg.mL⁻¹ resultou em inibição completa da proliferação e migração de células AT-84.

Foi observado um aumento na expressão dos genes mbax, mMyc e mTrp53 para as células AT-84 e para os macrófagos após a exposição a nanofibras de Ag/TiO₂, bem como redução na expressão do gene mBcl2 para ambas as linhagens celulares testadas, indicando que as nanofibras de Ag/TiO₂ inibem o mecanismo celular por apoptose. A atividade antimicrobiana e antitumoral de nanofibras produzidas foram provavelmente resultado da combinação de sua dimensão nanométrica, alta reatividade superficial, interação atômica entre dióxido de titânio e a prata, com transferência de elétrons na interface metal-semicondutor e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), além da atividade biológica dos íons de prata liberados. Os resultados obtidos sugerem o potencial de uso das nanofibras produzidas na terapia local antimicrobiana e antitumoral.

Palavras-chave: Titânio. Prata. Nanotecnologia. Fiação por sopro em solução. Atividade antitumoral.

ABSTRACT

Nanotechnology is a multidisciplinary field of knowledge that brings new possibilities for the prevention and treatment of diseases, including cancer diagnosis and therapy. The general objective of the study was to produce Ag/TiO₂ nanofibers using the Solution Blow Spinning technique, to verify the microstructural and physical properties and to investigate *in vitro* its antimicrobial and anticancer activity for future biomedical applications. Nanosilver immobilized on TiO₂ nanometric fibers (Ag/TiO₂) was produced by solution blow spinning technique and characterized using scanning electron microscope (SEM), transmission electron microscopy (TEM), N₂ adsorption/desorption, X-ray diffraction (XRD), X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), water contact angle and Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometry (ICP-AES) analyses. In addition, the *in vitro* antimicrobial activity of nanofibers was evaluated by disk diffusion technique, against *Staphylococcus aureus* (ATCC25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 14506) and *Escherichia coli* (ATCC 25922). The cytotoxic potential in oral squamous carcinoma (AT-84) and macrophage (ATCC RAW 264.7) cells was verified, by evaluating cell morphology (phase contrast inverted microscope), after 72 and 120h (tumor cells) and 24h (macrophages), in contact with 5 and 50mg.mL⁻¹ of the nanofibers. The migration potential of tumor cells was observed, through scratch assay, after 48h, in contact with 5 and 50mg.mL⁻¹ nanofibers. Finally, gene expression of mTrp53, mMyc, mCasp8, mCasp9, mBax, mBcl2 and mGapdh, by real time polymerase chain reaction, was investigated. TiO₂ nanofibers with silver nanoparticles (average diameter of 15nm) uniformly distributed on their surface were successfully produced. Ag/TiO₂ nanofibers revealed a crystalline structure compatible with the rutile crystalline phase, as well as a mesoporous and superhydrophilic nature. XPS profiles showed Ti⁴⁺ and Ag⁰, indicating a strong interaction between the Ag nanoparticles and TiO₂. The Ag/TiO₂ nanofibers presented antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, and *Escherichia coli*. The release of silver ions from 5 mg·mL⁻¹ and 50 mg·mL⁻¹ of Ag/TiO₂ nanofibers was approximately 0.08 µg·mL⁻¹ and 0.18 µg·mL⁻¹, respectively. The nanofiber cytotoxicity in both macrophages (ATCC RAW 264.7) and cancer cells (murine AT-84 oral squamous carcinoma cells) was dose-dependent. A concentration of 5 mg·mL⁻¹ induced partial suppression growth and migration of cancer cells, while a concentration of 50 mg·mL⁻¹ resulted in complete inhibition of proliferation and

migration of murine AT-84 cells. It was observed an increase in mbax, mMyc and mTrp53 genes expression for both Murine AT-84 cells and macrophages after exposure to Ag/TiO₂ nanofibers. On the other hand, there was a reduction in the mBcl2 gene for both cell lines tested. The overall result indicated that Ag/TiO₂ nanofibers could selectively inhibit the cellular mechanism of AT-84 by apoptosis with DNA damage and cell death. The antimicrobial and anticancer performance of Ag/TiO₂ nanofibers is probably the result of its nanometric dimension, high surface reactivity, and the interaction between TiO₂ and Ag. Electron transfer at the metal–semiconductor interface and reactive oxygen species production, in addition to the biological activity of released silver ions, confirm the potential for use as an agent in antimicrobial and anticancer therapy.

Keywords: Titanium. Silver. Nanotechnology. Solution blow spinning. Anticancer activity.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ag	Prata
AgNPs	Nanopartículas de prata
BC	Banda de condução
BV	Banda de valência
CCE	Carcinoma de células escamosas
cDNA	<i>Complementary DNA</i> (DNA complementar)
DDS	<i>Drug delivery system</i> (dispositivos de liberação controlada de fármacos)
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucleico)
DRX	Difração de raios-X
HPV	<i>Human papillomavirus</i> (papilomavírus humano)
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i> (Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer)
IC50	<i>The half maximal inhibitory concentration</i> (Concentração Inibitória para 50% das células)
ICD	<i>International Classification of Diseases</i> (Código internacional de doenças)
ICP-AES	<i>Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometry</i> (Espectrometria de Emissão Atômica por Plasma Acoplado Indutivamente)
OMS	Organização Mundial de Saúde
ncRNAs	RNAs não codificantes
nm	Nanômetro
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
mM	Milimolar
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> (Tampão fosfato-salino)
PCR	Polymerase Chain Reaction (reação em cadeia da polimerase)
pH	<i>potential of Hydrogen</i> (potencial Hidrogeniônico)
PVP	Poli(vinilpirrolidona)
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (ácido ribonucleico)
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> (espécies reativas de oxigênio)
SBS	<i>Solution blow spinning</i> (fiação por sopro em solução)
SFB	Soro fetal bovino

TiO ₂	Dióxido de titânio
XPS	<i>X-ray photoelectron spectroscopy</i> (Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X)
µm	Micrômetro
µM	Micromolar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	CÂNCER NO CONTEXTO MUNDIAL	14
1.2	CÂNCER ORAL	15
1.3	NANOTECNOLOGIA	17
1.3.1	Nanoestruturas	19
1.3.1.1	Nanopartículas	19
1.3.1.1.1	<i>AgNPs e ação antitumoral</i>	20
1.3.1.2	Nanofibras	21
1.3.1.2.1	<i>Nanofibras de TiO₂</i>	22
1.3.1.2.2	<i>TiO₂ e ação antitumoral</i>	25
1.4	APOPTOSE	26
2	OBJETIVOS	28
2.1	OBJETIVO GERAL	28
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
3	METODOLOGIA	29
3.1	MATERIAIS	29
3.2	PRODUÇÃO DAS NANOFIBRAS	30
3.3	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOFIBRAS	32
3.3.1	Microscopia eletrônica de varredura	32
3.3.2	Microscopia eletrônica de transmissão	33
3.3.3	Difração de raios-X	33
3.3.4	Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X	33
3.3.5	Adsorção/ dessorção de N₂	34
3.3.6	Ângulo de contato	34
3.3.7	Espectrometria de Emissão Atômica por Plasma Acoplado Indutivamente	35
3.4	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA <i>IN VITRO</i>	35
3.5	ATIVIDADE ANTITUMORAL <i>IN VITRO</i>	36
3.5.1	Cultura celular	36
3.5.2	Ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i>	36
3.5.3	Ensaio de migração <i>in vitro</i> (<i>scratch assay</i>)	37

3.5.4	Real-time PCR	37
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
4	CONCLUSÕES	39
	REFERÊNCIAS	40
	APÊNDICE A- ARTIGO APROVADO NO PERIÓDICO	47
	MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING C	

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, apesar dos grandes avanços na medicina, com novas descobertas e opções diagnósticas e terapêuticas, existem mais de 32,6 milhões de pessoas vivendo com câncer em todo o mundo, e a cada ano mais de 10 milhões de novos casos são diagnosticados^{3,4}. Ainda segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o câncer poderá gerar taxas de mortalidade global de aproximadamente 15 milhões de pessoas até 2020⁵. Entre os diferentes tipos de câncer, o de cabeça e pescoço é mundialmente considerado um dos 10 tipos de câncer mais comuns, sendo o subtipo oral o mais frequentemente encontrado¹.

Descobertas recentes em nanociência e nanotecnologia têm trazido inovações quanto à forma de se realizar o diagnóstico, tratamento e prevenção de diversas doenças, incluindo o câncer. Entre as nanoestruturas, as AgNPs são as mais extensamente estudadas, devido às suas inúmeras possibilidades de utilização, graças às suas conhecidas propriedades biológicas, tais como a atividade antimicrobiana, antifúngica, antiviral e também atividade antitumoral⁶.

A toxicidade das AgNPs depende de fatores como tamanho e forma da partícula, além da sua formulação e apresentação, que influenciam a taxa, extensão, localização e/ou momento da liberação de íons de prata. Portanto, seu uso deve ser feito preferencialmente combinado a um veículo, visando preservar sua estabilidade e dispersibilidade^{7,8}.

Nesse sentido, as nanofibras se destacam pelas características que favorecem seu uso como dispositivos de liberação controlada de fármacos, entre elas, a sua elevada área de superfície⁹. Entre os materiais que podem ser utilizados para produção das nanofibras, o TiO₂ se destaca por ser um material biocompatível e de baixo custo, com uso sedimentado em diversos dispositivos biomédicos¹⁰.

1.1 CÂNCER NO CONTEXTO MUNDIAL

O câncer é uma doença complexa e multifatorial, que se caracteriza pelo crescimento descontrolado e disseminação de células anormais, causado por fatores externos (tabaco, álcool, produtos químicos, radiação, vírus) e fatores internos (hormônios, condições imunológicas e mutações) que podem agir juntos ou em

sequência para promover a carcinogênese^{2,5,11}. De forma geral, seu tratamento pode incluir quimioterapia, radioterapia, cirurgia, terapia hormonal e terapia imunológica^{1,6,12}.

Os índices dos diferentes tipos de câncer variam significativamente entre as regiões geográficas, como por exemplo, o câncer oral, que embora seja menos comum em países desenvolvidos, está classificado entre as três principais causas de morte por câncer entre homens em países do sul da Ásia, como Índia, Bangladesh e Sri Lanka¹³, o que pode ser atribuído ao hábito de mascar betel e tabaco, infecção por papilomavírus humano (HPV), consumo de álcool e deficiência nutricional^{3,13}.

Entre os diferentes tipos de câncer, o de cabeça e pescoço, que inclui a cavidade oral, faringe, laringe, glândulas salivares, seios paranasais e cavidade nasal¹², é responsável por cerca de 6% de todas as doenças malignas diagnosticadas e, portanto, é atualmente a oitava causa principal de morte por câncer em todo o mundo¹.

1.2 CÂNCER ORAL

Entre os sítios de câncer de cabeça e pescoço, o câncer oral é a neoplasia mais prevalente, podendo acometer cavidade oral e lábio. É considerado um dos 10 tipos de câncer mais encontrados no mundo em ambos os sexos, e a taxa de sobrevida em 5 anos é de aproximadamente 50%¹¹. Cerca de 90% dos casos tem origem nas células escamosas e por isso são comumente denominados de carcinoma de células escamosas (CCE)^{2,12,14}.

Segundo relatório da Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC), para o câncer oral (ICD-10 código C00-06), que inclui lábios, língua, gengiva, assoalho da boca, glândulas parótidas e salivares, foram estimados, em 2018, cerca de 300.000 novos casos em todo o mundo, em ambos os sexos e todas as idades¹⁵.

Dados epidemiológicos globais do câncer oral refletem uma variação geográfica, com cerca de dois terços de todos os casos recém diagnosticados sendo relatados em países em desenvolvimento¹³. Além disso, apontam um aumento dos casos de 5,3 vezes para os homens, e um aumento de 2 vezes para as mulheres nas últimas duas décadas. As taxas de recorrência do câncer oral variam de 18% a 76%

para pacientes que passam por tratamento padrão, e um atraso no início do tratamento é considerado a principal causa para a ausência de melhora relevante na taxa de sobrevida¹⁶.

O consumo de tabaco, incluindo tabaco sem fumaça e o consumo de álcool são os principais fatores etiológicos para o desenvolvimento de câncer oral, apresentando efeito sinérgico. De acordo com a IARC, a fumaça do cigarro contém mais de 60 agentes carcinogênicos, enquanto o consumo de álcool é um fator de risco com comportamento dose-dependente¹¹.

Além disso, são discutidos outros possíveis fatores possivelmente contributivos para o desenvolvimento do câncer oral, como má higiene bucal, infecção pelo papilomavírus humano (HPV), em especial o HPV-16, exposição ocupacional, deficiência nutricional e fatores genéticos^{11,13,17}.

O câncer oral se desenvolve a partir de uma série de estágios histopatológicos. Clinicamente, na maioria dos casos, não há evidências de lesões potencialmente malignas prévias à transformação maligna. Entretanto, a presença de lesões potencialmente malignas, com alterações displásicas do epitélio bucal, aumenta o risco de transformação maligna, com estabelecimento do CCE¹⁸. Sua indução e desenvolvimento são mediados pelo acúmulo de múltiplas alterações genéticas, associado às influências ambientais da exposição ao carcinógeno^{18,19}.

Dessa forma, a carcinogênese configura-se como um processo com múltiplos passos, cada um caracterizado pela estimulação sequencial de defeitos genéticos¹⁸. Devido à ativação de um oncogene e à inativação de gene supressor de tumor, pode ocorrer a desregulação da proliferação e morte celular. As alterações genéticas incluem amplificação gênica, superexpressão de oncogenes, mutações, deleções cromossômicas e hipermetilação¹⁶.

Mais recentemente, a desregulação de mecanismos epigenéticos, essenciais para sustentação do desenvolvimento e da homeostase tecidual específica do organismo, parece ainda adicionar maior nível de complexidade em termos de mecanismos de regulação do câncer, através de processos relacionados à metilação do DNA, modificações das histonas, posicionamento do nucleossoma, além da expressão de RNAs não codificantes (ncRNAs), especialmente microRNAs (miRNAs)²⁰.

1.3 NANOTECNOLOGIA

A nanotecnologia é um campo emergente e multidisciplinar, que abrange uma vasta e diversificada gama de dispositivos derivados da engenharia, biologia, física e química e que envolve aplicações baseadas na síntese e/ou manipulação de moléculas em nanoescala^{21,22}.

A palavra “nano” vem do grego e significa anão ou algo extremamente pequeno. Em sua definição mais estrita, a nanotecnologia refere-se às estruturas de tamanho variando entre 1–100 nm em pelo menos uma de suas dimensões^{23,24}. Podem apresentar diferentes formas tais como tubos, filmes, fibras, partículas, entre outras^{9,25}.

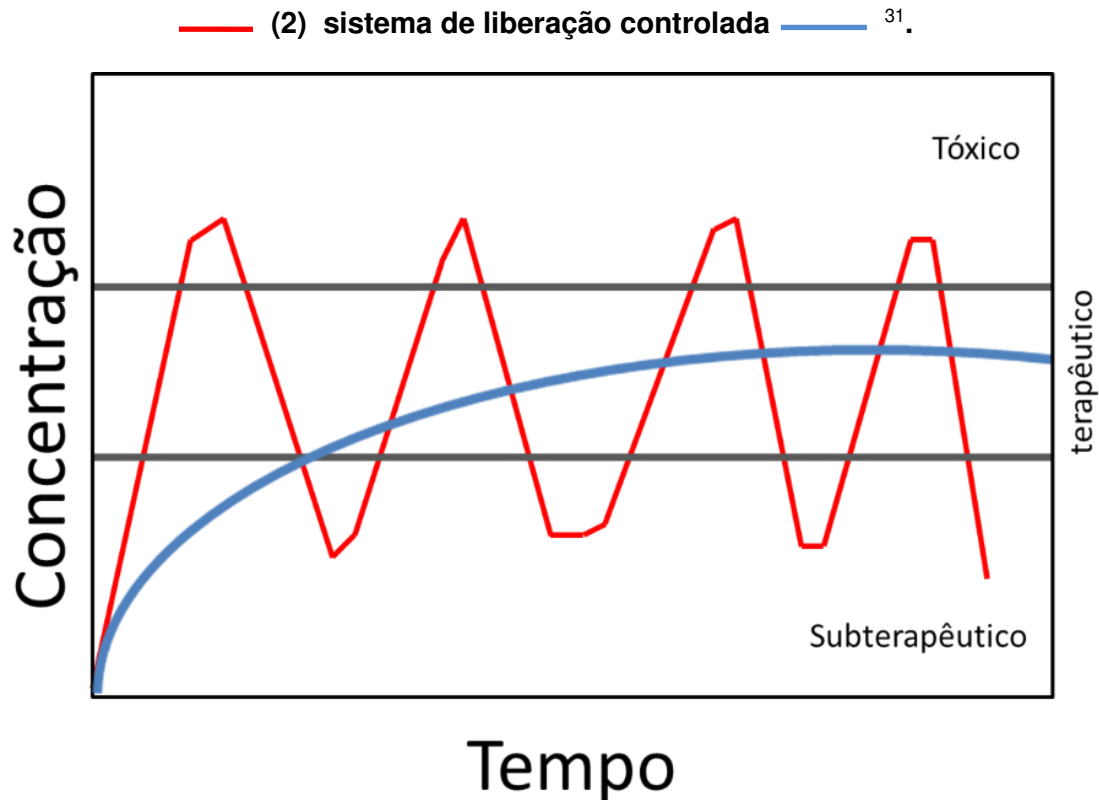
Quando o tamanho de um material é reduzido à escala nanométrica, novas propriedades podem ser adquiridas, bem como o melhoramento de propriedades já existentes⁹. Isto é, os nanomateriais podem apresentar propriedades físico-químicas diferenciadas, atribuídas principalmente ao domínio dos efeitos quânticos, associados à sua elevada área superficial em relação ao volume, composição química (pureza, cristalinidade) bem como sua estrutura de superfície (reatividade superficial)²⁶.

Quando utilizada no campo da saúde, a nanotecnologia tem aberto novos caminhos para a prevenção e combate de diversas enfermidades, utilizando-se das características diferenciadas dos materiais em escala atômica ²⁶, inclusive com potencial de revolucionar o diagnóstico e a terapia do câncer⁴.

Em relação à terapêutica convencional utilizando biomacromoléculas, cujas principais limitações incluem meia-vida plasmática curta, baixa estabilidade e biodisponibilidade, além de efeitos colaterais aumentados, os sistemas de distribuição controlada de drogas em escala nanométrica regulam a biodistribuição do fármaco, aumentando a sua biodisponibilidade e minimizando os efeitos colaterais tóxicos, fornecem vias de administração mais convenientes, além de permitirem ligação específica de drogas a alvos específicos^{27–30}.

A diferença de concentração plasmática efetiva em função do tempo entre sistemas convencionais e de liberação controlada de drogas é mostrada na **Figura 1**.

Figura 1 - Perfil de liberação de drogas (1) terapia farmacológica convencional



Fonte: Adaptado de Primo FL. Estudos fotofísicos e in vivo em modelo animal do fármaco fotossensibilizador Foscan ® incorporado em nanoemulsão: avaliação como sistema de liberação em terapia fotodinâmica do câncer de pele. Universidade de São Paulo. Tese; 2006.

Nos últimos anos, a nanotecnologia vem sendo considerada um campo promissor, com contribuição para o avanço na detecção precoce bem como para a terapia contra o câncer. Terapias modernas antitumorais atualmente incluem a incorporação de sistemas de liberação de medicamentos baseados em nanotecnologia, como nanopartículas poliméricas, nanopartículas lipídicas sólidas, transportadores lipídicos nanoestruturados, nanopartículas de ouro, hidrogéis, complexos de ciclodextrina e cristais líquidos e representam uma opção terapêutica interessante e promissora baseada no “*drug delivery system*” ou sistemas de liberação de medicamentos¹⁶.

1.3.1 Nanoestruturas

A dimensão de uma nanoestrutura, bem como seu tamanho e forma, são fatores cruciais na determinação das propriedades finais dos nanomateriais. Sendo assim, as nanoestruturas podem ser construídas estruturalmente a partir de quatro arquiteturas, que incluem: zero dimensão (nanopartículas), ou seja, materiais que apresentam todas as suas dimensões em escala nanométrica; uma dimensão (nanofios, nanofibras, nanotubos), contendo duas de suas dimensões em escala nanométrica e forma geométrica unidimensional; duas dimensões (filmes ultrafinos, nanofolhas), que apresentam apenas uma de suas dimensões em escala nanométrica e três dimensões, constituídas por nanoestruturas porosas^{25,32,33}.

1.3.1.1 Nanopartículas

O uso de nanopartículas cresce rapidamente e abrange uma ampla gama de produtos comerciais em todo o mundo, incluindo dispositivos eletrônicos, biosensoriamento, vestuário, indústria alimentícia, tintas, protetores solares, cosméticos e dispositivos médicos. Sabe-se que a forma, o tamanho e a distribuição das nanopartículas afetam fortemente as suas propriedades eletromagnéticas, ópticas, catalíticas e biológicas³⁴.

Na área biomédica, as nanopartículas têm sido alvo de vasta investigação ao longo dos anos. O principal motivo para tal interesse é a possibilidade de produzir materiais com características únicas, de tamanhos diversos, variando de poucos até dezenas de nanômetros, comparáveis a importantes estruturas biológicas como uma célula (10–100 μm), um vírus (20–450 nm), uma proteína (5–50 nm) ou um gene (aprox. 2 nm de largura e 10–100 nm de comprimento). Ou seja, são estruturas que podem “aproximar-se” do alvo biológico de interesse, ou ainda estar revestidas por moléculas que irão interagir ou se ligar à estrutura alvo³⁵.

Ao longo das décadas, estudos mostram que as nanopartículas metálicas possuem características únicas, correlacionadas às suas propriedades químicas, físicas e biológicas. Estima-se que, de todas as nanopartículas em produtos de consumo, as aplicações de nanopartículas de prata atualmente têm o maior grau de

comercialização, que abrangem produtos com finalidades variadas, incluindo a desinfecção de dispositivos médicos, eletrodomésticos até o tratamento de água³⁴.

1.3.1.1.1 AgNPs e ação antitumoral

Durante séculos, a prata (Ag) tem sido usada para o tratamento de queimaduras e feridas crônicas. Já em 1000 a.C., a prata foi usada para produzir água potável. Tecidos de granulação do século XIX foram removidos com nitrato de prata para permitir a epitelização e promover a formação de crostas na superfície das feridas. Na década de 1940, depois da introdução da penicilina, o uso de prata para o tratamento de infecções bacterianas foi reduzido. Apesar do uso de sais de prata ser tão antigo quanto a civilização humana, a fabricação e utilização de AgNPs é algo relativamente recente³⁶.

As AgNPs são um dos mais importantes e fascinantes nanomateriais entre várias nanopartículas metálicas envolvidas em aplicações biomédicas. Possuem comprovada ação antibacteriana, antifúngica e antiviral, sendo empregadas em diferentes áreas como embalagens de alimentos, roupas esportivas, eletrônicos, cosméticos e dispositivos médicos, inclusive no diagnóstico e na terapia do câncer^{1,6,37,38}.

A dose, tamanho de partícula, revestimento e estado de agregação das AgNPs, bem como o tipo de célula ou organismo nos quais são utilizadas são fatores determinantes que definem o efeito e potencial de toxicidade das AgNPs. A exposição às AgNPs pode alterar as respostas de estresse celular e iniciar cascatas de sinalização que podem, eventualmente, desencadear autofagia e apoptose de organelas³⁶⁻³⁸.

Trabalhos anteriores confirmaram ação antitumoral das AgNPs, sendo os danos celulares explicados principalmente por perda de integridade da membrana celular, estresse oxidativo e indução de várias vias de sinalização apoptóticas^{37,39-41}.

Sendo assim, íons Ag são capazes de interagir com células e macromoléculas intracelulares, gerando dano ao DNA bem como aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial. Essa disfunção mitocondrial parece estar relacionada à apoptose^{37,38}.

Além disso, a absorção celular das nanopartículas pode levar à captura de elétrons livres e aumento da síntese e acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS), que reagem com proteínas e causam estresse oxidativo, seguido de perda de estrutura e função celular ³⁹.

Por fim, AgNPs também são capazes de induzir apoptose através da indução de supressores tumorais como o gene p53, relacionado à parada do ciclo celular, apoptose ou senescência e ao mesmo tempo regular positivamente genes proapoptóticos, dentre eles Bax e Bak, e negativamente genes antiapoptótico como o Bcl-2^{40,42}.

1.3.1.2 Nanofibras

As nanoestruturas unidimensionais (1D) têm sido assunto de pesquisa intensiva devido às suas propriedades únicas e possibilidade de aplicações em diferentes áreas do conhecimento^{33,43,44}.

Entre as características das nanofibras, destacam-se sua área de superfície específica muito alta, além de elevada resistência mecânica. Essas propriedades favorecem o seu uso para o transporte de portadores de carga através de uma direção controlada, na forma de sistemas integrados nanométricos, podendo funcionar, na área biomédica, como dispositivos de liberação controlada de fármacos^{9,43}.

As nanofibras apresentam algumas vantagens para aplicações biológicas, quando comparadas às nanopartículas do mesmo material, pois não tendem a se agregar, mas ao contrário, têm a capacidade de se dispersar bem em meio aquoso e de se fixar de maneira mais eficiente nas superfícies celulares⁴⁵. Além disso, quando empregadas como carreadores de drogas, são capazes de reduzir a dosagem dessas medicações, através da liberação local e controlada das mesmas, reduzindo assim possíveis efeitos colaterais⁴⁶.

Entre as técnicas utilizadas para produção de nanofibras, destaca-se a técnica conhecida como *Solution blow spinning* (SBS) ou fiação por sopro em solução. Essa técnica consiste inicialmente em uma matriz de fiação com dois bicos concêntricos, um interno, com fluxo de um polímero dissolvido em um solvente volátil e outro externo, com fluxo de um gás pressurizado que flui ao redor da solução do polímero, criando fibras que são depositadas na direção do fluxo de gás. Uma bomba injetora

controla a taxa de injeção da solução polimérica, que encontra o jato de ar e é arrastada até encontrar um coletor com velocidade de rotação controlável^{47,48}.

O SBS permite a produção de fibras na escala micro e nanométrica, de forma mais rápida, com menor custo e utilização de aparato relativamente simples, em relação a outras técnicas utilizadas para a mesma finalidade⁴⁷⁻⁵⁰. Nessa técnica, o aspecto final das fibras produzidas, como sua morfologia e diâmetro, é diretamente relacionado a parâmetros utilizados durante o processo de fiação, entre eles, a taxa de injeção da solução polimérica, fluxo de ar utilizado, distância de trabalho (ponta do tubo interno-coletor), distância de protrusão do tubo interno em relação ao externo, tipo de polímero e sua concentração^{47,48}.

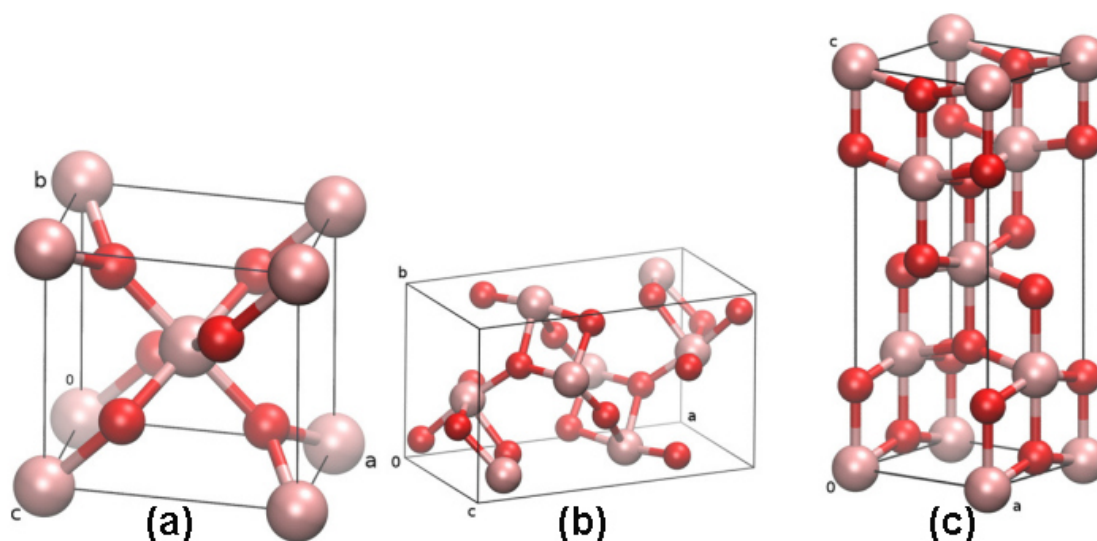
Mais recentemente, a fiação por sopro em solução foi utilizada para produção de fibras de óxidos cerâmicos, utilizando metodologia muito semelhante à originalmente descrita, porém com adição de precursores cerâmicos à solução polimérica para fiação, além de execução de fase adicional de queima para completa eliminação do componente polimérico e manutenção exclusiva do óxido cerâmico^{51,52}.

Entre as nanofibras cerâmicas produzidas, utilizando a fiação por sopro em solução, com possíveis aplicações na área biomédica, destacam-se nanofibras de zircônia⁵³, alumina^{54,55}, óxido de zinco⁵² e TiO_2 ⁵².

1.3.1.2.1 Nanofibras de TiO_2

O TiO_2 , também chamado de titânia, vem sendo utilizado em uma ampla gama de aplicações, incluindo fotocatalisadores, cosméticos e produtos farmacêuticos⁵⁶. Variando-se o método de preparação, o TiO_2 pode ser obtido em diferentes fases cristalinas: rutilo (tetragonal), anatase (tetragonal) e broquita (ortorrômbico), sendo que anatase e rutilo são as formas mais comumente encontradas⁵⁷. As diferentes fases cristalinas do TiO_2 estão ilustradas na **Figura 2**.

Figura 2 - Fases cristalinas do TiO_2 : Rutilo (a) Bruquita (b) e Anatase (c)⁵⁷.



Fonte: Adaptado de Moellmann J, Ehrlich S, Tonner R, Grimme S. A DFT-D study of structural and energetic properties of TiO_2 modifications. J Phys Condens Matter. 2012;24(42).

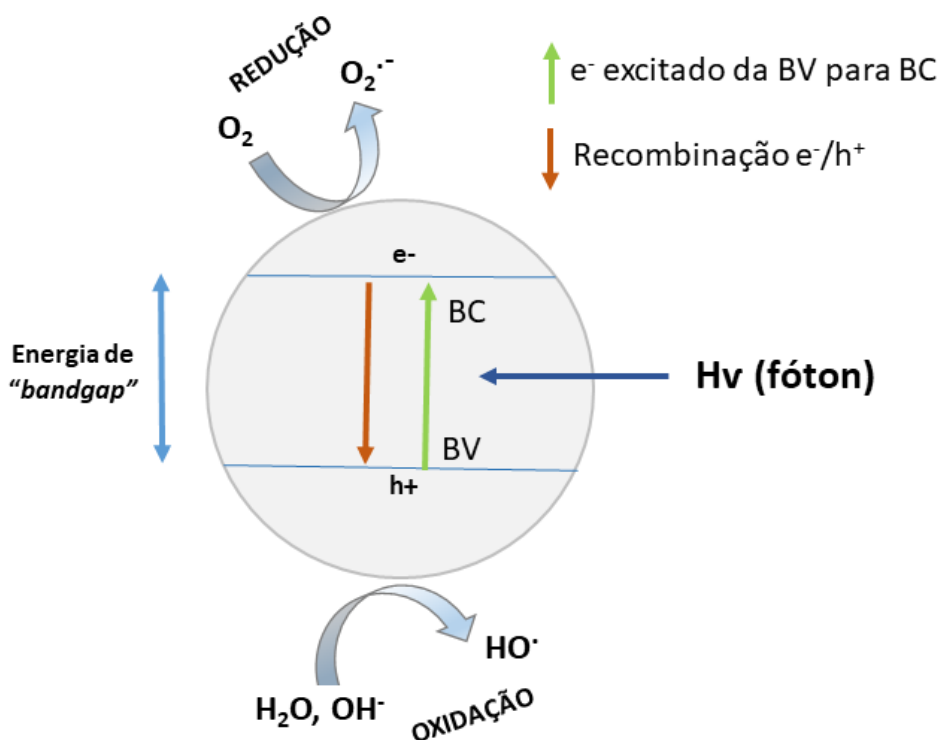
O TiO_2 é reconhecidamente um dos mais importantes materiais com aplicações biomédicas, especialmente devido sua resistência à corrosão, excelente biocompatibilidade, estabilidade química em ampla faixa de pH e baixo custo⁵⁸⁻⁶¹.

Além disso, suas propriedades eletrônicas, fotoativas e eletroquímicas têm sido extensivamente investigadas e podem impactar sobre suas propriedades biológicas, especialmente a atividade antimicrobiana^{62,63} e antitumoral⁶¹. Atualmente é um dos principais materiais utilizados para fotocatalise, processo através do qual espécies reativas com poder oxidante são gerados a partir da ativação do material por energia oriunda da luz, artificial ou natural^{64,65}.

Isso se explica pelo fato do TiO_2 ser um material semiconductor, isto é, um sólido caracterizado por uma banda de valência (BV) e uma banda de condução (BC), separadas por uma região conhecida como “*bandgap*”(Eg). Dessa forma, quando o TiO_2 é ativado por fóton, com energia igual ou maior à energia de “*bandgap*” sofre transferência de elétrons da banda de valência para banda de condução, gerando a

formação de buracos (h^+) na banda de valência e elétrons (e^-) na banda de condução, com elevado poder de oxidação e redução, respectivamente, e consequente produção de ROS, como radical hidroxila ($HO^\bullet$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e superóxido ($O_2^{\bullet-}$), a partir de reações com espécies adsorvidas como O_2 , H_2O , OH^- e H^- ^{64–66}. O mecanismo da fotoativação de um semiconductor está representado na **Figura 3**.

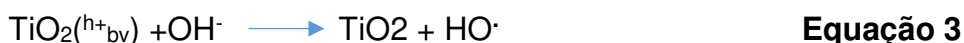
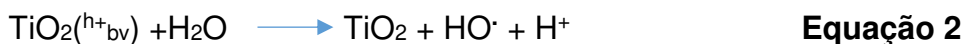
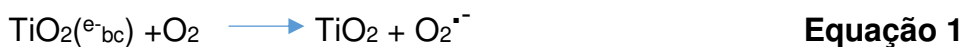
Figura 3 - Mecanismo da fotoativação do TiO_2 . Incidência de Fóton ($h\nu$) com energia igual ou superior à energia de bandgap do semiconductor, excitando elétrons (e^-) da banda de valência (BV) para a banda de condução (BC)⁶⁶.



Fonte: Adaptado de Bansal P, Verma A. N, Ag co-doped TiO_2 mediated modified in-situ dual process (modified photocatalysis and photo-Fenton) in fixed-mode for the degradation of Cephalexin under solar irradiations. *Chemosphere*. 2018;212:611–9.

O O_2 auxilia na captura dos elétrons na banda de condução formando radicais superóxidos (Equação 1). Por outro lado, na banda de valência os buracos reagem com as moléculas de H_2O e OH^- adsorvidas na superfície do TiO_2 , formando os

radicais hidroxila (Equações 2 e 3). Os radicais superóxido podem ainda reagir com moléculas de hidrogênio, gerando peróxido de hidrogênio (Equação 4) ^{64,65}.



Porém a atividade fotocatalítica do TiO_2 é limitada pela sua elevada energia de “*bandgap*” (3.2 eV para anatase e 3.0 eV para o rutilo)^{61,64}, sendo necessária normalmente a utilização da luz ultravioleta para sua fotoativação, além da elevada recombinação e^-/h^+ ⁶⁷. Para melhoria da absorção de luz pelo TiO_2 , dopantes podem ser utilizados, entre eles metais nobres como a prata, que atuaria estendendo sua absorção de luz para a região visível, além de reduzir a recombinação de pares elétron/buraco, através da sua ligação com os elétrons excitados^{66,68}.

1.3.1.2.2 TiO_2 e ação antitumoral

As características descritas anteriormente, associadas à sua biocompatibilidade e alta afinidade por células, faz com que materiais à base de TiO_2 venham sendo cada vez mais aplicados para uso biomédico. Em especial, esses materiais têm sido estudados na terapia antitumoral, diretamente contra células tumorais⁴⁵, associados a anticorpos específicos visando a captura de células tumorais circulantes^{69,70}, como imunossensores para detecção precoce de células tumorais⁷¹ ou ainda como carreador de drogas antitumorais^{46,72}.

A ação do TiO_2 sobre células tumorais se explica graças às suas propriedades fotocatalíticas que, quando ativadas, em meio aquoso, induzem a formação de pares de elétrons-buracos com elevado poder de redução e oxidação, levando à produção de ROS, capazes de reagir com membranas de células tumorais, podendo levá-las à morte principalmente através da apoptose, com aumento da expressão de proteínas pró-apoptóticas como Bax e inibição de proteína anti-apoptótica Bcl-2⁴⁵.

1.4 APOPTOSE

A apoptose, também conhecida como morte celular programada, é um processo caracterizado por alterações morfológicas e bioquímicas que levam à morte celular. A apoptose desempenha um papel relevante na manutenção da homeostasia de diferentes tecidos⁷³⁻⁷⁵.

A ativação da apoptose pode ocorrer através de duas vias principais: a extrínseca e intrínseca. A via extrínseca (citoplasmática) é mediada pela ativação de receptores de morte celular localizados na membrana citoplasmática, tais como Fas e TNFR (receptor de fator de necrose tumoral). A via intrínseca, ou mitocondrial, é ativada por estresse extracelular e/ou intracelular, com permeabilização da membrana mitocondrial, e consequente liberação de fatores apoptogênicos como citocromo *c*⁷³⁻⁷⁵.

A via intrínseca é regulada por proteínas anti e próapoptóticas da família BCL2 (B-cell CLL/ lymphoma 2). As proteínas antiapoptóticas (BCL2, BCL-X_L), localizadas na membrana externa de mitocôndria, bloqueiam a permeabilização da membrana. Por sua vez, as proteínas próapoptóticas (BAX e BAK) são responsáveis pela formação de poros na membrana mitocondrial, permitindo a liberação de fatores pró-apoptóticos^{74,76}.

Normalmente, ambas as vias, intrínseca e extrínseca, levam à ativação de caspases. As caspases são cisteíno-proteases, normalmente inativas nas células saudáveis, que ao serem ativadas por estímulos específicos, hidrolisam proteínas estruturais e funcionais levando à morte celular. Entre as caspases, destacam-se as caspases iniciadoras da via extrínseca (caspases 8 e 10) e da via intrínseca (caspase 9), além das caspases executoras (3,6 e 7)^{73,77}.

Outros genes relacionados às funções essenciais nas células podem estar relacionados ao processo de apoptose. O proto-oncogene MYC está relacionado a processos fisiológicos da célula como a proliferação celular, porém, diante de condições inadequadas como ausência de algum fator de crescimento, pode atuar no processo de apoptose⁷⁸. Por sua vez, o gene p53, um supressor de tumor, normalmente relacionado à regulação da proliferação celular, é capaz de parar o ciclo celular para correção de possíveis danos ao DNA. Apesar disso, em situações em que esses danos são irreversíveis, pode ativar o processo de apoptose, evitando o processo de replicação⁷⁹.

Diante do exposto acima, estudos para investigação de novas opções para o tratamento do câncer oral são desejáveis, sendo a nanotecnologia um campo promissor, através do qual pode-se aperfeiçoar tratamentos já existentes ou ainda obter novas opções terapêuticas, aproveitando-se das características únicas dos materiais em nanoescala.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente trabalho foi desenvolver, caracterizar e avaliar *in vitro* as atividades antimicrobiana e antitumoral de um dispositivo de nanofibras de TiO₂ com imobilização de AgNPs.

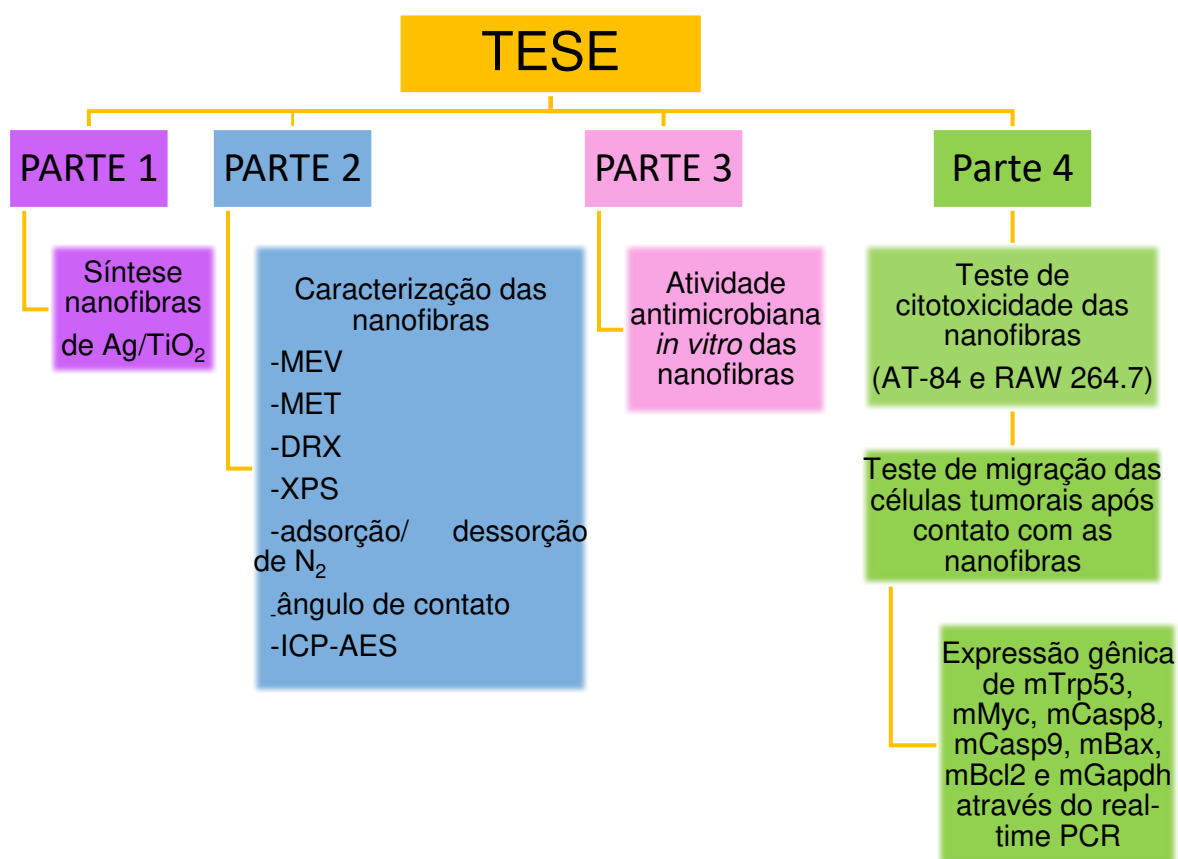
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir nanofibras de TiO₂ contendo AgNPs;
- Caracterizar a morfologia e tamanho das nanofibras de TiO₂, antes e após o processo de calcinação e das AgNPs;
- Conhecer a estrutura cristalográfica das nanofibras produzidas;
- Investigar a composição química superficial das nanofibras produzidas;
- Caracterizar a área superficial, volume e tamanho de poros das nanofibras produzidas;
- Avaliar o ângulo de contato estático das nanofibras produzidas;
- Conhecer o perfil de liberação de íons Ag⁺ das nanofibras;
- Testar a atividade antimicrobiana das nanofibras produzidas frente aos microorganismos *Staphylococcus aureus* (ATCC25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 14506) e *Escherichia coli* (ATCC 25922);
- Conhecer o potencial citotóxico das nanofibras produzidas frente às linhagens de carcinoma de células escamosas (AT-84) e de macrófagos (ATCC RAW 264.7);
- Analisar a capacidade de migração das células tumorais após contato com as nanofibras produzidas;
- Observar a expressão gênica de mTrp53, mMyc, mCasp8, mCasp9, mBax, mBcl2 e mGapdh através da Reação em cadeia da polimerase em tempo real (real-time PCR).

3 METODOLOGIA

O estudo em questão foi desenvolvido segundo fluxograma mostrado na **Figura 4**.

Figura 4 - Fluxograma geral da tese



Fonte: Arquivo próprio.

3.1 MATERIAIS

Para a produção das nanofibras, foram utilizados o tetraisopropóxido de titânio (TTIP), Ti(OCH(CH₃)₂)₄, e nitrato de prata, AgNO₃, respectivamente, como fontes de titânio e de prata. O etanol e a N,N-dimetilformamida, DMF foram usados como solventes e o polímero poli(vinilpirrolidona), PVP, (M_w ~ 1,300,000 g.mol⁻¹) foi usado para preparação da solução polimérica. As informações dos reagentes utilizados estão mostradas na **Tabela 1**.

Tabela 1 - Reagentes utilizados no preparo das nanofibras Ag/TiO₂

Material	Procedência	CAS
tetraisopropóxido de titânio	Sigma-Aldrich (MO, USA)	546-68-9
nitrato de prata	Sigma-Aldrich (MO, USA)	7761-88-8
etanol	Dinâmica Química Contemporânea (SP, Brasil)	64-17-5
N,N-dimetilformamida	Química moderna (SP, Brasil)	68-12-2
poli(vinilpirrolidona)	Sigma-Aldrich (MO, USA)	9003-39-8

3.2 PRODUÇÃO DAS NANOFIBRAS

Para a produção das nanofibras de Ag/TiO₂, inicialmente foram preparadas duas soluções em bequeres de vidro de 50ml, sob agitação magnética, em temperatura ambiente. Em uma delas, o TTIP (12% v/v) e o PVP (10% m/v) foram dissolvidos sequencialmente em etanol. Na segunda solução, o nitrato de prata (1% em massa relativa ao precursor de Ti) foi dissolvido em 1ml de DMF.

Após completa dissolução dos precursores e do PVP, as duas soluções foram misturadas e o sistema foi vigorosamente agitado à temperatura ambiente por cerca de 2h. Após o término da preparação da solução polimérica contendo as fontes de titânio e de prata, a mesma foi transferida para uma seringa de plástico de 10ml e posicionada no sistema de injeção do aparato da fiação por sopro em solução (SBS). A representação do aparato básico do SBS está mostrada na **Figura 5**.

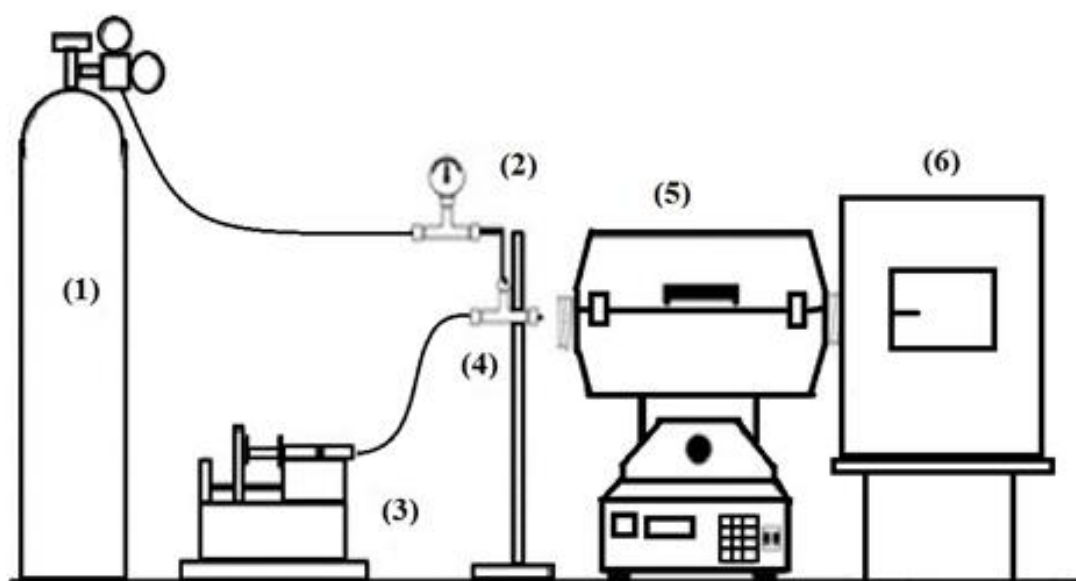
A ponta da seringa foi unida ao sistema de tubos concêntricos, constituído por dois tubos de aço inoxidável, um externo, para passagem do ar comprimido, e outro interno, para a passagem da solução polimérica (**Figura 6**). Entre a ponta do sistema de bicos concêntricos e o coletor, as nanofibras formadas foram submetidas à passagem por um forno túnel (EDG série FT- São Carlos- SP-Brasil), programado com temperatura de 300°C. A temperatura do gás no interior desse tubo foi de

aproximadamente 60°C e auxiliou na evaporação dos solventes utilizados na preparação da solução polimérica.

As nanofibras produzidas foram recolhidas em coletor perfurado, posicionado dentro de uma câmara aquecida, para também auxiliar na secagem das nanofibras e evitar o processo de coalescência das mesmas.

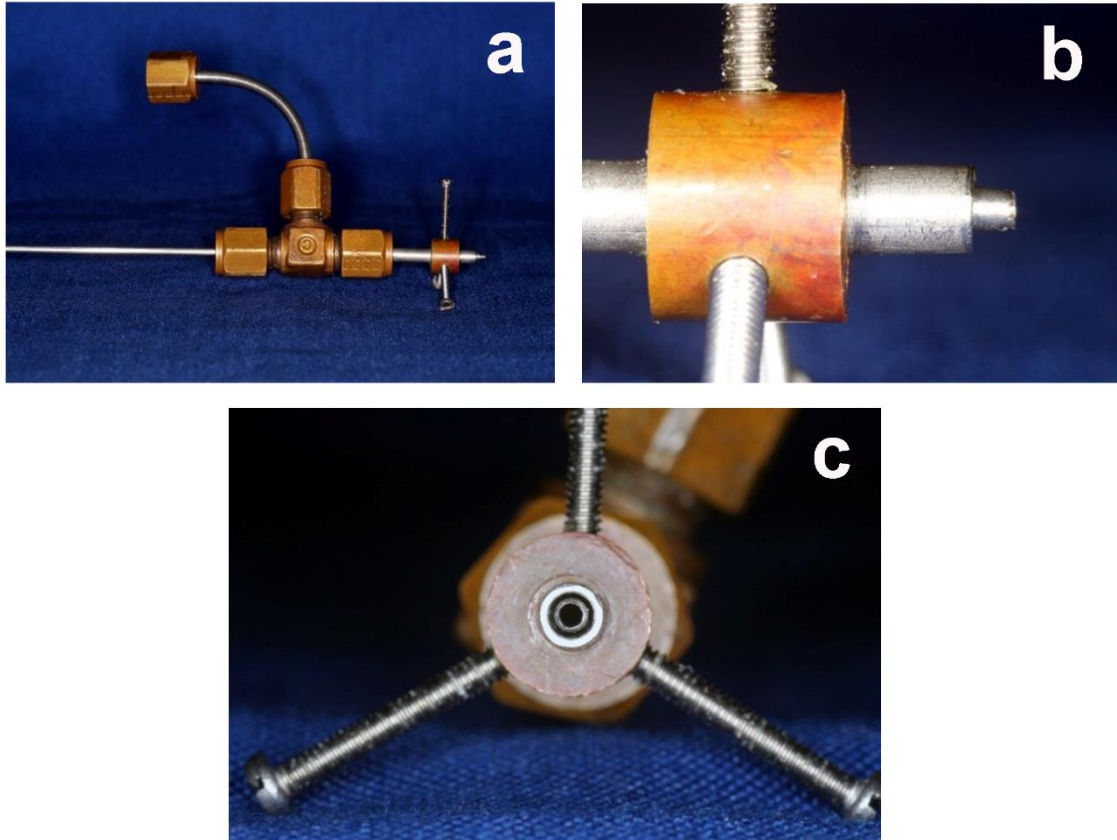
As condições de processamento foram: taxa de injeção da solução polimérica de 6,6ml/h, pressão de ar de 50 psi e distância de trabalho, entre o sistema de bicos concêntricos e o coletor, de 800 mm. Após a produção das nanofibras, as mesmas foram submetidas ao processo de calcinação em mufla (EDG 3000- São Carlos- SP- Brasil) a 700°C por 2h, para eliminação completa do componente polimérico.

Figura 5 - Representação esquemática da fiação por sopro em solução (1) sistema de ar comprimido (2) manômetro (3) sistema de injeção (4) sistema de bicos concêntricos (5) forno (6) sistema de coleta das nanofibras⁸⁰.



Fonte: Adaptado de Farias RM da C. Desenvolvimento de sistemas adsotivos de nanofibras de sílica/carbono-N pela técnica do solution blow spinning. Universidade Federal de Campina Grande. Tese; 2018.

Figura 6 - (a) sistema de tubos concêntricos e (b) detalhe da protrusão do tubo interno em relação ao tubo externo (c) detalhe dos tubos interno e externo.



Fonte: Arquivo próprio.

3.3 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOFIBRAS

3.3.1 Microscopia eletrônica de varredura

A morfologia das fibras foi observada utilizando um microscópio eletrônico de varredura (MEV) (Quanta 250 FEG, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). O procedimento de preparação das amostras consistiu na deposição de uma porção das nanofibras sobre uma fita adesiva de carbono fixada sobre um porta amostra e, em seguida, deposição sobre as mesmas de uma fina camada de ouro com o auxílio do metalizador marca Emitech K 550X.

Os diâmetros das fibras foram avaliados através de um software analisador de imagens (ImageJ, National Institutes of Health, USA). O diâmetro médio das fibras e

a sua distribuição, previamente e após a calcinação, foram determinados a partir da análise de 100 fibras escolhidas aleatoriamente^{50,52}.

3.3.2 Microscopia eletrônica de transmissão

A morfologia detalhada das nanofibras bem como das AgNPs foi caracterizada por microscopia eletrônica de transmissão (MET) (FEI Tecnai20, Oregon, EUA). Para o preparo das amostras, previamente foram preparadas suspensões coloidais alcoólicas contendo as nanofibras produzidas, que foram em seguida gotejadas sobre grades de cobre revestidas de carbono, seguido por secagem ao ar. As imagens finais foram feitas em campo escuro.

A partir das imagens, foram feitas medidas do diâmetro de 100 partículas de prata escolhidas aleatoriamente. As medidas das partículas foram realizadas através de um software analisador de imagens (ImageJ, National Institutes of Health, EUA).

3.3.3 Difração de raios-X

A estrutura cristalográfica das nanofibras produzidas foi observada utilizando um difratômetro marca Rigaku (Tokyo, Japan). Foram realizadas varreduras de 10° a 80° (2θ) a uma velocidade de $0,05^\circ/\text{min}$. A radiação alfa do cobre ($\text{CuK}\alpha$, $\lambda=0,154 \text{ nm}$) filtrada com filtro de níquel foi empregada nas análises.

3.3.4 Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X

A técnica de XPS foi utilizada para determinar a composição da superfície das nanofibras utilizando o equipamento Thermo Scientific™ K-Alpha X-ray, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). As medidas foram realizadas usando uma fonte monocromática de raios X de alumínio $\text{Al K}\alpha$ ($1486,4 \text{ eV}$), sob ultra-alto vácuo de 10^{-8} mBar . A área analisada teve um diâmetro de cerca de $400 \mu\text{m}$. Foi realizado um espectro exploratório (3 scans), além dos espectros de alta resolução do Ti 2p , Ag 3d e O 1s (10 scans para cada). As análises dos dados foram realizadas no programa CasaXPS ©.

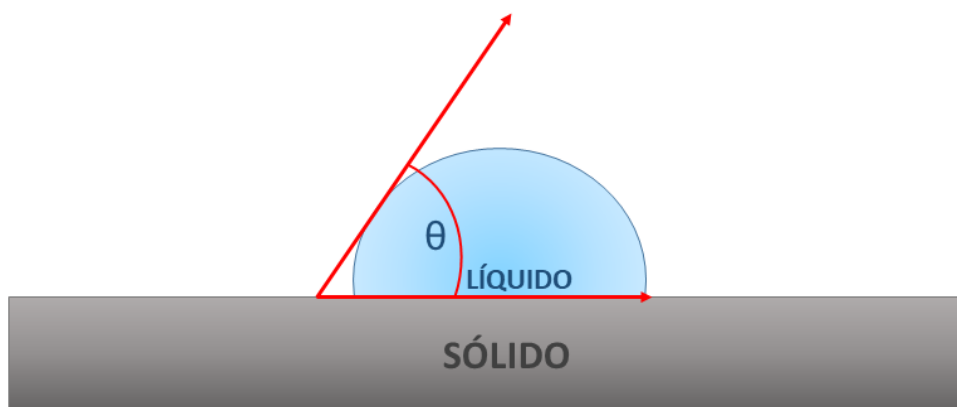
3.3.5 Adsorção/ dessorção de N₂

A determinação da área superficial, volume e tamanho de poros foram determinados utilizando o método de adsorção de N₂ à temperatura de -195,8°C=77K (nitrogênio líquido) no equipamento TriStar II 3020 (Micrometrics, Georgia, USA). Cerca de 200mg de amostra foi submetida à degaseificação sob vácuo, à temperatura de 150°C durante 24 horas. As isotermas de adsorção foram obtidas em uma faixa de P/Po de 0,01 a 0,95. A área superficial foi estabelecida pelo método Brunauer–Emmett–Teller (BET) e o volume e tamanho de poros foram calculados através do método Barrett–Joyner–Halenda (BJH).

3.3.6 Ângulo de contato

Para a determinação do ângulo de contato estático, depositou-se uma gota de água deionizada de volume determinado (5 µl) sobre a superfície da manta de fibras, previamente posicionada sobre superfície plana e obteve-se fotografias utilizando uma câmara EOS REBEL T3i montada em tripé (Canon, Tokyo, Japão), com retroiluminação. Todas as medições foram realizadas a 25°C e cerca de 53% de umidade. Os ângulos esquerdo e direito na interface sólido-líquido foram medidos para cada amostra (**Figura 7**), com o software de análise ImageJ. O teste foi feito em triplicata (n=3).

Figura 7 - Representação ângulo de contato sólido-líquido.



Fonte: Arquivo próprio.

3.3.7 Espectrometria de Emissão Atômica por Plasma Acoplado Indutivamente

O perfil de liberação de íons Ag^+ foi analisado após 24h, 48h, 72h e 240h de imersão de duas concentrações de nanofibras (50 mg.mL^{-1} e 5 mg.mL^{-1}) em frascos de plástico, sob agitação em incubadora *shaker* Modelo SP-222 (SP Labor, Presidente Prudente, SP, Brasil) em água deionizada a 37°C , utilizando espectrometria de emissão atômica por plasma acoplado indutivamente (ICP) no instrumento Optima 2000 (Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA)⁸¹. Para determinação da prata, as amostras sofreram decomposição por via úmida através da digestão em ácido nítrico (HNO_3) em chapa de aquecimento. O teste foi feito em triplicata ($n=3$).

3.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO*

A atividade antimicrobiana *in vitro* das nanofibras ($n = 3$) foi determinada de acordo com o método M02-A12 para teste de susceptibilidade de difusão em disco do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)⁸². Três cepas de bactérias da American Type Culture Collection (ATCC) foram utilizadas para o estudo antimicrobiano: os microorganismos gram-positivos *Staphylococcus aureus* (ATCC25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 14506) e o microorganismo gram-negativo *Escherichia coli* (ATCC 25922).

Uma alíquota de bactérias foi reativada em caldo Mueller-Hinton (Merck, Kenilworth, N.J., EUA) e armazenada por 24h em estufa bacteriológica Modelo SP-101 (SP Labor, Presidente Prudente, SP, Brasil) a 37°C . Após esse período, a turbidez do inóculo foi padronizada para a escala de 0,5 McFarland ($\sim 1,5 \times 10^8$ células/ml) em solução salina estéril a 0,85%. A suspensão bacteriana foi inoculada em placas contendo ágar Mueller-Hinton (Merck, Kenilworth, NJ, EUA) com auxílio de alças de inoculação.

Discos de nanofibras Ag/TiO_2 (1 mm de espessura x 5 mm de diâmetro) foram preparados em moldes metálicos estéreis e posicionados sobre as placas inoculadas. Discos de papel umedecidos com solução salina foram usados como controle negativo. Discos de papel umedecidos com clorexidina 0,12% (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foram usados como controle positivo.

As placas contendo as amostras foram armazenadas por 24h em estufa bacteriológica a 37°C. Após este período, foram fotografadas e a inibição do crescimento determinada pela medição do halo de inibição (mm) formado ao redor dos discos (4 medidas por amostra), com o software ImageJ. As médias e os desvios padrão foram calculados para cada grupo. O teste foi feito em triplicata (n=3).

3.5 ATIVIDADE ANTITUMORAL *IN VITRO*

3.5.1 Cultura celular

As linhagens AT-84 (carcinoma oral de células escamosas de murino) e macrófagos (RAW 264.7) foram mantidas em meio de cultura RPMI (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Sera Laboratories International, Horsted Keynes, UK), 1% de penicilina (10.000 UI.mL⁻¹) e 1% de estreptomicina (10.000µg.mL⁻¹), a 37°C e 5% de CO₂ em garrafas de cultura até o momento da utilização para os ensaios.

3.5.2 Ensaio de citotoxicidade *in vitro*

AT-84 e RAW 264.7 foram cultivadas em placa de seis poços (densidade aproximada de 1x10³ células/poço). Foram então incubadas com diferentes concentrações (5 mg.mL⁻¹ e 50 mg.mL⁻¹) das nanofibras de Ag/TiO₂. As células não tratadas foram usadas como controle positivo de crescimento. As amostras foram incubadas a 37°C e 5% de CO₂ com a linhagem tumoral por 72h e 120h^{83,84} e com os macrófagos por 24h^{85,86}.

Após o período de incubação, considerando cada corte de tempo, a morfologia das células foi observada sob um microscópio invertido (EVOS FL, Thermo Fisher Scientific, Hampton, N.H., EUA), e as imagens de contraste de fase na ampliação de 200x foram capturadas⁸⁷⁻⁸⁹. O teste foi feito em triplicata (n=3). Para a linhagem de macrófagos, a contagem celular após o tratamento com as nanofibras foi comparada ao controle, o que permitiu estimar a dose capaz de inibir 50% das células (IC50)⁸⁴.

3.5.3 Ensaio de migração *in vitro* (scratch assay)

O ensaio de migração de células AT-84 foi realizado em placas de seis poços, observando o padrão de confluência do controle (densidade aproximada de 10^5 células/poço). O meio de cultura foi retirado, substituído por solução de tampão fosfato (PBS), e então uma ferida foi realizada na camada uniforme de células utilizando uma ponta de micropipeta estéril de 200 μ l. As células foram lavadas com PBS para remover os detritos celulares. O RPMI foi novamente colocado e as células foram incubadas, a 37°C e 5% de CO₂, com diferentes concentrações (5 mg.mL⁻¹ e 50 mg.mL⁻¹) das nanofibras Ag/TiO₂, por 48 horas⁹⁰. Foram obtidas imagens de contraste de fase com uma ampliação de 10x (t = 0 e t = 48 h), utilizando um microscópio invertido (EVOS FL, Thermo Fisher Scientific, Hampton, N.H., EUA)⁹⁰.

O teste foi realizado em triplicata (n=3). A distância de migração celular foi determinada medindo a largura da ferida (t=48) e subtraindo esse valor da largura inicial da mesma (t=0). Em cada imagem, 10 pontos da ferida foram considerados, e a média de largura (μ m) foi medida. As medidas foram realizadas com o software ImageJ. A migração percentual foi calculada usando a seguinte equação ⁹¹:

$$\% \text{ taxa migração} = \frac{\text{média da largura da ferida (0h)} - \text{média da largura da ferida (48h)}}{\text{média largura da ferida (0h)}} \times 100$$

3.5.4 Real-time PCR

Para o estudo da expressão gênica, inicialmente o RNA total foi isolado utilizando o método Trizol®, conforme instruções do fabricante. Para síntese do DNA complementar (cDNA), foi utilizada a transcriptase reversa Superscript II (Invitrogen, Carlsbad). O RNA e o cDNA tiveram quantificação e qualidade mensuradas pela absorbância 260/280 nm no espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE, EUA). As informações referentes aos iniciadores utilizados neste trabalho estão listadas na **Tabela 2**.

As reações de real-time PCR foram realizadas em placas de 96 poços - MicroAmp®Optical 96 - Well Reaction Plate with Barcode (Applied Biosystems by Life Technologies, EUA) e conduzidas no sistema StepOnePlus™ (Applied Biosystems,

EUA) utilizando o Master Mix Power PCR SYBR® Green (Applied Biosystems, Foster City), conforme proposto pelo MIQE Guideline [61].

Cada reação de real-time PCR foi composta de 10 uL de cDNA (20 ng/μL), 0.125 mM de cada dNTP, 0.1 μM de cada iniciador, 2.5 mM MgCl₂, 0.2 x Sybr Green (Invitrogen) e 2.5 U Taq DNA polimerase em um volume total de 20μl. As reações foram realizadas em triplicata. O GAPDH foi o gene de referência utilizado com o objetivo de verificar a integridade das amostras. Diferenças na expressão gênica foram calculadas usando o modelo Pfaffl⁹².

Tabela 2 - Oligonucleotídeos (iniciadores) empregados nas análises de expressão gênica

Iniciadores	Sequência do nucleotídeo 5'-3'
mTrp53	Forward: CCCCTGTCATCTTTTGTCCCT Reverse: AGCTGGCAGAATAGCTTATTGAG
mMyc	Forward: ATGCCCCTCAACGTGAACTTC Reverse: GTCGCAGATGAAATAGGGCTG
mCasp8	Forward: TGCTTGGA CTACATCCCACAC Reverse: GTTGCAGTCTAGGAAGTTGACC
mCasp9	Forward: GGCTGTAAACCCCTAGACCA Reverse: TGACGGGTCCAGCTTCACTA
mBax	Forward: AGACAGGGGCCTTTTGTCTAC Reverse: AATTCGCCGGAGACACTCG
mBcl2	Forward: GCTACCGTCGTGACTTCGC Reverse: CCCACCGAACTCAAAGAAGG
mGapdh	Forward: AGGTCGGTGTGAACGGATTTG Reverse: GGGGTCGTTGATGGCAACA

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados da taxa média de migração de células foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney U ($\alpha = 0,05$). A citotoxicidade e a expressão gênica foram analisadas pelo Teste de Comparação Múltipla de Kruskal-Wallis e Dunn ($\alpha = 0,05$). A análise estatística foi realizada usando o IBM SPSS Statistics versão 20.

4 CONCLUSÕES

Nanofibras de Ag/TiO₂, com estrutura mesoporosa e super-hidrofílica, compatível com a fase rutilo, contendo nanopartículas de prata com tamanho médio de 15 nm, foram produzidas com sucesso utilizando a técnica da fiação por sopro em solução. O material produzido apresentou atividade antimicrobiana contra microrganismos *S. aureus*, *E. faecalis* e *E. coli*. A liberação de íons prata das nanofibras foi de aproximadamente 0,08 µg. mL⁻¹ e 0,18 µg. mL⁻¹, para as concentrações de 5 e 50 mg. mL⁻¹, respectivamente, confirmando o perfil de liberação lenta e controlada do material. A maior concentração de nanofibras inibiu completamente a proliferação e migração de células tumorais, sendo esse efeito parcial para a menor concentração de nanofibras utilizada. Foi observado um aumento na expressão gênica de mbax, mMyx e mTrp53 e redução na expressão de mBcl2, confirmando a capacidade das nanofibras de Ag/TiO₂ de induzirem apoptose celular. A alta reatividade superficial, a interação atômica entre TiO₂ e Ag associada à liberação de íons Ag foram provavelmente os principais mecanismos que contribuíram para o alto desempenho das nanofibras produzidas. Os efeitos biológicos observados sugerem o potencial das nanofibras Ag/TiO₂ para uso em terapia local antimicrobiana e antitumoral.

REFERÊNCIAS

1. Dziedzic A, Kubina R, Bułdak R, Skonieczna M, Cholewa K. Silver Nanoparticles Exhibit the Dose-Dependent Anti-Proliferative Effect against Human Squamous Carcinoma Cells Attenuated in the Presence of Berberine. *Molecules*. 2016 Mar;21(3):365.
2. Irimie A, Ciocan C, Gulei D, Mehterov N, Atanasov A, Dudea D, et al. Current Insights into Oral Cancer Epigenetics. *Int J Mol Sci*. 2018 Feb;19(3):670.
3. Bundela S, Sharma A, Bisen PS. Potential Compounds for Oral Cancer Treatment: Resveratrol, Nimbolide, Lovastatin, Bortezomib, Vorinostat, Berberine, Pterostilbene, Deguelin, Andrographolide, and Colchicine. *PLoS One*. 2015;10(11):e0141719.
4. Peer D, Karp JM, Hong S, Farokhzad OC, Margalit R, Langer R. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat Nanotechnol*. 2007 Dec;2:751.
5. Firdhouse MJ, Lalitha P. Biosynthesis of silver nanoparticles using the extract of *Alternanthera sessilis*—antiproliferative effect against prostate cancer cells. *Cancer Nanotechnol*. 2013 Dec;4(6):137–43.
6. Zhang X, Liu Z, Shen W, Gurunathan S. Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. *Int J Mol Sci*. 2016 Sep;17(9):1534.
7. Singh R, Swanner J, Mims J, Akman S, Furdui C, Torti S, et al. Differential cytotoxic and radiosensitizing effects of silver nanoparticles on triple-negative breast cancer and non-triple-negative breast cells. *Int J Nanomedicine*. 2015 Jun;3937–53.
8. Zhang Z, Shen W, Xue J, Liu Y, Liu Y, Yan P, et al. Recent advances in synthetic methods and applications of silver nanostructures. *Nanoscale Res Lett*. 2018;13(1):54.
9. Lu X, Zhang W, Wang C, Wen T, Wei Y. One-dimensional conducting polymer nanocomposites: Synthesis, properties and applications. *Prog Polym Sci*. 2011 May;36(5):671–712.
10. Pan J, Leygraf C, Thierry D, Ektessabi AM. Corrosion resistance for biomaterial applications of TiO₂ films deposited on titanium and stainless steel by ion-beam-assisted sputtering. *J Biomed Mater Res*. 1997;35(3):309–18.
11. Dhanuthai K, Rojanawatsirivej S, Thosaporn W, Kintarak S, Subarnbhesaj A, Darling M, et al. Oral cancer: A multicenter study. *Med Oral Patol Oral y Cir Bucal*. 2017;23(1):23–9.
12. Chakraborty P, Karmakar T, Arora N, Mukherjee G. Immune and genomic signatures in oral (head and neck) cancer. *Heliyon*. 2018;4(10):e00880.
13. Buduru S, Zimta AA, Ciocan C, Braicu C, Dudea D, Irimie AI, et al. RNA interference: New mechanistic and biochemical insights with application in oral cancer therapy. *Int J Nanomedicine*. 2018;13:3397–409.
14. Ernani V, Saba NF. Oral Cavity Cancer: Risk Factors, Pathology, and

- Management. *Oncology*. 2015;89(4):187–95.
15. D'Cruz AK, Vaish R, Dhar H. Oral cancers: Current status. *Oral Oncol*. 2018;87(October):64–9.
 16. Calixto G, Bernegossi J, Fonseca-Santos B, Chorilli M. Nanotechnology-based drug delivery systems for treatment of oral cancer: A review. *Int J Nanomedicine*. 2014;9(1):3719–35.
 17. Piemonte E, Lazos J, Belardinelli P, Secchi D, Brunotto M, Lanfranchi-Tizeira H. Oral cancer associated with chronic mechanical irritation of the oral mucosa. *Med Oral Patol Oral y Cir Bucal*. 2018;23(2):151–60.
 18. Garnis C, Chari R, Buys TP, Zhang L, Ng RT, Rosin MP, et al. Genomic imbalances in precancerous tissues signal oral cancer risk. *Mol Cancer*. 2009;8(1):50.
 19. Lien M, Lin C, Tsai H-C, Chen Y, Tsai M, Hua C-H, et al. Impact of CCL4 gene polymorphisms and environmental factors on oral cancer development and clinical characteristics. *Oncotarget*. 2017 May;8(19):31424–34.
 20. Irimie AI, Ciocan C, Gulei D, Mehterov N, Atanasov AG, Dudea D, et al. Current Insights into Oral Cancer Epigenetics. *Int J Mol Sci*. 2018;19(3):1–17.
 21. Ferrari M. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. *Nat Rev Cancer*. 2005 Mar;5(3):161–71.
 22. Huczko A. Template-based synthesis of nanomaterials. *Appl Phys A*. 2000;70(4):365–76.
 23. Farokhzad OC, Langer R. Impact of Nanotechnology on Drug Delivery. *ACS Nano*. 2009 Jan;3(1):16–20.
 24. Rai M, Yadav A, Gade A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnol Adv*. 2009 Jan;27(1):76–83.
 25. Yuan Z, Su B. Titanium oxide nanotubes, nanofibers and nanowires. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp*. 2004 Jul;241(1–3):173–83.
 26. Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K, Kouri JB, Ramírez JT, et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*. 2005 Oct;16(10):2346–53.
 27. Verma P, Maheshwari SK. Applications of Silver nanoparticles in diverse sectors. *Int J Nano Dimens*. 2019;10(1):18–36.
 28. Goldberg M, Langer R, Jia X. Nanostructured materials for applications in drug delivery and tissue engineering. Vol. 18, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 2007. p. 241–68.
 29. Zhang L, Gu F, Chan J, Wang A, Langer R, Farokhzad O. Nanoparticles in Medicine: Therapeutic Applications and Developments. *Clin Pharmacol Ther*. 2008 May;83(5):761–9.
 30. Jain RK, Stylianopoulos T. Delivering nanomedicine to solid tumors. *Nat Rev Clin Oncol*. 2010 Nov;7(11):653–64.

31. Primo FL. Estudos fotofísicos e in vivo em modelo animal do fármaco fotossensibilizador Foscan ® incorporado em nanoemulsão: avaliação como sistema de liberação em terapia fotodinâmica do câncer de pele. Universidade de São Paulo. Tese; 2006.
32. Xia Y, Yang P, Sun Y, Wu Y, Mayers B, Gates B, et al. One-Dimensional Nanostructures: Synthesis, Characterization, and Applications. *Adv Mater.* 2003 Mar;15(5):353–89.
33. Li D, Xia Y. Electrospinning of Nanofibers: Reinventing the Wheel? *Adv Mater.* 2004 Jul;16(14):1151–70.
34. Ahamed M, AlSalhi MS, Siddiqui MKJ. Silver nanoparticle applications and human health. *Clin Chim Acta.* 2010 Dec;411(23–24):1841–8.
35. Pankhurst QA, Connolly J, Jones SK, Dobson J. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *J Phys D Appl Phys.* 2003 Jul;36(13):R167–81.
36. Cameron S, Hosseini F, Willmore W. A Current Overview of the Biological and Cellular Effects of Nanosilver. *Int J Mol Sci.* 2018 Jul;19(7):2030.
37. M. JF, P. L. Apoptotic efficacy of biogenic silver nanoparticles on human breast cancer MCF-7 cell lines. *Prog Biomater.* 2015 Dec;4(2–4):113–21.
38. Jang SJ, In Jun Y, Tettey CO, Mo KK, Mook SH. In-vitro anticancer activity of green synthesized silver nanoparticles on MCF-7 human breast cancer cells. *Mater Sci Eng C [Internet].* 2016;68:430–5. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493116302892>
39. El-naggar NE, Hussein MH, El-sawah AA. Bio-fabrication of silver nanoparticles by phycocyanin , characterization , in vitro anticancer activity against breast cancer cell line and in vivo cytotoxicity. *Sci Rep.* 2017;(March):1–20.
40. Gurunathan S, Zhang X-F. Combination of salinomycin and silver nanoparticles enhances apoptosis and autophagy in human ovarian cancer cells: an effective anticancer therapy. *Int J Nanomedicine.* 2016 Aug;11:3655–75.
41. Gurunathan S, Qasim M, Park C, Yoo H, Kim J, Hong K. Cytotoxic Potential and Molecular Pathway Analysis of Silver Nanoparticles in Human Colon Cancer Cells HCT116. *Int J Mol Sci.* 2018 Aug;19(8):2269.
42. Gurunathan S, Park JH, Han JW, Kim J. Comparative assessment of the apoptotic potential of silver nanoparticles synthesized by *Bacillus tequilensis* and *Calocybe indica* in MDA-MB-231 human breast cancer cells: targeting p53 for anticancer therapy. *Int J Nanomedicine.* 2015 Jun;10:4203–22.
43. Roy P, Berger S, Schmuki P. TiO₂ Nanotubes: Synthesis and Applications. *Angew Chemie Int Ed.* 2011 Mar;50(13):2904–39.
44. Li D, Xia Y. Fabrication of Titania Nanofibers by Electrospinning. *Nano Lett.* 2003 Apr;3(4):555–60.
45. Zhang S, Yang D, Jing D, Liu H, Liu L, Jia Y, et al. Enhanced photodynamic therapy of mixed phase TiO₂(B)/anatase nanofibers for killing of HeLa cells. *Nano Res.* 2014 Nov;7(11):1659–69.
46. Li J, Wang X, Shao Y, Lu X, Chen B. A Novel Exploration of a Combination of

- Gambogic Acid with TiO₂ Nanofibers: The Photodynamic Effect for HepG2 Cell Proliferation. *Materials* (Basel). 2014 Sep;7(9):6865–78.
47. Medeiros ES, Glenn GM, Klamczynski AP, Orts WJ, Mattoso LHC. Solution Blow Spinning: A New Method to Produce Micro- and Nanofibers from Polymer Solutions. *J Appl Polym Sci*. 2009;113(4):2322–30.
 48. Daristotle JL, Behrens AM, Sandler AD, Kofinas P. A Review of the Fundamental Principles and Applications of Solution Blow Spinning. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2016 Dec;8(51):34951–63.
 49. Oliveira JE, Moraes EA, Costa RGF, Afonso AS, Mattoso LHC, Orts WJ, et al. Nano and submicrometric fibers of poly(D,L-lactide) obtained by solution blow spinning: Process and solution variables. *J Appl Polym Sci*. 2011 Dec;122(5):3396–405.
 50. Bonan RF, Bonan PRF, Batista AUD, Sampaio FC, Albuquerque AJR, Moraes MCB, et al. In vitro antimicrobial activity of solution blow spun poly(lactic acid)/polyvinylpyrrolidone nanofibers loaded with Copaiba (*Copaifera* sp.) oil. *Mater Sci Eng C* [Internet]. 2015;48:372–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2014.12.021>
 51. Farias RMDC, Menezes RR, Oliveira JE, De Medeiros ES. Production of submicrometric fibers of mullite by solution blow spinning (SBS). *Mater Lett*. 2015;149(3):47–9.
 52. Costa DL, Leite RS, Neves GA, Santana LN de L, Medeiros ES, Menezes RR. Synthesis of TiO₂ and ZnO nano and submicrometric fibers by solution blow spinning. *Mater Lett* [Internet]. 2016;183:109–13. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167577X1631179X>
 53. Cheng B, Tao X, Shi L, Yan G, Zhuang X. Fabrication of ZrO₂ ceramic fiber mats by solution blowing process. *Ceram Int*. 2014 Nov;40(9):15013–8.
 54. Li L, Kang W, Zhao Y, Li Y, Shi J, Cheng B. Preparation of flexible ultra-fine Al₂O₃ fiber mats via the solution blowing method. *Ceram Int*. 2015 Jan;41(1):409–15.
 55. Li L, Kang W, Zhuang X, Shi J, Zhao Y, Cheng B. A comparative study of alumina fibers prepared by electro-blown spinning (EBS) and solution blowing spinning (SBS). *Mater Lett*. 2015 Dec;160:533–6.
 56. Mohan K, Manjula C, Gnanakumar G, Kanjwal MA, Sekar T V, Paulmurugan R, et al. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics Oxidative stress-mediated cytotoxicity and apoptosis induction by TiO₂ nanofibers in HeLa cells. *Eur J Pharm Biopharm*. 2012;81(2):324–33.
 57. Moellmann J, Ehrlich S, Tonner R, Grimme S. A DFT-D study of structural and energetic properties of TiO₂ modifications. *J Phys Condens Matter*. 2012;24(42).
 58. André RS, Zamperini CA, Mima EG, Longo VM, Albuquerque AR, Sambrano JR, et al. Antimicrobial activity of TiO₂:Ag nanocrystalline heterostructures: Experimental and theoretical insights. *Chem Phys* [Internet]. 2015;459:87–95. Available from:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301010415002116>

59. Hou X, Ma H, Liu F, Deng J, Ai Y, Zhao X, et al. Synthesis of Ag ion-implanted TiO₂ thin films for antibacterial application and photocatalytic performance. *J Hazard Mater.* 2015 Dec;299:59–66.
60. Jędrzejewski T, Kozak W, Lewandowska Ż, Sadowska B, Piszczek P, Szubka M, et al. Biocompatibility of Titania Nanotube Coatings Enriched with Silver Nanograins by Chemical Vapor Deposition. *Nanomaterials.* 2017;7(9):274.
61. Ahamed M, Khan MAM, Akhtar MJ, Alhadlaq HA, Alshamsan A. Ag-doping regulates the cytotoxicity of TiO₂ nanoparticles via oxidative stress in human cancer cells. *Sci Rep.* 2017;7(1):17662.
62. Chen S, Liao Y, Jiang H-Y, Geng Y, Lei G, Xie G. Rapid organic degradation and bacteria destruction under visible light by ternary photocatalysts of Ag/AgX/TiO₂. *J Environ Chem Eng.* 2017;5(6):5566–72.
63. Moongraksathum B, Chen YW. Anatase TiO₂ co-doped with silver and ceria for antibacterial application. *Catal Today.* 2018;310(May 2017):68–74.
64. Nakata K, Ochiai T, Murakami T, Fujishima A. Photoenergy conversion with TiO₂ photocatalysis: New materials and recent applications. *Electrochim Acta.* 2012;84:103–11.
65. Mills A, Le Hunte S. An overview of semiconductor photocatalysis. *J Photochem Photobiol A Chem.* 1997;108:1–35.
66. Bansal P, Verma A. N, Ag co-doped TiO₂ mediated modified in-situ dual process (modified photocatalysis and photo-Fenton) in fixed-mode for the degradation of Cephalexin under solar irradiations. *Chemosphere.* 2018;212:611–9.
67. Balayeva N, Bahnemann D, Dillert R, El Azzouzi M, Koch J, Boughaled R, et al. Ag/Ag₂O as a Co-Catalyst in TiO₂ Photocatalysis: Effect of the Co-Catalyst/Photocatalyst Mass Ratio. *Catalysts.* 2018;8(12):647.
68. Huerta-Aguilar CA, Palos-Barba V, Thangarasu P, Koodali RT. Visible light driven photo-degradation of Congo red by TiO₂–ZnO/Ag: DFT approach on synergetic effect on band gap energy. *Chemosphere.* 2018;213:481–97.
69. Zeng Y-J, Lee S-W, Lan M-Y. Development of a Potential TiO₂-Nanofiber Platform for Isolation of Circulating Tumor Cells of Nasopharyngeal Carcinoma. *J Nanosci Nanotechnol.* 2017;17(12):9095–100.
70. Zhang N, Deng Y, Tai Q, Cheng B, Zhao L, Shen Q, et al. Electrospun TiO₂ Nanofiber-Based Cell Capture Assay for Detecting Circulating Tumor Cells from Colorectal and Gastric Cancer Patients. *Adv Mater.* 2012 May;24(20):2756–60.
71. Ali MA, Mondal K, Jiao Y, Oren S, Xu Z, Sharma A, et al. Microfluidic Immuno-Biochip for Detection of Breast Cancer Biomarkers Using Hierarchical Composite of Porous Graphene and Titanium Dioxide Nanofibers. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2016 Aug;8(32):20570–82.
72. Li J, Wang X, Jiang H, Lu X, Zhu Y, Chen B. New strategy of photodynamic treatment of TiO₂ nanofibers combined with celastrol for HepG2 proliferation in vitro. *Nanoscale.* 2011;3(8):3115–22.

73. Hassan M, Watari H, Abualmaaty A, Ohba Y, Sakuragi N. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *Biomed Res Int.* 2014;2014.
74. Ouyang L, Shi Z, Zhao S, Wang FT, Zhou TT, Liu B, et al. Programmed cell death pathways in cancer: A review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Prolif.* 2012;45(6):487–98.
75. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol.* 2007 Jun;35(4):495–516.
76. Liu Z, Ding Y, Ye N, Wild C, Chen H, Zhou J. Direct Activation of Bax Protein for Cancer Therapy. *Med Res Rev.* 2016 Mar;36(2):313–41.
77. Kumar S, Eroglu E, Stokes JA, Scisum-Gunn K, Saldanha SN, Singh UP, et al. Resveratrol induces mitochondria-mediated, caspase-independent apoptosis in murine prostate cancer cells. *Oncotarget.* 2017;8(13):20895–908.
78. Phesse TJ, Myant KB, Cole AM, Ridgway RA, Pearson H, Muncan V, et al. Endogenous c-Myc is essential for p53-induced apoptosis in response to DNA damage in vivo. *Cell Death Differ.* 2014;21(6):956–66.
79. Aubrey BJ, Kelly GL, Janic A, Herold MJ, Strasser A. How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression? *Cell Death Differ.* 2018;25(1):104–13.
80. Farias RM da C. Desenvolvimento de sistemas adsotivos de nanofibras de sílica/carbono-N pela técnica do solution blow spinning. Universidade Federal de Campina Grande. Tese; 2018.
81. Munteanu BS, Aytac Z, Pricope GM, Uyar T, Vasile C. Polylactic acid (PLA)/Silver-NP/VitaminE bionanocomposite electrospun nanofibers with antibacterial and antioxidant activity. *J Nanoparticle Res.* 2014;16(10):2643.
82. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved Standard - Twelfth Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015. p. 15.
83. Razak NA, Abu N, Ho WY, Zamberi NR, Tan SW, Alitheen NB, et al. Cytotoxicity of eupatorin in MCF-7 and MDA-MB-231 human breast cancer cells via cell cycle arrest, anti-angiogenesis and induction of apoptosis. *Sci Rep.* 2019;9(1):1–12.
84. Baharuddin AA, Roosli RAJ, Zakaria ZA, Tohid SFM. Dicranopteris linearis extract inhibits the proliferation of human breast cancer cell line (Mda-mb-231) via induction of s-phase arrest and apoptosis. *Pharm Biol.* 2018;56(1):422–32.
85. Xiang K, Dou Z, Li Y, Xu Y, Zhu J, Yang S, et al. Cytotoxicity and TNF- α Secretion in RAW264.7 Macrophages Exposed to Different Fullerene Derivatives . *J Nanosci Nanotechnol.* 2012;12(3):2169–78.
86. Petrochenko PE, Skoog SA, Zhang Q, Comstock DJ, Elam JW, Goering PL, et al. Cytotoxicity of cultured macrophages exposed to antimicrobial zinc oxide (ZnO) coatings on nanoporous aluminum oxide membranes. *Biomatter.* 2013 Jul;3(3):e25528.
87. Poornavaishnavi C, Gowthami R, Srikanth K, Bramhachari P V., Venkatramaiah N. Nickel nanoparticles induces cytotoxicity, cell morphology and oxidative

- stress in bluegill sunfish (BF-2) cells. *Appl Surf Sci.* 2019;483(December 2018):1174–81.
88. Moongkarndi P, Kosem N, Kaslungka S, Luanratana O, Pongpan N, Neungton N. Antiproliferation, antioxidation and induction of apoptosis by *Garcinia mangostana* (mangosteen) on SKBR3 human breast cancer cell line. *J Ethnopharmacol.* 2004;90(1):161–6.
 89. Yuan Y-G, Zhang S, Hwang J-Y, Kong I-K. Silver Nanoparticles Potentiates Cytotoxicity and Apoptotic Potential of Camptothecin in Human Cervical Cancer Cells. *Oxid Med Cell Longev.* 2018 Dec;2018:Article ID 6121328.
 90. Liang C-C, Park AY, Guan J-L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc.* 2007 Feb;2(2):329–33.
 91. Aramwit P, Palapinyo S, Srichana T, Chottanapund S, Muangman P. Silk sericin ameliorates wound healing and its clinical efficacy in burn wounds. *Arch Dermatol Res.* 2013;305(7):585–94.
 92. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001 May;29(9):e45.

**APÊNDICE A- ARTIGO APROVADO NO PERIÓDICO MATERIALS SCIENCE AND
ENGINEERING C**

***In vitro* antimicrobial and anticancer properties of TiO₂ blow-spun nanofibers
containing silver nanoparticles**

Bonan, Roberta Ferreti ¹

Mota, Mariaugusta Ferreira²

Farias, Rosiane Maria da Costa²

Silva, Sabrina Daniela ³

Bonan, Paulo Rogério Ferreti ⁴

Diesel, Luciana ⁵

Menezes, Romualdo Rodrigues²

Perez, Danyel Elias da Cruz¹

1 – Federal University of Pernambuco, School of Dentistry, Department of Clinical and Preventive Dentistry, Oral Pathology Section, Recife, Pernambuco, Brazil

2 – Federal University of Campina Grande, Department of Materials Engineering, Campina Grande, Paraiba, Brazil

3 – Department of Otolaryngology - Head and Neck Surgery, Jewish General Hospital, McGill University - Canada

4 – Federal University of Paraiba, Department of Dentistry, João Pessoa, Paraiba, Brazil

5 – Lutheran University of Brazil, Laboratory of Cancer Biology, Brazil

Abstract

Nanotechnology is a multidisciplinary field of knowledge that brings new possibilities for the prevention and treatment of diseases, including cancer diagnosis and therapy. The general objective of the study was to produce Ag/TiO₂ nanofibers using the Solution Blow Spinning technique, to verify the microstructural and physical properties and to investigate *in vitro* its antimicrobial and anticancer activity for future biomedical applications. Nanosilver immobilized on TiO₂ nanometric fibers (Ag/TiO₂) was produced by solution blow spinning technique and characterized using scanning electron microscope (SEM), transmission electron microscopy (TEM), N₂ adsorption/desorption, X-ray diffraction (XRD), X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), water contact angle and Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometry (ICP-AES) analyses. In addition, the *in vitro* antimicrobial activity of nanofibers was evaluated by disk diffusion technique, against *Staphylococcus aureus* (ATCC25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 14506) and *Escherichia coli* (ATCC 25922). The cytotoxic potential in oral squamous carcinoma (AT-84) and macrophage (ATCC RAW 264.7) cells was verified, by evaluating cell morphology (phase contrast inverted microscope), after 72 and 120h (tumor cells) and 24h (macrophages), in contact with 5 and 50mg.mL⁻¹ of the nanofibers. The migration potential of tumor cells was observed after 48h, in contact with 5 and 50mg.mL⁻¹ nanofibers. Finally, gene expression of mTrp53, mMyc, mCasp8, mCasp9, mBax, mBcl2 and mGapdh, by real time polymerase chain reaction, was investigated. TiO₂ nanofibers with silver nanoparticles (average diameter of 15nm) uniformly distributed on their surface were successfully produced. Ag/TiO₂ nanofibers revealed a crystalline structure compatible with the rutile crystalline phase, as well as a mesoporous and superhydrophilic nature. XPS profiles showed Ti⁴⁺ and Ag⁰, indicating a strong interaction between the Ag nanoparticles and TiO₂. The Ag/TiO₂ nanofibers presented antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, and *Escherichia coli*. The release of silver ions from 5 mg·mL⁻¹ and 50 mg·mL⁻¹ of Ag/TiO₂ nanofibers was approximately 0.08 µg·mL⁻¹ and 0.18 µg·mL⁻¹, respectively. The nanofiber cytotoxicity in both macrophages (ATCC RAW 264.7) and cancer cells (murine AT-84 oral squamous carcinoma cells) was dose-dependent. A concentration of 5 mg·mL⁻¹ induced partial suppression growth and migration of cancer cells, while a concentration of 50 mg·mL⁻¹ resulted in complete inhibition of proliferation and migration of murine AT-84 cells. It was observed an increase in mbax, mMyc and mTrp53 genes expression for both Murine AT-84 cells and macrophages after exposure to Ag/TiO₂ nanofibers. On the other hand, there was a reduction in the mBcl2 gene for both cell lines tested. The overall result indicated that Ag/TiO₂ nanofibers could selectively inhibit the cellular mechanism of AT-84 by apoptosis with DNA damage and cell death. The antimicrobial and anticancer performance of Ag/TiO₂ nanofibers is probably the result of its nanometric dimension, high surface reactivity, and the interaction between TiO₂ and Ag. Electron transfer at the metal–semiconductor interface and reactive oxygen species production, in addition to the biological activity of released silver ions, confirm the potential for use as an agent in antimicrobial and anticancer therapy.

Keywords: Solution blow spinning, nanofibers, silver, rutile, anticancer activity

1. Introduction

According to the World Health Organization, an increase in annual cancer cases from 14 million in 2012 to 22 million by 2030 [1,2] is expected. Head and neck cancers are the sixth most common cancer in the world and are strongly associated with tobacco and alcohol consumption and/or infection with human papillomavirus (HPV). The treatment outcome for patients with head-neck squamous cell carcinoma (HNSCC), which represents more than 90% of cases, has not improved significantly over the past 30 years, with a five-year disease survival rate below 50% [3,4].

Nowadays, nanomaterials represent a promising field with a broad range of applications, including cancer therapy [5,6]. Efforts have been made to develop new anticancer agents, including the use of nanotechnology, since most of the interactions between biomaterials and cells occur at the nanoscale. In addition, nanostructures are capable of interacting with biomolecules on the cellular surface as well as being internalized and acting on organelles [7,8].

Metal-based nanoparticles have been used extensively in diverse biomedical applications and are considered promising materials for applications in drug/gene delivery, cell imaging, biosensing, antimicrobial agents, and cancer therapy. The main parameters that influence the biological activity of nanoparticles include their size, shape, surface area, and chemical composition [5,6,8,9].

Silver nanoparticles (AgNPs) are known to constitute the most commonly used nanomaterials in healthcare and have significant biological properties, especially due to their antimicrobial activity, with a broad spectrum of action against gram-positive and gram-negative bacteria [10–19]. The primary biological effects include the generation of reactive radicals, which triggers oxidative stress, DNA damage, and apoptosis [20,21]. More recently, AgNPs have shown potential against tumor cells [1,5,8,9,20,22–25].

However, Ag ionic or nanoforms rapidly bind to environment factors (such as Cl^-) or aggregate and eventually become unavailable. In addition, evidence shows that AgNPs can accumulate and, in some cases, damage tissues such as the liver, lungs, and olfactory bulbs, or penetrate the blood-brain barrier [26]. Hence, the use of a carrier such as a ligand is recommended to stabilize nanosilver onto a solid support or carrier, aiming to ensure its biological effects, avoid inactivation, decrease aggregation, and prevent toxicity through its controlled release [17,27].

Carrier structures include liposomes, polymers, hydrogels, inorganic NPs, and nanofibers [28,29]. Nanofibers present a high surface area, controllable architecture (porosity,

diameter), high drug loading capacity and encapsulation efficiency, and the possibility of simultaneous multiple drug delivery [29,30]. Among the nanofiber production techniques, solution blow spinning (SBS) has high fiber productivity as well as low cost and simplicity [31–34].

For nanocarrier design, titanium dioxide (TiO₂) is a suitable choice, since it presents interesting biological properties, especially non-toxicity, chemical stability, and low cost [35–38]. TiO₂–Ag-based biomaterials exhibit a combination of titanium dioxide biocompatibility with the biological properties of silver [15,19,37,39,40]. In addition, the electronic, photoactive, and electrochemical properties of TiO₂ have been extensively investigated [41–46]. In particular, the photocatalytic properties of TiO₂ have an impact on its biological properties, such as antimicrobial [43,44] and anticancer activities [38]. However, limitations, which include a large band gap with excitation by ultraviolet light ($\lambda < 388$ nm) and fast electron-hole pair recombination, impair its overall performance [38,47,48].

Several strategies have been used to improve the photocatalytic properties of materials, including the combination of semiconductors and metal or metal oxide [49,50]. The combined use of TiO₂ with Ag appears to be promising, since AgNPs can trap electrons in the conduction band, preventing the recombination of photoinduced electron-hole pairs, with improvement in the redox reaction on the TiO₂ surface and enhancement of the antimicrobial and antitumor properties [35,38,42,43,51–54].

This paper outlines the experimental procedure that has resulted, for the first time, in the production of nanosilver immobilized TiO₂ fibers by the SBS technique. The microstructural and physical properties were investigated, and *in vitro* assays were performed to assess the antimicrobial and anticancer activities for future biomedical applications.

2. Materials and methods

2.1 Materials

Titanium (IV) isopropoxide (TTIP), Ti(OCH(CH₃)₂)₄ (CAS number 546-68-9, $\geq 97.0\%$, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and silver nitrate, AgNO₃ (CAS number 7761-88-8, $\geq 99.0\%$, Sigma-Aldrich) were used, respectively, as Ti and Ag sources. Ethanol PA ACS (CAS number 64-17-5, 99.8%, Dinâmica Química Contemporânea, SP, Brazil) and N,N-dimethylformamide PA ACS, DMF (CAS number 68-12-2, 99.8%, Química Moderna, SP, Brazil) were used as solvents, and poly(vinylpyrrolidone), PVP (CAS number 9003-39-8, Sigma-Aldrich, average MW of 1 300 000) was also used for solution preparation.

2.2 Fibers Spinning

For the production of Ag/TiO₂ fibers, two separate solutions were prepared. First, TTIP (12% v/v) and PVP (10% w/v) were subsequently dissolved in ethanol. In the second solution, silver nitrate (1.0 % wt. relative to Ti precursor) was dissolved in 1 mL of DMF. After complete dissolution of the precursors and PVP, the two solutions were mixed and the system was vigorously stirred at room temperature, as previously described [31]. The processing conditions for both fibers were: injection rate of 6.6 mL/h, air pressure of 344 kPa and a working distance of 600 mm. The fibers were collected and then calcined at 700 °C for 2 h.

2.3 Fibers characterization

The blow spun fiber morphology was characterized by scanning electron microscopy (SEM) (Quanta 250 FEG, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and transmission electron microscopy (TEM) (FEI Tecnai20, Oregon, USA). SEM surface samples were coated with gold using a K 550X Emitech sputter coater, and at least 100 randomly selected fibers were measured. TEM samples were prepared by wetting carbon-coated copper grids with a drop of the alcoholic colloidal suspensions, followed by air drying. One hundred silver particles were measured using TEM micrographs. Fiber and particle measurements were performed with ImageJ analysis software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). The crystallographic structure of the resulting nanocomposites was visualized using an X-ray diffraction instrument (Rigaku Corp., Tokyo, Japan) with Cu K α radiation ($\lambda = 1.540 \text{ \AA}$). X-ray photoelectron spectroscopy (XPS, Thermo Scientific™ K-Alpha X-ray, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) was carried out to analyze the chemical status of the elements. XPS was performed with a monochromatic Al K α X-ray source. Emission lines were calibrated with the C1s signal at 284.8 eV. The spectra were analyzed using mixed Gaussian–Lorentzian peak fitting with the processing software CasaXPS (v.2.3.19PR1.0; Casa Software Ltd., USA). The specific surface area (SSA), pore volume, and pore size were determined by N₂ adsorption/desorption isotherms (NOVA Station:A, Quantachrome Instruments, Boynton Beach, FL, USA). The SSA was calculated using the Brunauer–Emmett–Teller (BET) method and the pore volume and pore size were derived from the adsorption branches of the isotherms using the Barrett–Joyner–Halenda (BJH) method. For static contact angle (SCA) determination, a 5 μ L droplet of deionized water was pipetted onto the surface of fiber mats ($n = 3$), and photographs were obtained using a tripod-mounted EOS REBEL T3i camera (Canon, Tokyo, Japan), with back-illumination. All measurements were performed at 25 °C and approximately 53% humidity. The left and right angles at the liquid–solid–air interface were measured for each sample with ImageJ analysis software. The released contents of silver ions were analyzed after

24 h, 48 h, 72 h, and 240 h immersion of two concentrations of nanofibers ($50 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ and $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) in deionized water at 37°C , using inductively coupled plasma (ICP) emission spectroscopy on an Optima 2000 instrument (PerkinElmer, Waltham, MA, USA).

2.4 *In vitro* antimicrobial activity

The *in vitro* antimicrobial activity of blow spun fibers ($n = 3$) was determined as per the M02-A12 method for disk diffusion susceptibility testing of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [55]. Three bacteria strains from the American Type Culture Collection (ATCC®) were used for the antimicrobial study: gram-positive organisms *Staphylococcus aureus* (ATCC25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 14506), and gram-negative organisms *Escherichia coli* (ATCC 25922). An aliquot of bacteria was reactivated in Mueller Hinton Broth (Merck & Co., Kenilworth, NJ, USA) and stored for 24 h in a bacteriological incubator at 37°C . After this time, the turbidity of the inoculum was standardized to a 0.5 McFarland scale ($\sim 1.5 \times 10^8 \text{ cells}\cdot\text{mL}^{-1}$) in 0.85% sterile saline. The bacterial suspension was plated on dishes containing Mueller-Hinton agar (Merck & Co.). Ag/TiO₂ disks (1mm thickness $\times$ 5mm diameter) were prepared in sterile molds and positioned over inoculated dishes. Paper disks were used as a negative control. Samples were stored for 24 h in a bacteriological incubator at 37°C . After this period, the plates were photographed and growth inhibition determined by measuring the inhibition halo (mm) formed around the disks (four measurements per sample), with ImageJ software. The means and standard deviations were calculated for each group.

2.5 *In vitro* anticancer activity

2.5.1 Cell culture

Murine AT-84 oral squamous cells carcinoma and macrophages (ATCC RAW 264.7) were maintained at $1 \times 10^6 \text{ cells}\cdot\text{mL}^{-1}$ in RPMI medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Sera Laboratories International, Horsted Keynes, UK), 1% penicillin ($10\,000 \text{ UI}\cdot\text{mL}^{-1}$ stock), and streptomycin ($10\,000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ stock) (Gibco, Langley, OK, USA) at 37°C and 5% CO₂ humidified atmosphere.

2.5.2 Cytotoxicity assay

AT-84 and RAW 264.7 were seeded in a six-well plate (1×10^3 cells/well) and incubated with different concentrations ($5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ and $50 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) of the Ag/TiO₂ nanofibers.

Untreated cells were used as a control. The samples (n = 3) were placed in an incubator at 37 °C and 5% CO₂ for 72 h and 120 h (tumor cells)[56,57] and 24h (macrophages)[58,59]. After incubation, considering each time cut, the morphology of the cells was observed under an inverted microscope (EVOS FL, Thermo Fisher Scientific), and the phase-contrast images at 200x magnification were captured.

2.5.3 Migration assay

The migration activity of murine AT-84 oral squamous cells carcinoma was performed in a six-well plate, observing the confluence pattern on the control (10⁵ cells/well). The plates were washed with phosphate buffer solution (PBS), and a scratch was made on a uniform layer of cells using a sterile 200-μL micropipette tip. The cells were then washed with PBS to remove the cellular debris. RPMI medium was replenished. Cells were incubated at 37 °C and 5% CO₂ with different concentrations (5 mg·mL⁻¹ and 50 mg·mL⁻¹) of the Ag/TiO₂ nanofibers for 48 h [60]. Phase-contrast images at 10x magnification were obtained (t = 0 and t = 48 h), using an inverted microscope (EVOS FL). The test was performed in triplicate. In each image, ten points per scratch were considered, and the scratch width average (μm) was measured. The percent migration was calculated using the following equation [61]:

$$\% \text{ Migration rate} = \frac{\text{average distance scratch (0h)} - \text{average distance scratch (48h)}}{\text{average distance scratch (0h)}} \times 100$$

2.5.4 Quantitative real time RT-PCR (qRT-PCR)

cDNAs were synthesized from 1 μg of isolated RNA using Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and random primers (Invitrogen). Primer set sequences were chosen using Primer Express 3.0 software (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi), as displayed in **Table 1**. qRT-PCR amplification was conducted in a total volume of 20 μL, using Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific) and quality controls as proposed by the MIQE guidelines [62]. The reactions were carried out in triplicate. *GAPDH* was the most stable control gene using the geNorm algorithm [62]. Fold differences in the relative gene expression were calculated using the Pfaffl model [63].

Table 1. Primer sequences used for gene expression analysis

ID	Gene	Sequence
1	mTrp53	F: CCCCTGTCATCTTTGTCCCT R: AGCTGGCAGAATAGCTTATTGAG
2	mMyc	F: ATGCCCCCTCAACGTGAACCTC R: GTCGCAGATGAAATAGGGCTG
3	mCasp8	F: TGCTTGGA CTACATCCCACAC R: GTTGCAGTCTAGGAAGTTGACC
4	mCasp9	F: GGCTGTAAACCCCTAGACCA R: TGACGGGTCCAGCTTCACTA
5	mBax	F: AGACAGGGGCCTTTTGTCTAC R: AATTCGCCGGAGACACTCG
6	mBcl2	F: GCTACCGTCGTGACTTCGC R: CCCCACCGAACTCAAAGAAGG
7	mGapdh	F: AGGTCGGTGTGAACGGATTG R: GGGGTCGTTGATGGCAACA

2.6 Statistical analysis

Data from the mean migration rate of cells from the *in vitro* scratch assay were analyzed using the Kruskal–Wallis test and the Mann–Whitney *U* test ($\alpha = 0.05$). *In vitro* cytotoxicity and gene expression were analyzed using the Kruskal–Wallis test and Dunn’s Multiple Comparison Test ($\alpha = 0.05$). Statistical analysis was performed using IBM SPSS Statistics ver. 20.

3. Results and Discussion

SEM micrographs before (**Fig. 1a**) and after heating process (**Fig. 1c**) show efficient nanofiber production by the SBS technique, indicating that the variables used during the process, such as polymer concentration, polymer injection rate, pressure, and Ag content, are suitable for the spinning process. The study of the nanomaterial morphology has great importance because characteristics such as diameter can directly modulate biological properties [64]. The mean diameter of Ag/TiO₂ fibers was 494 ± 215 nm, ranging from 130 nm to 1152 nm, and 279 ± 108 nm, ranging from 85 nm to 621 nm, before and after the heating process, respectively (**Figs. 1b and d**). The decrease in the diameter of the fibers is related to the removal of the organic substances and the formation of crystalline TiO₂. This behavior corroborates previous studies [33,65]. Bead-free, cylindrical, and slightly rugged surface fibers revealed that

the Ag content was adequate, not altering or damaging the production and morphology of nanofibers.

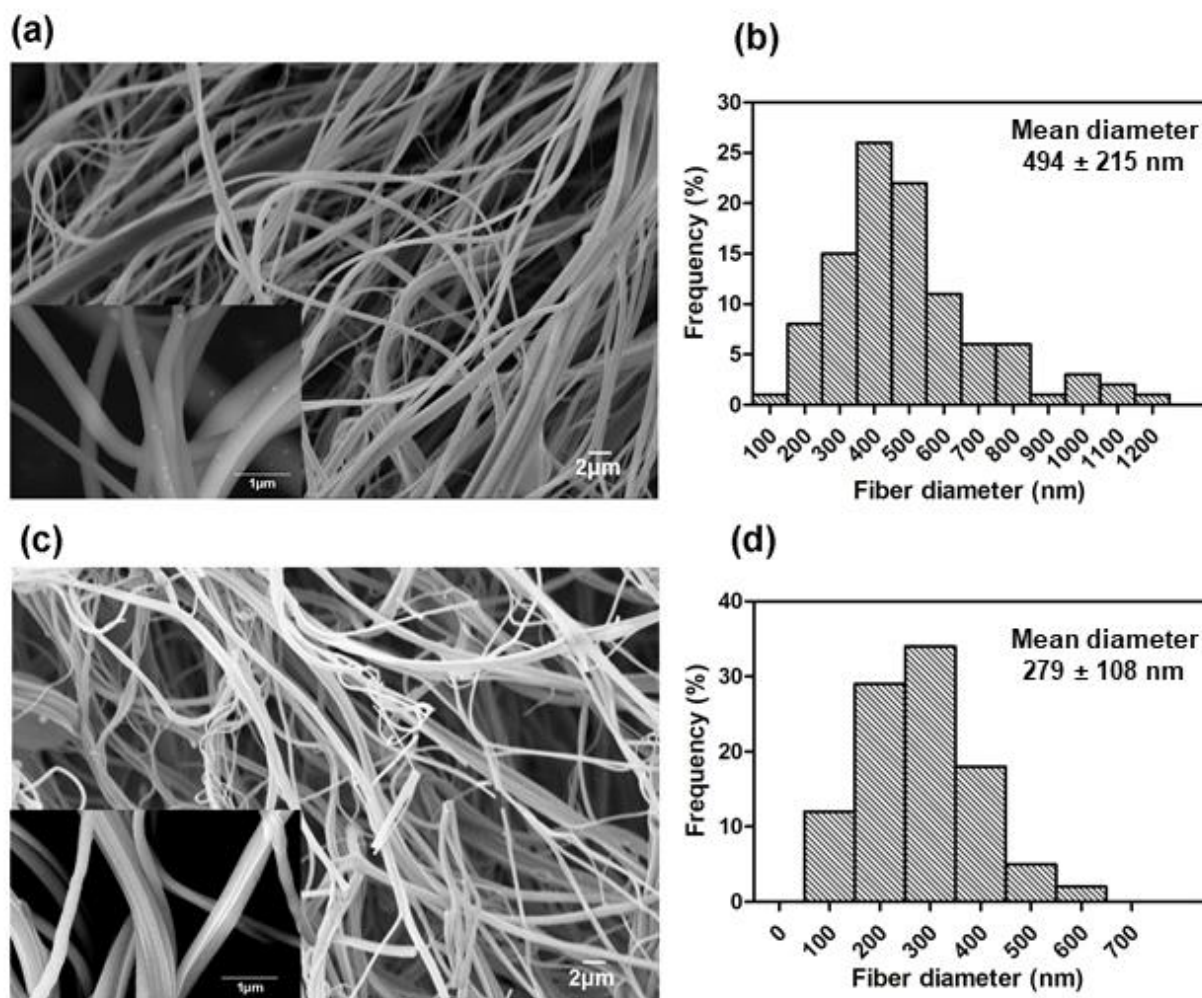


Figure 1. SEM images of Ag/TiO₂ nanofibers (a) before and (c) after heating process and distribution of Ag/TiO₂ fibers diameter (b) before and (d) after heating process.

In the present study, PVP was chosen as a spinning agent. In the ceramic fiber production through the one-step SBS method, the polymer allows stable jet/fiber production and acts as a polymer matrix, while the alkoxide is hydrolyzed with the formation of the continuous gel network within the polymer matrix. After calcination, the organic part is decomposed while ceramic fibers are formed and condensed. Semicrystalline polymers such as PVP produce ordered structures, facilitating the kinetics of ceramic crystallization. Moreover, PVP presents two adsorption sites (N^+ and O^-) with a high adsorption capacity of titanium isopropoxide, increasing the contact between Ti atoms and favoring TiO₂ crystallization [31,33].

TEM images show the TiO_2 particles in detail with the presence of spherical AgNPs, having a mean particle size of 15 nm, uniformly attached to the nanofiber surface (**Fig. 2a**). All measured Ag NPs had a size less than 50 nm (**Fig. 2b**). The final characteristics of the NPs depend on processing variables such as Ag reduction, the presence of visible light during synthesis, the stirring speed, and thermal treatment [66]. Parameters such as shape and size affect the biological properties and functions of metal nanostructures [12,13,66]. AgNPs with different shapes interact similarly with *E. coli*, although an increased reactivity is attributed to triangular Ag nanoplates when compared with spherical and rod-shaped NPs, and with Ag^+ (in the AgNO_3 form). This difference can be explained regarding the percentage of active facets in different shapes [12].

Similarly, the size of AgNPs is critical for understanding its biological behavior, since it interferes with several biological processes, such as oxidative stress, DNA damage, mitochondrial dysfunction, cellular uptake, and permeabilization across biological barriers [13]. AgNPs of smaller size may exert significant cellular effects due to their increased surface-to-volume ratio, associated with the faster silver ion release, in addition to better interaction with cellular proteins and organelles when compared to larger AgNPs. This relationship does not appear to be true for DNA damage, where the magnitude of effects does not seem to be related to AgNP size [13,14].

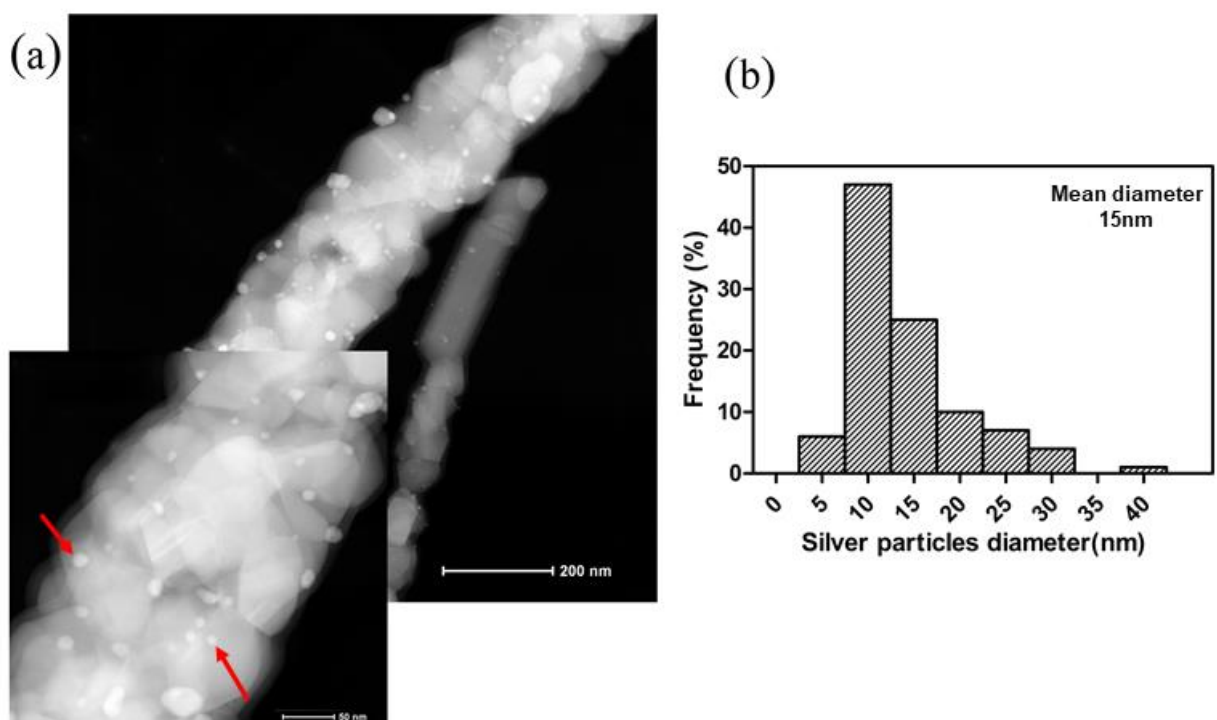


Figure 2. (a) TEM images of Ag/TiO₂ nanofibers, and (b) distribution of Ag particle diameters. Red arrows indicate Ag nanoparticles.

The XRD patterns of Ag/TiO₂ nanofibers show rutile as the only TiO₂ crystalline phase (JCPDF card file no. 21-1276), which corroborates the previous result of this group [31] (**Fig. 3**). It identified only a remarkable peak at a 2θ value of 38.1° , and an unobvious peak at a 2θ value of 77.5° , corresponding, respectively, to the (1 1 1) and (3 1 1) planes of Ag, which are in accordance with the values reported for face-centered cubic Ag nanocrystals (JCPDS 04-783). Other characteristic peaks of Ag crystals (44.7° and 64.5°) were not identified, probably because of the nanodimensions of Ag crystallites (widening of the diffraction peaks), other than the overlap of the rutile peaks.

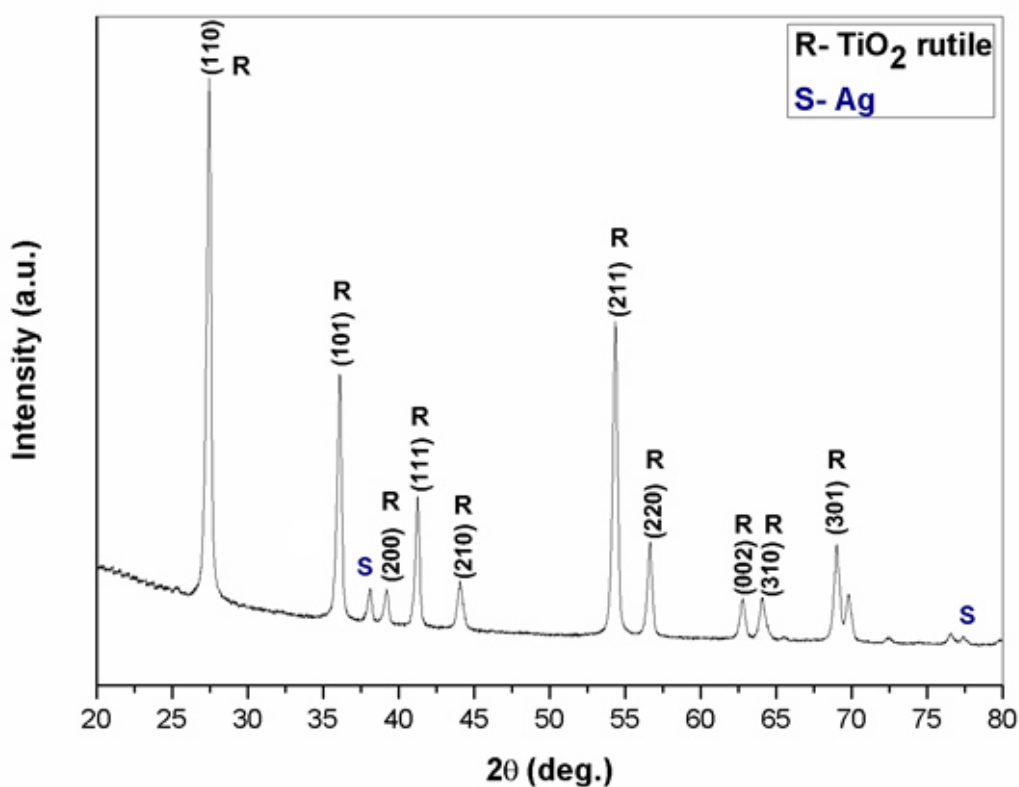


Figure 3. XRD pattern of Ag/TiO₂ nanofibers.

XPS measurements were employed to identify the surface chemical state of Ag/TiO₂ nanofibers. The XPS survey spectrum confirmed the presence of peaks corresponding to Ti, O, Ag, and C elements (**Fig. 4a**). The presence of C1s corresponds to the presence of adventitious carbon [42,45,48]. **Figure 4(b)** shows the high-resolution XPS profiles of Ti 2p. It is observed

that the peaks at 458.6 eV and 464.3 eV correspond to binding energies of the oxidation states $\text{Ti}^{4+} 2p_{3/2}$ and $\text{Ti}^{4+} 2p_{1/2}$, respectively [41,42,45,48].

Two individual peaks were observed in the Ag 3d spectrum (**Fig. 4c**) at 367.8 and 373.7 eV, correlated with Ag $3d_{5/2}$ and Ag $3d_{3/2}$, respectively, suggesting the presence of Ag^0 [41,42,45,53]. The splitting of the 3d doublet (6 eV) indicates that Ag loading on the TiO_2 surface mainly exists as metallic Ag [41,54]. The shift in binding energy to the lower level when compared to bulk metallic silver (the $3d_{5/2}$ and Ag $3d_{3/2}$ peaks are centered at 368.3 eV and 374.3 eV, respectively) suggests a strong interaction between Ag and TiO_2 with electron transfer from TiO_2 to metallic Ag [41,54,67].

The high-resolution O1s scan (**Fig. 4d**) shows O1s spectra with three main peaks observed: 530.46 eV (O_L), 531.93 eV (O_H), and 533.12 eV (O_D). O_L is attributed to the Ti-O bond [41,44,68,69]. O_H can be assigned to the oxygen atom involved in hydroxyl groups (H-O bond) [53,54,68] and the third peak (O_D) is associated with adsorbed oxygen on the surface, hydroxyl groups, and surface oxygen vacancies [41,44,54].

Thus, the presence of metallic Ag on the TiO_2 surface enables efficient separation of the electron-hole pairs, possibly favoring oxidation processes on the TiO_2 surface with the production of reactive oxygen species (ROS), including the superoxide ion (O_2^-), hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$), and hydrogen peroxide (H_2O_2) [43].

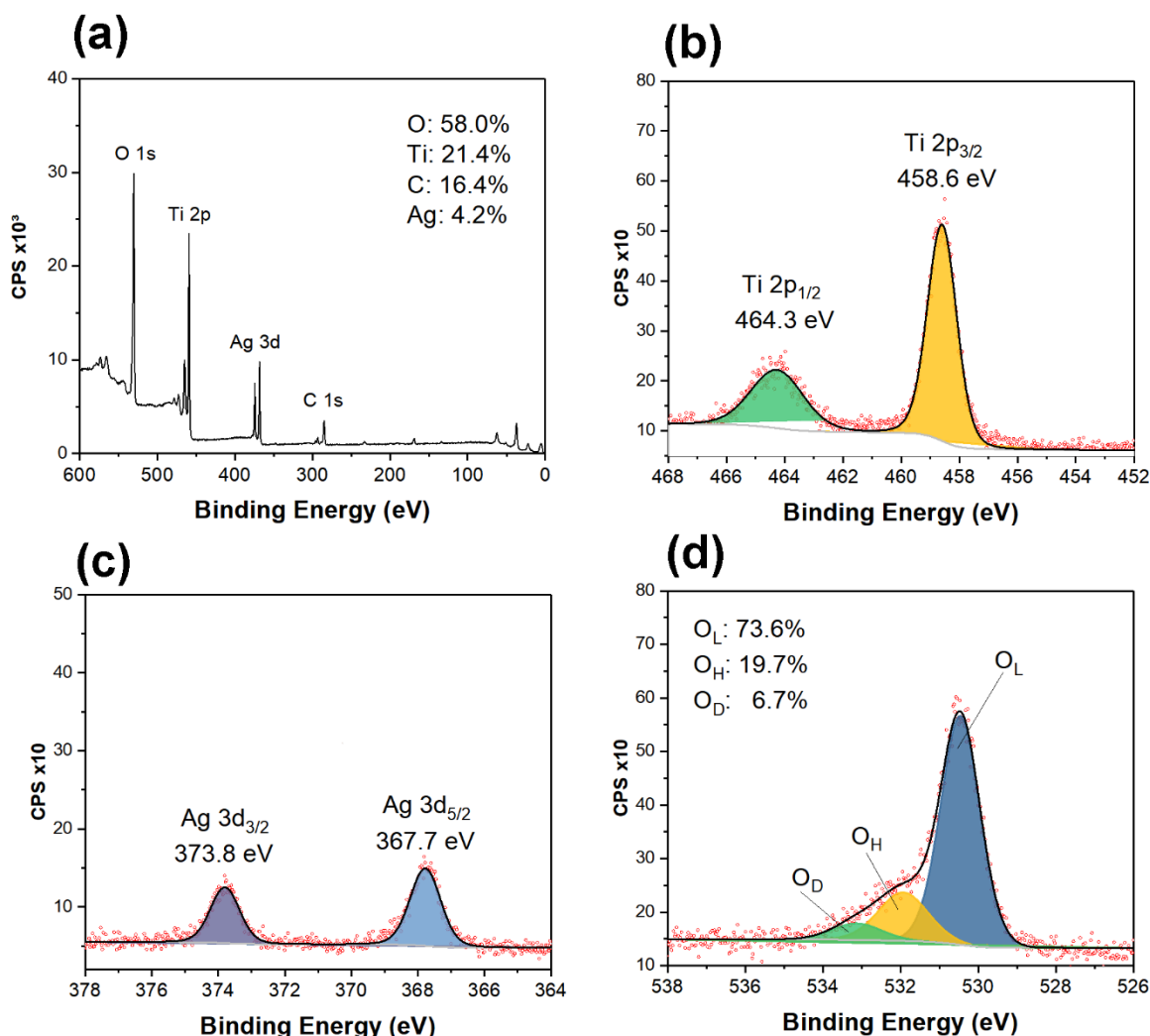


Figure 4. XPS survey spectra of (a) Ag/TiO₂ nanofibers, and XPS high-resolution spectra of (b) Ti2p, (c) Ag3d, and (d) O1s.

Ag/TiO₂ nanofibers exhibited a type IV isotherm, which characterizes materials as mesoporous, with hysteresis loop type H3 (**Fig. 5**). The characteristics of a Type IV isotherm results from surface coverage of the mesopore walls followed by pore filling. A hysteresis loop H3 is associated with plate-like particles with slit-shaped pores [70–72]. The SSA, average pore size, and total pore volume of the Ag/TiO₂ nanofibers were $20.65 \pm 3.1 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$, $11.77 \pm 0.4 \text{ nm}$, and $0.06 \pm 0.006 \text{ cm}^3\text{g}^{-1}$, respectively. The surface area obtained was possibly related to the formation of the rutile phase, which requires higher firing temperatures, with the coalescence of the grains and reduction of micrometric pores [46].

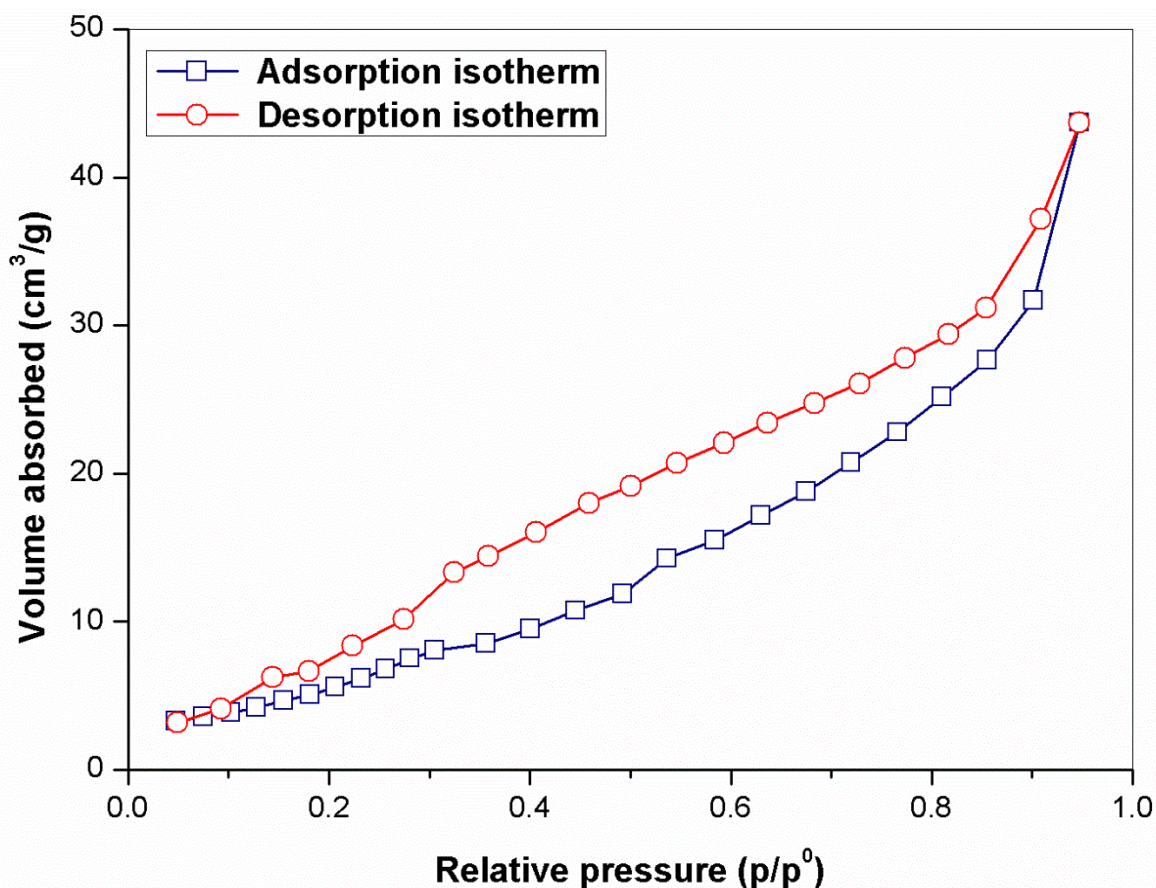


Figure 5. N_2 adsorption/desorption isotherms of Ag/TiO₂ nanofibers.

In the present study, Ag/TiO₂ nanofibers have been characterized as being mesoporous due to the formation of pores with diameters between 2 nm and 50 nm. Efforts are committed to the development of porous materials able to interact with cells and molecules. The type and size of the pore material are characteristics that influence the type of interaction of this material with tissues. Macroporosity is an important property in the development of biomaterials in which cellular responses, such as attachment, differentiation, and cell growth are expected [73,74]. On the other hand, mesoporous materials have fundamental biomedical applications, such as drug storage and delivery, mainly due to their particular surface and textural properties, as well as stable mesostructure, tunable pore size, and the possibility of surface modifications for site-specific delivery [2,75–77].

The contact angle of a biomaterial is an important factor because the interaction between biomaterials may come in contact with biological fluids, depending on the wettability surface behavior of these materials, and it has been proven that an increased wettability plays a significant role in the improvement of cell–materials interactions [24,40].

The contact angle of the nanofiber mats was 0° for Ag/TiO₂, resulting in a superhydrophilic material (**Fig. 6**). This is probably a result of both the nanometric nature of the material, with high surface tension, and the effect of nanosilver on the wettability surface. In a previous study, Ti-Ag and Nb-Ag thin films presented a hydrophilic nature due to the water contact angle of 55.7° and 60.6° obtained for Ti-Ag and Nb-Ag coatings, respectively [39]. In another study [15], a polydopamine (PDA) coating with AgNPs on TiO₂ nanotube arrays (Ag-PDA-TiO₂) and Ag nanoparticles prepared by ultraviolet irradiation on a TiO₂ nanotube array [Ag-TiO₂ (UV)] showed superhydrophilicity. On the other hand, the surface of PDA coating with AgNPs on a Ti surface (Ag-PDA-Ti) presented common hydrophilicity ($58 \pm 1^\circ$), demonstrating that both types of coatings and nanostructure increase the wettability of the surface, while the effect of the nanostructure was much more significant [15].



Figure 6. Water contact angle of Ag/TiO₂ nanofibers.

It is observed that the silver ion release is modulated by the concentration of nanofibers (**Fig. 7**), with concentrations close to $0.08 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and $0.18 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively. In addition, for both concentrations, the released Ag ions were slightly higher over time, despite remaining in a narrow range, which characterizes the material as a slow and prolonged release device.

This type of curve may be related to nanocomposites in which Ag is mostly deposited on the surface of the material [16,37], which corroborates with previous TEM images.

Another important consideration for the nanofibers tested is their dose-dependent effect, with Ag release proportional to the concentration of nanofibers. This behavior allows the control of the Ag release rate and modulation of the biological response of the material. Therefore, a slow and controlled release of Ag ions is decisive, since high doses can trigger toxicity reactions in the body, and high exposure for long periods leads to the development of argyrosis and argyria [17].

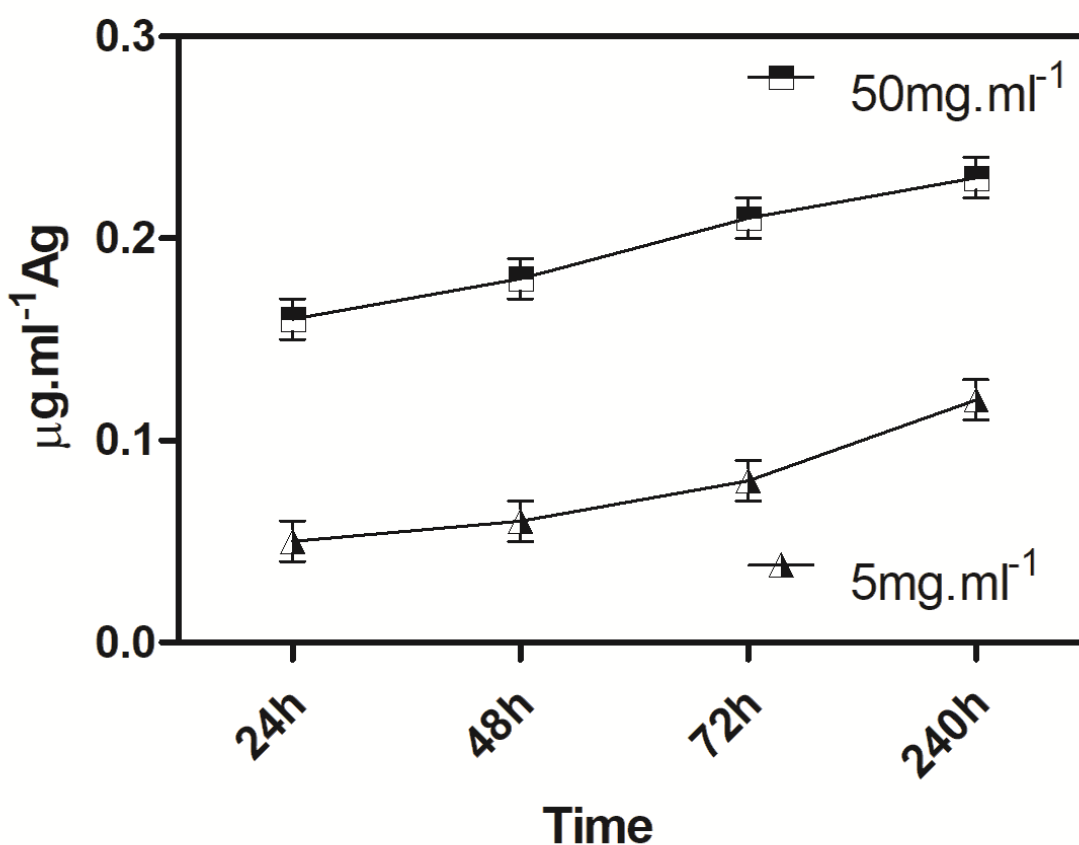


Figure 7. Silver ions released from 5 mg·mL⁻¹ and 50 mg·mL⁻¹ of Ag/TiO₂ nanofibers.

Ag/TiO₂ nanofibers have antimicrobial activity (Fig. 8). They are able to inhibit the growth of gram-positive and negative tested microorganisms, although smaller halos were found against the gram-negative microorganism *E. coli*. The mean inhibition halos (mm) found were 1.429 ± 0.17 , 1.113 ± 0.01 , and 0.540 ± 0.01 for *S. aureus*, *E. faecalis*, and *E. coli*, respectively.

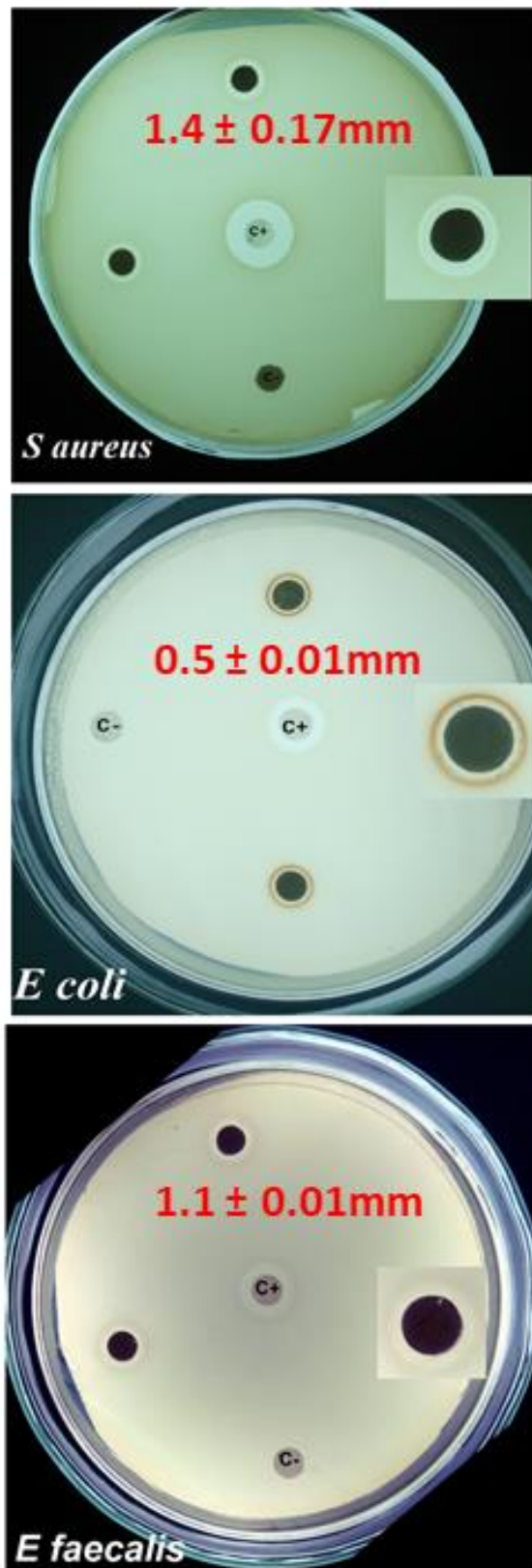


Figure 8. *In vitro* antimicrobial activity of Ag/TiO₂ nanofibers.

The antibacterial effect of the Ag/TiO₂ nanofibers can be attributed to the effect of the ROS produced in the cellular membrane of the microorganism due to interaction between TiO₂

and Ag, as revealed in the XPS analysis, resulting in leakage of the intracellular components and cell death, as well as the germicidal action of the released silver ions [44].

Although the antibacterial mechanisms of Ag ions are not completely elucidated, it has been suggested that Ag can penetrate into bacteria and interact with nucleic acids and impair DNA replication, eventually leading to bacterial death [51]. It has also been reported that Ag ions could bind to proteins that can interfere with cell function and modify cell structure and permeability [18,19] as well as bind to electron donor groups in biological molecules containing sulfur, oxygen, or nitrogen [16].

Our results corroborate with previous studies that observed the antimicrobial potential of TiO₂ nanofibers containing AgNPs (5–10 nm) against *E. faecalis* [78], *E. coli*, and *S. aureus* [79]. Moreover, zones of inhibition were clearer for *S. aureus* than for *E. coli*. The different effects on gram-positive and gram-negative bacteria can be explained by chemical and structural differences in the bacterial cell wall as well the differences in the growth rate between microorganisms, which would allow slow-growing bacteria to be less susceptible to the effect of metal ions [18].

Several studies demonstrate the association of malignancies with an altered composition of commensal microbiota. In addition, the possible role of microbiota in carcinogenesis through its metabolic capacity and influence on immune cells is also discussed [80–84].

A previous study evaluated the blood and oral swab cultures of 40 oral cancer patients undergoing radiotherapy and found that the main microorganisms isolated were *Staphylococcus aureus* (23.2%) and *Escherichia coli* (15.62%) [84]. Besides that, *Enterococcus faecalis* may affect the etiology of oral cancers through interaction with host cells and production of free radicals, with increase EGFR (Epidermal growth factor receptor) activation, double-strand DNA breaks and chromosome instability [80,82].

In vitro cytotoxicity assay in oral cancer was exhibited after 72 h; the lowest concentration of nanofibers (5 mg·mL⁻¹) led to the partial suppression of cell growth, cell shrinkage, and restrictions on cells spreading patterns (**Fig. 9a**). After 120 h (**Fig. 9d**), it was possible to observe the growth of some tumor cells, but it was less pronounced when compared to the control. At a higher concentration of nanofibers (50 mg·mL⁻¹), the total suppression of cell growth in both evaluated periods was evident (**Figs. 9b and d**).

A previous study reported that Ag-doped TiO₂ NPs induced cytotoxicity in human liver cancer (HepG2) cells and that the main mechanisms involved were ROS generation and antioxidant depletion, with dose-dependent behavior proportional to the amount of Ag-doping in TiO₂ NPs [38]. Furthermore, other studies describe the *in vitro* anticancer activity of Ag ions.

Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanofibers incorporated with AgNPs present anticancer activity on the human liver carcinoma cell line (Hep-G2) [22]. *Ficus religiosa* AgNPs decreased the cell viability in a time- and dose-dependent manner in different cancer cell lines, including A549 (human lung adenocarcinoma epithelial cells), HeLa (human cervical carcinoma cells), Hep2 (human epidermoid carcinoma cell line), COLO 205 (human colon cancer cells), and SHSY5Y (human neuroblastoma cells) [5]. AgNPs (4.7 nm and 42 nm) decreased the viability of two different tumor cell lines (hepatoma- Hep-G2 and leukemia-HL-60) in a dose-dependent manner. In addition, AgNPs with 4.7 nm showed significantly higher toxicity than particles with 42 nm in both cell lines used [9].

The primary mechanisms that can explain the anticancer activity of Ag include reduction of the mitochondrial function, generation of oxidative stress, and depletion of intracellular molecular antioxidants such as glutathione [9]. Recently, Das et al. (2017) observed the action of AgNPs as cellular pro-oxidants. These authors showed that the generation of ROS appeared to be associated with the depletion of mitochondrial membrane potential (MMP) and cellular antioxidant levels [5]. Furthermore, oxidative stress and activation of intracellular caspase enzymes induced by ROS would probably be related to DNA damage [8,23,25].

The cytotoxicity was performed on AT-84 murine cells. Previous study showed that At-84 model of oral cancer resembled corresponding human disease, with a similar natural history of the tumor and its response to surgical and chemotherapeutic treatment, making it a valuable model for the test of new therapies [85]. Besides that, macrophages cells (RAW 264.7) were also used, because the biological response to a biomaterial is related to the actions of immune cells in the surrounding tissue involved in the inflammation and wound healing phases. Macrophages are the predominant responsible cell type for directing the tissue reaction to the foreign material and activating in response to infection or the accumulation of damaged or dead cells [13,21].

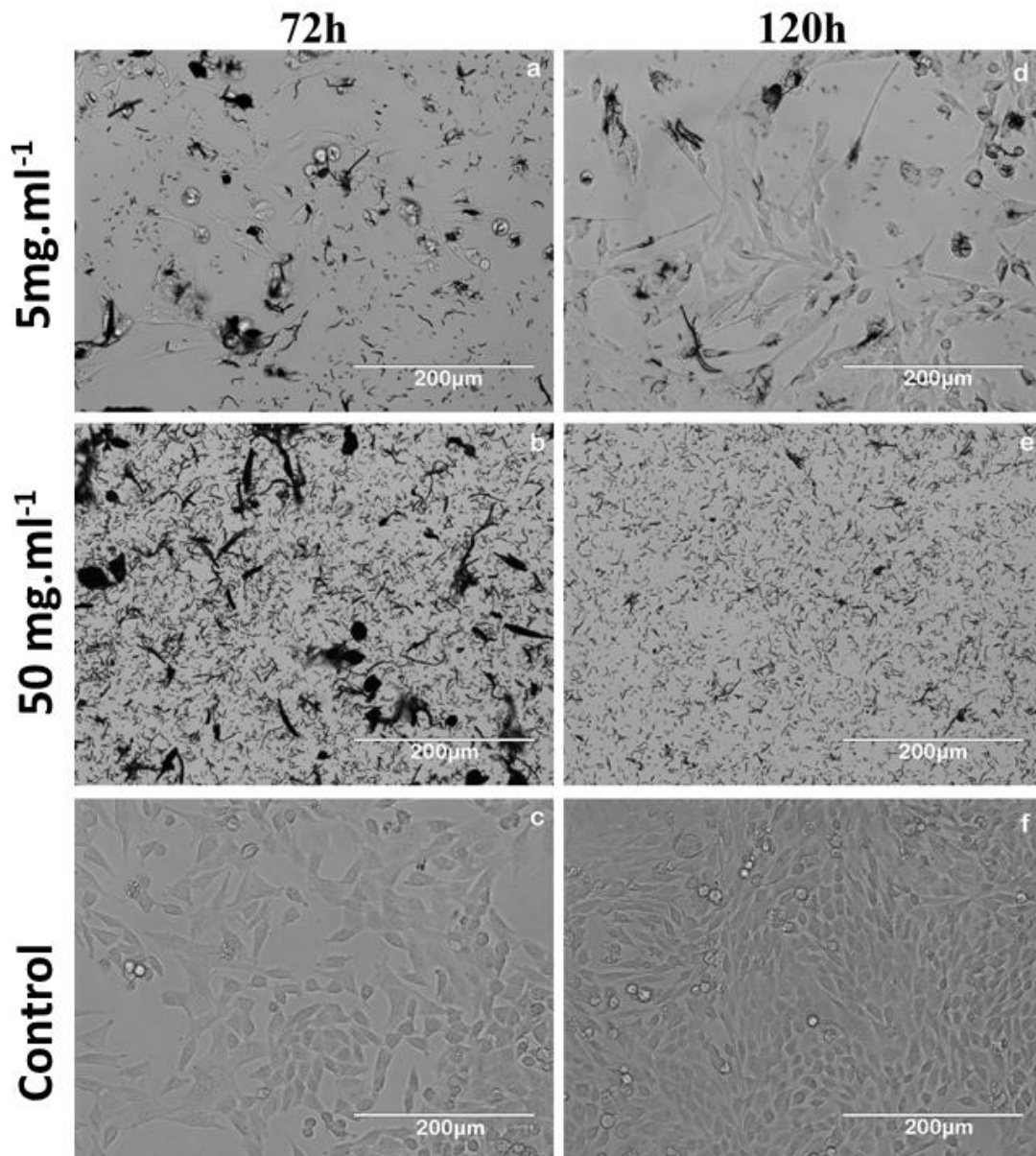


Figure 9. Morphology of murine AT-84 cells after 72-h incubation with (a) 5 mg·mL⁻¹ Ag/TiO₂, (b) 50 mg·mL⁻¹ Ag/TiO₂, (c) untreated cells, and after 120-h incubation with (d) 5 mg·mL⁻¹ Ag/TiO₂, (e) 50 mg·mL⁻¹ Ag/TiO₂, and (f) untreated cells.

Fig. 10 shows the cytotoxicity assay for RAW 264.7 cells cultured for 24 h with Ag/TiO₂ nanofibers. The lower concentration of Ag/TiO₂ nanofibers (5 mg·mL⁻¹) showed behavior similar to that of the control group, with cell viability greater than 60% of the total cells. On the other hand, the higher concentration (50 mg·mL⁻¹) caused a significant decrease in cell viability compared to untreated cells, with a reduction of over 50% in cell viability. A

previous study demonstrated that the cytotoxicity of Ag NPs was dependent on various factors, such as cell type, and the authors concluded that lung epithelial cells were more resistant to the AgNPs than the macrophages [21].

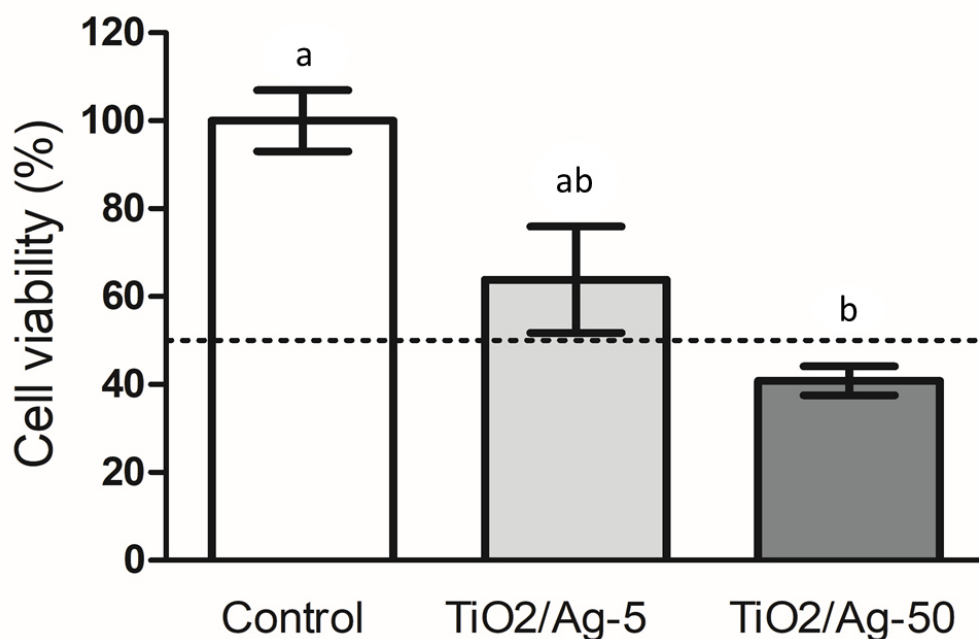


Figure 10. Cytotoxicity assay for macrophage cells (RAW 264.7) cultured for 24 h with Ag/TiO₂-5 (5 mg·mL⁻¹) and Ag/TiO₂-50 (50 mg·mL⁻¹) nanofibers. * Means followed by different lowercase letters in each column indicate significant differences using the Kruskal–Wallis test and Dunn’s Multiple Comparison Test ($p < 0.05$).

In our study, AT-84 cells in contact with Ag/TiO₂ nanofibers during a 48-h period showed less motility and migration capacity compared with the untreated cells (**Fig. 11, Table 2**). It is noted that both concentrations of nanofibers (5 mg·mL⁻¹ and 50 mg·mL⁻¹) were able to significantly inhibit further migration of cells compared to untreated cells. However, the highest concentration was able to completely inhibit cell migration.

In general, the highest concentration of nanofibers (50 mg·mL⁻¹) presented a high suppression capacity of tumor cells, but with a significant deleterious effect on RAW 264.7 cells. On the other hand, the lower concentration (5 mg·mL⁻¹) demonstrated a more discrete antitumor capacity compared to the higher concentration of nanofibers and low toxicity to RAW 264.7 cells. The results confirm the dose-dependent behavior of Ag/TiO₂ nanofibers and further investigation of intermediate nanofiber concentrations appears to be suitable to optimize the therapeutic effect with less toxicity to non-tumor cells.

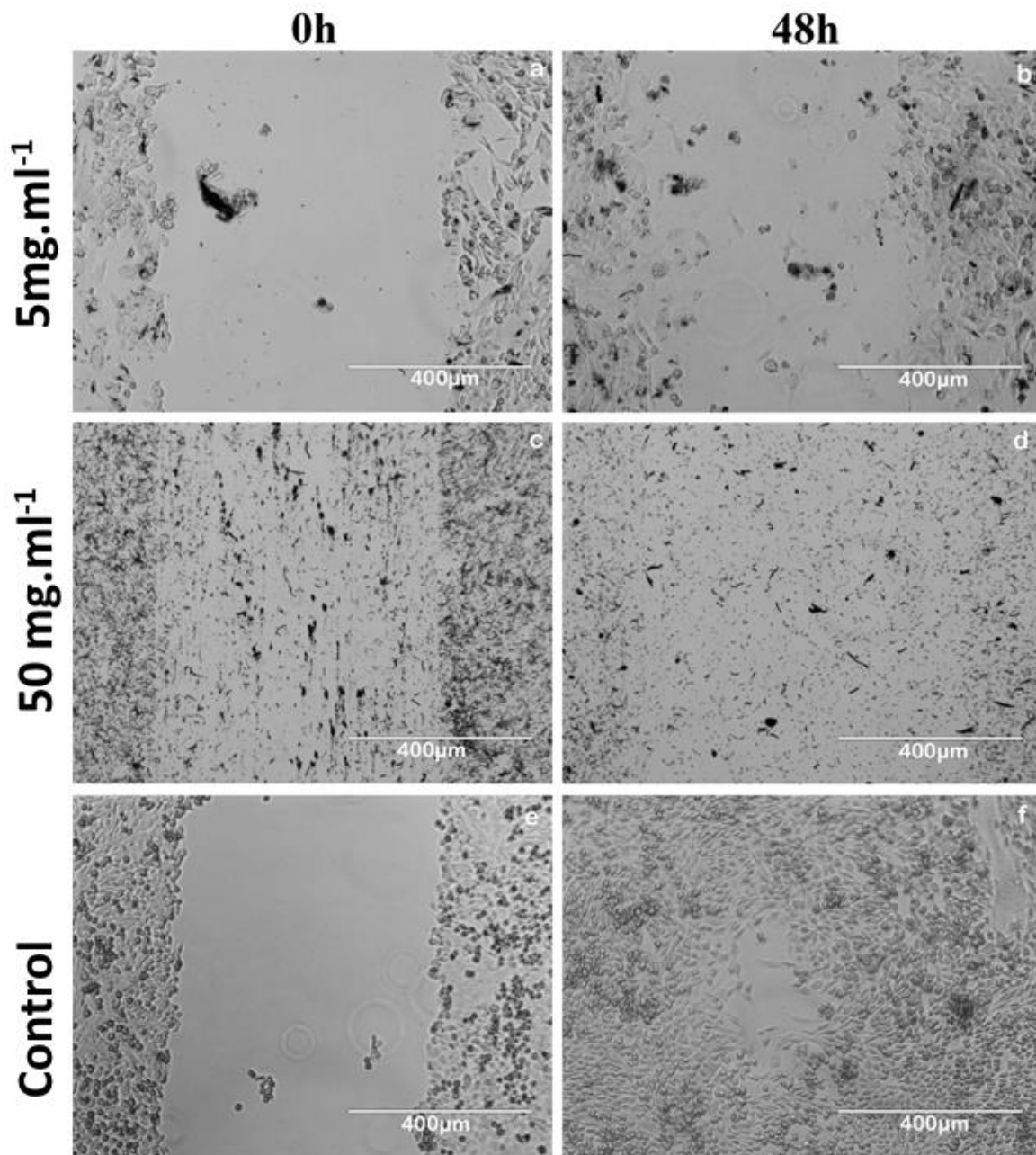


Figure 11. Migration of murine AT-84 cells after (a) 0 h in contact with 5 mg·mL⁻¹ Ag/TiO₂, (b) 48 h in contact with 5 mg·mL⁻¹ Ag/TiO₂, (c) 0 h in contact with 50 mg·mL⁻¹ Ag/TiO₂, (d) 48 h in contact with 50 mg·mL⁻¹ Ag/TiO₂, (e) 0 h untreated cells, and (f) 48 h untreated cells.

Table 2. Migration rate of Murine AT-84 cells after 48h

Sample	Scratch width (μm)		Migration rate of cells after 48h (%)*
	0 h	48 h	
Control	547.51 $\pm$ 13.83	59.84 $\pm$ 56.64	89.07 ^a
Ag/TiO ₂ -5mg	615.12 $\pm$ 27.00	479.89 $\pm$ 36.06	21.94 ^b
Ag/TiO ₂ -50mg	601.31 $\pm$ 36.01	1032.96 $\pm$ 0.00	0.0 ^c

* Means followed by different lowercase letters indicates significant differences using the Kruskal-Wallis and Mann-Whitney U tests ($p < 0.05$).

Expression levels of some apoptotic-related genes were investigated to clarify the molecular mechanism of Ag/TiO₂ nanofibers (**Fig. 12**). Our results show an increase in mbax, mMyc, and mTrp53 genes expression for both murine AT-84 cells and macrophages after exposure to Ag/TiO₂ nanofibers. On the other hand, there was a reduction in the mBcl2 gene for both cell lines tested. mCasp 8 had increased expression in macrophages, but the same did not occur in murine AT-84 cells, while an increase in mCasp 9 expression was not observed, but a more significant expression was found in the higher concentrations of Ag/TiO₂ nanofibers tested.

Apoptosis is a known mechanism of programmed cell death involving the elimination of cells in which cellular DNA is damaged [38]. Apoptotic regulation could be related to the combined activity of Bcl-2 and Bax genes. Reduction of anti-apoptotic Bcl-2 expression and an increase of pro-apoptotic Bax expression could trigger the mitochondrial pathway of cell death induced by the AgNPs. In addition, increased Bax expression as well as suppression of BCL-2 expression could result from increased expression of Myc and p53 genes [8,23,25]. Previous studies have observed the apoptotic activity of AgNPs [8,23,25].

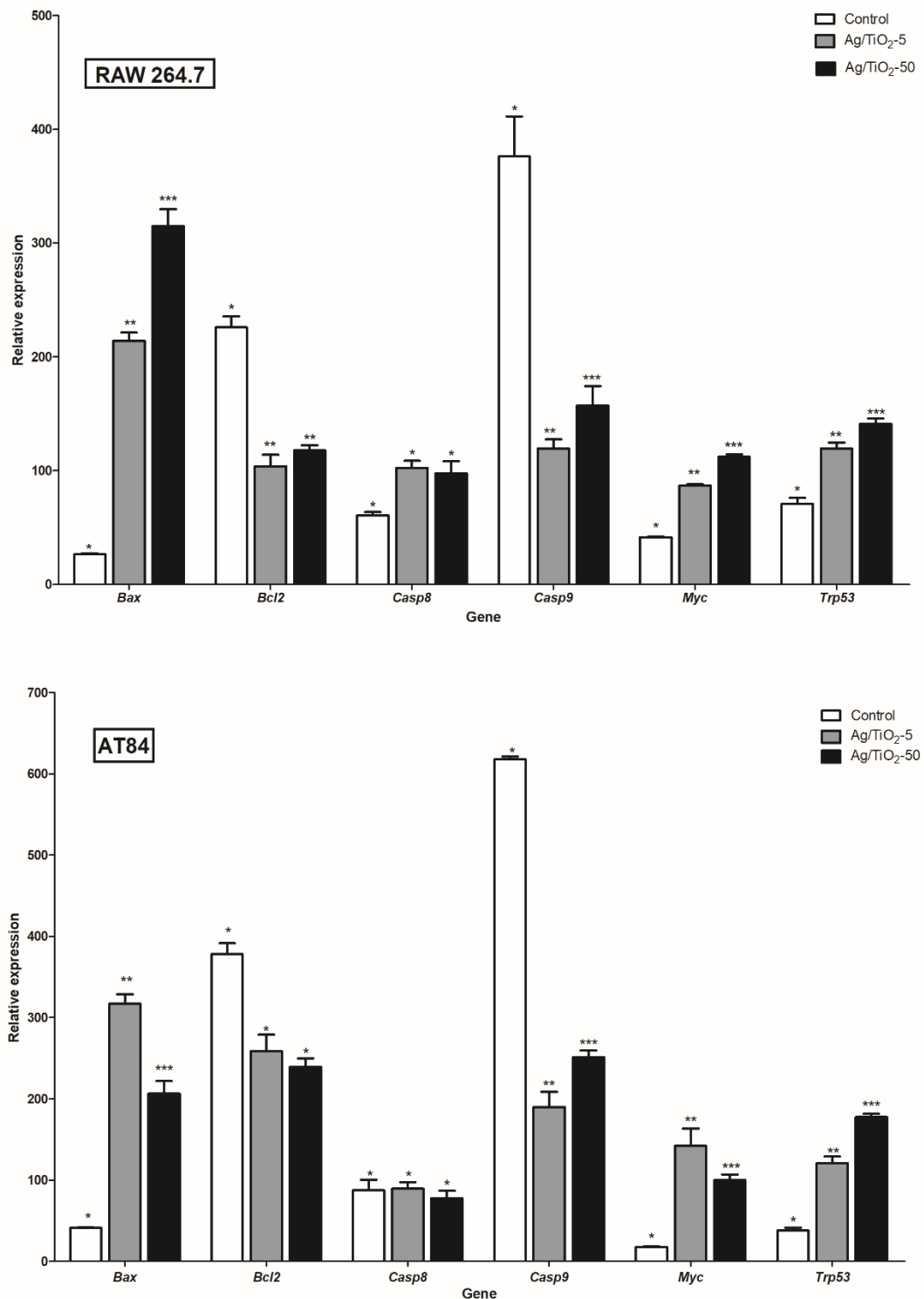


Figure 12. Gene expression in macrophages (RAW 264.7) and murine AT-84 cells after 48 h. Different asterisk in each column indicates significant differences in gene expression using the Kruskal–Wallis test and Dunn’s Multiple Comparison Test ($p < 0.05$).

Activation of caspase 9 would be expected [8,25], but in the present study, it was not observed. The increase would probably be observed in a longer time period of evaluation. Despite this, higher values were obtained in the higher concentration of Ag/TiO₂ nanofibers,

confirming their apoptotic potential. Finally, Ag/TiO₂ nanofibers also showed some selectivity regarding cell types. In general, higher expressions of the pro-apoptotic genes and greater anti-apoptotic gene suppression were observed in tumor cells (AT-84).

In the present study, the antimicrobial and anticancer activities of Ag/TiO₂ nanofibers were investigated. Cancer patients usually exhibit immunocompromising due to multiple factors, such as chemotherapy, radiation therapy, normal leukocyte function impairment, or corticosteroid use, with high susceptibility to infection, especially bacterial and fungal infection [84]. Additionally, some studies discuss a possible relationship between the oral microbiome and oral cancer [86–88]. In the oral cavity, there are more than 700 microbial species, some of which could be related to deregulation of signaling pathways, including interference in programmed cell death or apoptosis in epithelial cells [86,87].

Our results suggest that the high performance of Ag/TiO₂ nanofibers is probably a result of the nanometric dimension associated with an improved surface area, superhydrophilic nature, and high surface reactivity, as well as the atomic interaction between TiO₂ and Ag. This last feature can be explained by the combination of TiO₂, a semiconductor, and Ag, which generates an electron transfer at the metal–semiconductor interface, with subsequent superoxide, hydrogen ions (H⁺), and/or OOH/radicals formation by electron-hole reactions [35]. This property could potentiate Ag ion effects on cells, such as protein inactivation and apoptosis. Another important aspect is the dose-dependent effect of the material, which would allow its use with efficacy and minor side effects. Ag/TiO₂ nanofibers may have potential use as a topical agent in combination with other systemic therapies, to ensure increased efficiency in the elimination of cancer cells and to avoid possible bacterial contamination at tumor wounds.

4. Conclusions

Mesoporous and superhydrophilic TiO₂ nanofibers with AgNPs (average size 15 nm) immobilized on the surface were successfully synthesized based on a one-step process using the SBS technique. The produced material showed antimicrobial activity against microorganisms such as *S. aureus*, *E. faecalis*, and *E. coli*. The release of Ag ions from two different Ag/TiO₂ nanofibers (5 and 50 mg·mL⁻¹) was close to 0.08 µg·mL⁻¹ and 0.18 µg·mL⁻¹, respectively. The highest concentration completely inhibited the proliferation and migration of oral cancer cells. The high surface reactivity, the atomic interaction between TiO₂ and Ag associated with the release of Ag ions are probably the main mechanisms contributing to the

high performance of the produced nanofibers. The observed biological effects demonstrate the potential of Ag/TiO₂ nanofibers for use in antimicrobial and anticancer therapy.

Acknowledgment

The author's thanks Prof. Dr. Thiago Araújo Simões for the scientific support with the XPS analysis, Prof. Dr. André Ulisses Dantas Batista for contribution in the statistical analysis of data and contact angle determination.

5. References

- [1] N. Arjunan, H.L.J. Kumari, C.M. Singaravelu, R. Kandasamy, J. Kandasamy, Physicochemical investigations of biogenic chitosan-silver nanocomposite as antimicrobial and anticancer agent, *Int. J. Biol. Macromol.* 92 (2016) 77–87. doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.07.003.
- [2] M. Shoaib, A. Saeed, M.S.U. Rahman, M.M. Naseer, Mesoporous nano-bioglass designed for the release of imatinib and in vitro inhibitory effects on cancer cells, *Mater. Sci. Eng. C.* 77 (2017) 725–730. doi:10.1016/j.msec.2017.03.288.
- [3] J. Giralt, J. Trigo, S. Nuyts, M. Ozsahin, K. Skladowski, G. Hatoum, J.-F. Daisne, A.C. Yunes Ancona, A. Cmelak, R. Mesia, A. Zhang, K.S. Oliner, A. VanderWalde, Panitumumab plus radiotherapy versus chemoradiotherapy in patients with unresected, locally advanced squamous-cell carcinoma of the head and neck (CONCERT-2): a randomised, controlled, open-label phase 2 trial., *Lancet. Oncol.* 16 (2015) 221–232. doi:10.1016/S1470-2045(14)71200-8.
- [4] F. Pezzuto, L. Buonaguro, F. Caponigro, F. Ionna, N. Starita, C. Annunziata, F.M. Buonaguro, M.L. Tornesello, Update on Head and Neck Cancer: Current Knowledge on Epidemiology, Risk Factors, Molecular Features and Novel Therapies., *Oncology.* 89 (2015) 125–136. doi:10.1159/000381717.
- [5] J.R. Nakkala, R. Mata, S.R. Sadras, Green synthesized nano silver: Synthesis, physicochemical profiling, antibacterial, anticancer activities and biological in vivo toxicity, *J. Colloid Interface Sci.* 499 (2017) 33–45. doi:10.1016/j.jcis.2017.03.090.
- [6] B. Das, S. Tripathy, J. Adhikary, S. Chattopadhyay, D. Mandal, S.K. Dash, S. Das, A. Dey, S.K. Dey, D. Das, S. Roy, Surface modification minimizes the toxicity of silver nanoparticles: an in vitro and in vivo study, *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* 22 (2017) 893–918. doi:10.1007/s00775-017-1468-x.
- [7] R. Avolio, M. D'Albore, V. Guarino, G. Gentile, M.C. Cocca, S. Zeppetelli, M.E. Errico,

- M. Avella, L. Ambrosio, Pure titanium particle loaded nanocomposites: study on the polymer/filler interface and hMSC biocompatibility, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 27 (2016). doi:10.1007/s10856-016-5765-7.
- [8] A.A. Kajani, S.H. Zarkesh-Esfahani, A.-K. Bordbar, A.R. Khosropour, A. Razmjou, M. Kardi, Anticancer effects of silver nanoparticles encapsulated by *Taxus baccata* extracts, *J. Mol. Liq.* 223 (2016) 549–556. doi:10.1016/j.molliq.2016.08.064.
- [9] A. Avalos, A.I. Haza, D. Mateo, P. Morales, Cytotoxicity and ROS production of manufactured silver nanoparticles of different sizes in hepatoma and leukemia cells, *J. Appl. Toxicol.* 34 (2014) 413–423. doi:10.1002/jat.2957.
- [10] M.K. Rai, S.D. Deshmukh, A.P. Ingle, A.K. Gade, Silver nanoparticles: The powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria, *J. Appl. Microbiol.* 112 (2012) 841–852. doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05253.x.
- [11] B.S. Atiyeh, M. Costagliola, S.N. Hayek, S.A. Dibo, Effect of silver on burn wound infection control and healing: Review of the literature, *Burns*. 33 (2007) 139–148. doi:10.1016/j.burns.2006.06.010.
- [12] S. Pal, Y.K. Tak, J.M. Song, Does the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Depend on the Shape of the Nanoparticle? A Study of the Gram-Negative Bacterium *Escherichia coli*, *Appl. Environ. Microbiol.* 73 (2007) 1712–1720. doi:10.1128/AEM.02218-06.
- [13] K.B. Riaz Ahmed, A.M. Nagy, R.P. Brown, Q. Zhang, S.G. Malghan, P.L. Goering, Silver nanoparticles: Significance of physicochemical properties and assay interference on the interpretation of in vitro cytotoxicity studies, *Toxicol. Vitro*. 38 (2017) 179–192. doi:10.1016/j.tiv.2016.10.012.
- [14] G.A. Sotiriou, S.E. Pratsinis, Antibacterial activity of nanosilver ions and particles, *Environ. Sci. Technol.* 44 (2010) 5649–5654. doi:10.1021/es101072s.
- [15] J. Xu, N. Xu, T. Zhou, X. Xiao, B. Gao, J. Fu, T. Zhang, Polydopamine coatings embedded with silver nanoparticles on nanostructured titania for long-lasting antibacterial effect, *Surf. Coatings Technol.* 320 (2017) 608–613. doi:10.1016/j.surfcoat.2016.10.065.
- [16] R. Kumar, H. Münstedt, Silver ion release from antimicrobial polyamide/silver composites, *Biomaterials*. 26 (2005) 2081–2088. doi:10.1016/j.biomaterials.2004.05.030.
- [17] G. Ximing, G. Bin, W. Yuanlin, G. Shuanghong, Preparation of spherical metal–organic frameworks encapsulating Ag nanoparticles and study on its antibacterial activity, *Mater.*

- Sci. Eng. C. 80 (2017) 698–707. doi:10.1016/j.msec.2017.07.027.
- [18] Z. Vardanyan, V. Gevorkyan, M. Ananyan, H. Vardapetyan, A. Trchounian, Effects of various heavy metal nanoparticles on *Enterococcus hirae* and *Escherichia coli* growth and proton-coupled membrane transport., *J. Nanobiotechnology*. 13 (2015) 69. doi:10.1186/s12951-015-0131-3.
- [19] J. Wang, J. Li, G. Guo, Q. Wang, J. Tang, Y. Zhao, H. Qin, T. Wahafu, H. Shen, X. Liu, X. Zhang, Silver-nanoparticles-modified biomaterial surface resistant to staphylococcus: new insight into the antimicrobial action of silver., *Sci. Rep.* 6 (2016) 32699. doi:10.1038/srep32699.
- [20] N. Igaz, D. Kovács, Z. Rázga, Z. Kónya, I.M. Boros, M. Kiricsi, Modulating chromatin structure and DNA accessibility by deacetylase inhibition enhances the anti-cancer activity of silver nanoparticles, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 146 (2016) 670–677. doi:10.1016/j.colsurfb.2016.07.004.
- [21] A.K. Suresh, D.A. Pelletier, W. Wang, J.L. Morrell-Falvey, B. Gu, M.J. Doktycz, Cytotoxicity induced by engineered silver nanocrystallites is dependent on surface coatings and cell types, *Langmuir*. 28 (2012) 2727–2735. doi:10.1021/la2042058.
- [22] F.N. Almajhdi, H. Fouad, K.A. Khalil, H.M. Awad, S.H.S. Mohamed, T. Elsarnagawy, A.M. Albarrag, F.F. Al-Jassir, H.S. Abdo, In-vitro anticancer and antimicrobial activities of PLGA/silver nanofiber composites prepared by electrospinning, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 25 (2014) 1045–1053. doi:10.1007/s10856-013-5131-y.
- [23] M. Jeyaraj, M. Rajesh, R. Arun, D. MubarakAli, G. Sathishkumar, G. Sivanandhan, G.K. Dev, M. Manickavasagam, K. Premkumar, N. Thajuddin, A. Ganapathi, An investigation on the cytotoxicity and caspase-mediated apoptotic effect of biologically synthesized silver nanoparticles using *Podophyllum hexandrum* on human cervical carcinoma cells, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 102 (2013) 708–717. doi:10.1016/j.colsurfb.2012.09.042.
- [24] P. Dubey, P. Gopinath, Fabrication of electrospun poly(ethylene oxide)–poly(caprolactone) composite nanofibers for co-delivery of niclosamide and silver nanoparticles exhibits enhanced anti-cancer effects in vitro, *J. Mater. Chem. B*. 4 (2016) 726–742. doi:10.1039/C5TB02351C.
- [25] S.J. Jang, I.J. Yang, C.O. Tettey, K.M. Kim, H.M. Shin, In-vitro anticancer activity of green synthesized silver nanoparticles on MCF-7 human breast cancer cells, *Mater. Sci. Eng. C*. 68 (2016) 430–435. doi:10.1016/j.msec.2016.03.101.
- [26] C. Marambio-Jones, E.M. V. Hoek, A review of the antibacterial effects of silver

- nanomaterials and potential implications for human health and the environment, *J. Nanoparticle Res.* 12 (2010) 1531–1551. doi:10.1007/s11051-010-9900-y.
- [27] A. Kedziora, K. Korzekwa, W. Strek, A. Pawlak, W. Doroszkiewicz, G. Bugla-Ploskonska, Silver Nanoforms as a Therapeutic Agent for Killing *Escherichia coli* and Certain ESKAPE Pathogens, *Curr. Microbiol.* 73 (2016) 139–147. doi:10.1007/s00284-016-1034-8.
- [28] L. Qiu, Y. Zhao, N. Cao, L. Cao, L. Sun, X. Zou, Silver nanoparticle-gated fluorescence porous silica nanospheres for glutathione-responsive drug delivery, *Sensors Actuators, B Chem.* 234 (2016) 21–26. doi:10.1016/j.snb.2016.04.136.
- [29] S. Calamak, E.A. Aksoy, N. Ertas, C. Erdogdu, M. Sagioglu, K. Ulubayram, Ag/silk fibroin nanofibers: Effect of fibroin morphology on Ag⁺ release and antibacterial activity, *Eur. Polym. J.* 67 (2015) 99–112. doi:10.1016/j.eurpolymj.2015.03.068.
- [30] R.F. Bonan, P.R.F. Bonan, A.U.D. Batista, F.C. Sampaio, A.J.R. Albuquerque, M.C.B. Moraes, L.H.C. Mattoso, G.M. Glenn, E.S. Medeiros, J.E. Oliveira, In vitro antimicrobial activity of solution blow spun poly (lactic acid)/ polyvinylpyrrolidone nano fi bers loaded with Copaiba (*Copaifera sp.*) oil, *Mater. Sci. Eng. C.* 48 (2015) 372–377. doi:10.1016/j.msec.2014.12.021.
- [31] D.L. Costa, R.S. Leite, G.A. Neves, L.N. de L. Santana, E.S. Medeiros, R.R. Menezes, Synthesis of TiO₂ and ZnO nano and submicrometric fibers by solution blow spinning, *Mater. Lett.* 183 (2016) 109–113. doi:10.1016/j.matlet.2016.07.073.
- [32] E.S. Medeiros, G.M. Glenn, A.P. Klamczynski, W.J. Orts, L.H.C. Mattoso, Solution Blow Spinning: A New Method to Produce Micro- and Nanofibers from Polymer Solutions, *J. Appl. Polym. Sci.* 113 (2009) 2322–2330. doi:10.1002/app.30275.
- [33] A.M.C. Santos, M.F. Mota, R.S. Leite, G.A. Neves, E.S. Medeiros, R.R. Menezes, Solution blow spun titania nanofibers from solutions of high inorganic/organic precursor ratio, *Ceram. Int.* 44 (2018) 1681–1689. doi:10.1016/j.ceramint.2017.10.096.
- [34] S.B. Spinning, HHS Public Access, 2017. doi:10.1021/acsami.6b12994.A.
- [35] R.S. André, C.A. Zamperini, E.G. Mima, V.M. Longo, A.R. Albuquerque, J.R. Sambrano, A.L. Machado, C.E. Vergani, A.C. Hernandez, J.A. Varela, E. Longo, Antimicrobial activity of TiO₂:Ag nanocrystalline heterostructures: Experimental and theoretical insights, *Chem. Phys.* 459 (2015) 87–95. doi:10.1016/j.chemphys.2015.07.020.
- [36] X. Hou, H. Ma, F. Liu, J. Deng, Y. Ai, X. Zhao, D. Mao, D. Li, B. Liao, Synthesis of Ag ion-implanted TiO₂ thin films for antibacterial application and photocatalytic

- performance, *J. Hazard. Mater.* 299 (2015) 59–66. doi:10.1016/j.jhazmat.2015.05.014.
- [37] P. Piszczek, Ź. Lewandowska, A. Radtke, T. Jędrzejewski, W. Kozak, B. Sadowska, M. Szubka, E. Talik, F. Fiori, Biocompatibility of titania nanotube coatings enriched with silver nanograins by chemical vapor deposition, *Nanomaterials*. 7 (2017). doi:10.3390/nano7090274.
- [38] M. Ahamed, M.A.M. Khan, M.J. Akhtar, H.A. Alhadlaq, A. Alshamsan, Ag-doping regulates the cytotoxicity of TiO₂ nanoparticles via oxidative stress in human cancer cells, *Sci. Rep.* 7 (2017) 17662. doi:10.1038/s41598-017-17559-9.
- [39] D. Wojcieszak, M. Mazur, D. Kaczmarek, P. Mazur, B. Szponar, J. Domaradzki, L. Kepinski, Influence of the surface properties on bactericidal and fungicidal activity of magnetron sputtered Ti–Ag and Nb–Ag thin films, *Mater. Sci. Eng. C*. 62 (2016) 86–95. doi:10.1016/j.msec.2016.01.029.
- [40] A. Shivaram, S. Bose, A. Bandyopadhyay, Mechanical degradation of TiO₂ nanotubes with and without nanoparticulate silver coating, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 59 (2016) 508–518. doi:10.1016/j.jmbbm.2016.02.028.
- [41] S. Demirci, T. Dikici, M. Yurddaskal, S. Gultekin, M. Toparli, E. Celik, Synthesis and characterization of Ag doped TiO₂ heterojunction films and their photocatalytic performances, *Appl. Surf. Sci.* 390 (2016) 591–601. doi:10.1016/j.apsusc.2016.08.145.
- [42] D. Gao, Z. Lu, C. Wang, W. Li, P. Dong, Enhanced Photocatalytic Properties of Ag-Loaded N-Doped TiO₂ Nanotube Arrays, *Autex Res. J.* 18 (2018) 67–72. doi:10.1515/aut-2017-0005.
- [43] S. Chen, Y. Liao, H.-Y. Jiang, Y. Geng, G. Lei, G. Xie, Rapid organic degradation and bacteria destruction under visible light by ternary photocatalysts of Ag/AgX/TiO₂, *J. Environ. Chem. Eng.* 5 (2017) 5566–5572. doi:10.1016/j.jece.2017.10.045.
- [44] B. Moongraksathum, Y.W. Chen, Anatase TiO₂ co-doped with silver and ceria for antibacterial application, *Catal. Today*. 310 (2018) 68–74. doi:10.1016/j.cattod.2017.05.087.
- [45] J. Llorca, I. Tbesi, S. Sayadi, M. Benito, E. Molins, W. Najjar, Silver and manganese co-doped titanium oxide aerogel for effective diclofenac degradation under UV-A light irradiation, *J. Alloys Compd.* 779 (2018) 314–325. doi:10.1016/j.jallcom.2018.11.083.
- [46] S. Chuangchote, J. Jitputti, T. Sagawa, S. Yoshikawa, Photocatalytic Activity for Hydrogen Evolution of Electrospun TiO₂ Nanofibers, *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 1 (2009) 1140–1143. doi:10.1021/am9001474.
- [47] M. Nasr, C. Eid, R. Habchi, P. Miele, M. Bechelany, Recent Progress on Titanium

- Dioxide Nanomaterials for Photocatalytic Applications, *ChemSusChem*. 11 (2018) 3023–3047. doi:10.1002/cssc.201800874.
- [48] C.A. Huerta-Aguilar, V. Palos-Barba, P. Thangarasu, R.T. Koodali, Visible light driven photo-degradation of Congo red by TiO₂–ZnO/Ag: DFT approach on synergetic effect on band gap energy, *Chemosphere*. 213 (2018) 481–497. doi:10.1016/j.chemosphere.2018.09.053.
- [49] Y. Zhang, S.-J. Park, Facile construction of MoO₃@ZIF-8 core-shell nanorods for efficient photoreduction of aqueous Cr (VI), *Appl. Catal. B Environ.* 240 (2019) 92–101. doi:10.1016/j.apcatb.2018.08.077.
- [50] Y. Zhang, S.J. Park, Bimetallic AuPd alloy nanoparticles deposited on MoO₃ nanowires for enhanced visible-light driven trichloroethylene degradation, *J. Catal.* 361 (2018) 238–247. doi:10.1016/j.jcat.2018.03.010.
- [51] W.I. Abdel-Fatah, M.M. Gobara, S.F.M. Mustafa, G.W. Ali, O.W. Guirguis, Role of silver nanoparticles in imparting antimicrobial activity of titanium dioxide, *Mater. Lett.* 179 (2016) 190–193. doi:10.1016/j.matlet.2016.05.063.
- [52] X.Z. Y. Huang, G. Song, X. Chang, Z. Wang, X.Zhang, S. Han, Z. Su, H. Yang, bactericidal effects and osteoinductivity of Ti for biomedical applications, *Int. J. Nanomedicine*. 13 (2018) 2665–2684. doi:10.1016/j.intjnm.2018.05.013.
- [53] P. Bansal, A. Verma, N. Ag co-doped TiO₂ mediated modified in-situ dual process (modified photocatalysis and photo-Fenton) in fixed-mode for the degradation of Cephalexin under solar irradiations, *Chemosphere*. 212 (2018) 611–619. doi:10.1016/j.chemosphere.2018.08.120.
- [54] G.L. Colpani, M.A. Fiori, A.T.O. Dal’Toé, C. Soares, N. Padoin, Lanthanum doped titania decorated with silver plasmonic nanoparticles with enhanced photocatalytic activity under UV-visible light, *Appl. Surf. Sci.* 441 (2018) 1057–1071. doi:10.1016/j.apsusc.2018.01.291.
- [55] Clinical and Laboratory Standards Institute, Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved Standard - Twelfth Edition, (2015) 15.
- [56] N.A. Razak, N. Abu, W.Y. Ho, N.R. Zambari, S.W. Tan, N.B. Alitheen, K. Long, S.K. Yeap, Cytotoxicity of eupatorin in MCF-7 and MDA-MB-231 human breast cancer cells via cell cycle arrest, anti-angiogenesis and induction of apoptosis, *Sci. Rep.* 9 (2019) 1–12. doi:10.1038/s41598-018-37796-w.
- [57] A.A. Baharuddin, R.A.J. Roosli, Z.A. Zakaria, S.F.M. Tohid, *Dicranopteris linearis* extract inhibits the proliferation of human breast cancer cell line (Mda-mb-231) via

- induction of s-phase arrest and apoptosis, *Pharm. Biol.* 56 (2018) 422–432. doi:10.1080/13880209.2018.1495748.
- [58] K. Xiang, Z. Dou, Y. Li, Y. Xu, J. Zhu, S. Yang, H. Sun, Y. Liu, Cytotoxicity and TNF- α Secretion in RAW264.7 Macrophages Exposed to Different Fullerene Derivatives, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 12 (2012) 2169–2178. doi:10.1166/jnn.2012.5681.
- [59] P.E. Petrochenko, S.A. Skoog, Q. Zhang, D.J. Comstock, J.W. Elam, P.L. Goering, R.J. Narayan, Cytotoxicity of cultured macrophages exposed to antimicrobial zinc oxide (ZnO) coatings on nanoporous aluminum oxide membranes, *Biomater.* 3 (2013) e25528. doi:10.4161/biom.25528.
- [60] C.-C. Liang, A.Y. Park, J.-L. Guan, In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro, *Nat. Protoc.* 2 (2007) 329–333. doi:10.1038/nprot.2007.30.
- [61] P. Aramwit, S. Palapinyo, T. Srichana, S. Chottanapund, P. Muangman, Silk sericin ameliorates wound healing and its clinical efficacy in burn wounds, *Arch. Dermatol. Res.* 305 (2013) 585–594. doi:10.1007/s00403-013-1371-4.
- [62] S.A. Bustin, J.-F. Beaulieu, J. Huggett, R. Jaggi, F.S.B. Kibenge, P.A. Olsvik, L.C. Penning, S. Toegel, MIQE precis: Practical implementation of minimum standard guidelines for fluorescence-based quantitative real-time PCR experiments., *BMC Mol. Biol.* 11 (2010) 74. doi:10.1186/1471-2199-11-74.
- [63] M.W. Pfaffl, A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR., *Nucleic Acids Res.* 29 (2001) e45.
- [64] H. Li, Q. Cui, B. Feng, J. Wang, X. Lu, J. Weng, Antibacterial activity of TiO₂ nanotubes: Influence of crystal phase, morphology and Ag deposition, *Appl. Surf. Sci.* 284 (2013) 179–183. doi:10.1016/j.apsusc.2013.07.076.
- [65] R.M.D.C. Farias, R.R. Menezes, J.E. Oliveira, E.S. de Medeiros, Production of submicrometric fibers of mullite by solution blow spinning (SBS), *Mater. Lett.* 149 (2015) 47–49. doi:10.1016/j.matlet.2015.02.111.
- [66] Y. Sun, B. Mayers, Y. Xia, Transformation of Silver Nanospheres into Nanobelts and Triangular Nanoplates through a Thermal Process, *Nano Lett.* 3 (2003) 675–679. doi:10.1021/nl034140t.
- [67] H. Wang, L. Le, J. Shi, R. Xiong, J. Xu, Z. Zhou, Effect of oxygen vacancies and Ag deposition on the magnetic properties of Ag/N co-doped TiO₂ single-crystal films, *Mater. Res. Bull.* 102 (2018) 337–341. doi:10.1016/j.materresbull.2018.01.045.
- [68] R. Fang, Q. Feng, J. Ji, M. He, Y. Zhan, W. Zhao, H. Huang, D.Y.C. Leung, Effect of

- redox state of Ag on indoor formaldehyde degradation over Ag/TiO₂ catalyst at room temperature, *Chemosphere*. 213 (2018) 235–243. doi:10.1016/j.chemosphere.2018.09.019.
- [69] T. Jędrzejewski, W. Kozak, Ż. Lewandowska, B. Sadowska, P. Piszczek, M. Szubka, A. Radtke, E. Talik, F. Fiori, Biocompatibility of Titania Nanotube Coatings Enriched with Silver Nanograins by Chemical Vapor Deposition, *Nanomaterials*. 7 (2017) 274. doi:10.3390/nano7090274.
- [70] K.S.. Sing, Adsorption methods for the characterization of porous materials, *Adv. Colloid Interface Sci.* 76–77 (1998) 3–11. doi:10.1016/S0001-8686(98)00038-4.
- [71] K.S.W. Sing, R.T. Williams, Physisorption Hysteresis Loops and the Characterization of Nanoporous Materials, *Adsorpt. Sci. Technol.* 22 (2004) 773–782. doi:10.1260/0263617053499032.
- [72] K.S.W. Sing, D.H. Everett, R.A.W. Haul, L. Moscou, R.A. Pierotti, J. Rouquérol, T. Siemienewska, Reporting physisorption data for gas/solid systems with special reference to the determination of surface area and porosity (Recommendations 1984), *Pure Appl. Chem.* 57 (1985) 603–619.
- [73] M. Vallet-Regí, E. Ruiz-Hernández, Bioceramics: From bone regeneration to cancer nanomedicine, *Adv. Mater.* 23 (2011) 5177–5218. doi:10.1002/adma.201101586.
- [74] S. Wang, Ordered mesoporous materials for drug delivery, *Microporous Mesoporous Mater.* 117 (2009) 1–9. doi:10.1016/j.micromeso.2008.07.002.
- [75] P. Yang, Z. Quan, C. Li, X. Kang, H. Lian, J. Lin, Bioactive, luminescent and mesoporous europium-doped hydroxyapatite as a drug carrier, *Biomaterials*. 29 (2008) 4341–4347. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.07.042.
- [76] W. Li, T. Kuang, X. Jiang, J. Yang, P. Fan, Z. Zhao, Z. Fei, M. Zhong, L. Chang, F. Chen, Photoresponsive polyelectrolyte/mesoporous silica hybrid materials with remote-controllable ionic transportation, *Chem. Eng. J.* 322 (2017) 445–453. doi:10.1016/j.cej.2017.04.048.
- [77] L.B. de O. Freitas, L. de M. Corgosinho, J.A.Q.A. Faria, V.M. dos Santos, J.M. Resende, A.S. Leal, D.A. Gomes, E.M.B. de Sousa, Multifunctional mesoporous silica nanoparticles for cancer-targeted, controlled drug delivery and imaging, *Microporous Mesoporous Mater.* 242 (2017) 271–283. doi:10.1016/j.micromeso.2017.01.036.
- [78] F.A. Sheikh, M.A. Kanjwal, H. Kim, D.R. Pandeya, S.T. Hong, H.Y. Kim, Fabrication of titanium oxide nanofibers containing silver nanoparticles, *J. Ceram. Process. Res.* 11 (2010) 685–691.

- [79] F.A. Sheikh, N.A.M. Barakat, M.A. Kanjwal, R. Nirmala, J.H. Lee, H. Kim, H.Y. Kim, Electrospun titanium dioxide nanofibers containing hydroxyapatite and silver nanoparticles as future implant materials, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 21 (2010) 2551–2559. doi:10.1007/s10856-010-4102-9.
- [80] A.P. Bhatt, M.R. Redinbo, S.J. Bultman, The role of the microbiome in cancer development and therapy, *CA. Cancer J. Clin.* 67 (2017) 326–344. doi:10.3322/caac.21398.
- [81] R.F. Schwabe, C. Jobin, The microbiome and cancer, *Nat. Rev. Cancer.* 13 (2013) 800–812. doi:10.1038/nrc3610.
- [82] K. Boonnanantanasarn, A.L. Gill, Y.S. Yap, V. Jayaprakash, M.A. Sullivan, S.R. Gill, *Enterococcus faecalis* enhances cell proliferation through hydrogen peroxide-mediated epidermal growth factor receptor activation, *Infect. Immun.* 80 (2012) 3545–3558. doi:10.1128/IAI.00479-12.
- [83] J. Chen, J.C. Domingue, C.L. Sears, Microbiota dysbiosis in select human cancers: Evidence of association and causality, *Semin. Immunol.* 32 (2017) 25–34. doi:10.1016/j.smim.2017.08.001.
- [84] M. Panghal, V. Kaushal, J.P. Yadav, In vitro antimicrobial activity of ten medicinal plants against clinical isolates of oral cancer cases, *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 10 (2011) 21. doi:10.1186/1476-0711-10-21.
- [85] E. Lou, R.M. Kellman, R. Hutchison, E.J. Shillitoe, Clinical and pathological features of the murine AT-84 orthotopic model of oral cancer, *Oral Dis.* 9 (2003) 305–312. doi:10.1034/j.1601-0825.2003.00968.x.
- [86] V. Srinivasprasad, J. Dineshshankar, J. Sathiyajeeva, M. Karthikeyan, J. Sunitha, R. Ragunathan, Liaison between micro-organisms and oral cancer, *J. Pharm. Bioallied Sci.* 7 (2015) 354. doi:10.4103/0975-7406.163451.
- [87] P. Gholizadeh, H. Eslami, M. Yousefi, M. Asgharzadeh, M. Aghazadeh, H.S. Kafil, Role of oral microbiome on oral cancers, a review, *Biomed. Pharmacother.* 84 (2016) 552–558. doi:10.1016/j.biopha.2016.09.082.
- [88] L.V. Galvão-Moreira, M.C.F.N. Da Cruz, Oral microbiome, periodontitis and risk of head and neck cancer, *Oral Oncol.* 53 (2016) 17–19. doi:10.1016/j.oraloncology.2015.11.013.