

NANOTECNOLOGIA APLICADA AO MELANOMA: EFEITOS DAS NANOCÁPSULAS DE ÁCIDO TÂNICO NA VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO CELULAR

WILLIAM SANABRIA SIMÕES¹; FRANCIELI DA SILVA DOS SANTOS²; NATHALIA STARK PEDRA³; JULIANI BUCHVEITZ PIRES⁴; ALVARO RENATO GUERRA DIAS⁵; FRANCIELI MORO STEFANELLO⁶

¹ Universidade Federal de Pelotas – williamssimoes@icloud.com

² Universidade Federal de Pelotas – tessmerfran@gmail.com

³ Universidade Federal de Pelotas – nathaliastark@hotmail.com

⁴ Universidade Federal de Pelotas – juliani_97@hotmail.com

⁵ Universidade Federal de Pelotas – alvaro.guerradias@gmail.com

⁶ Universidade Federal de Pelotas – fmstefanello@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O melanoma é uma neoplasia cutânea altamente agressiva, resultante da transformação maligna dos melanócitos, células responsáveis pela síntese de melanina. Embora represente uma pequena fração dos cânceres cutâneos, apresenta elevada letalidade, devido ao seu expressivo potencial metastático e à refratariedade frente a terapias convencionais (PUCKETT *et al.*, 2024). Avanços na compreensão da biologia tumoral possibilitaram a implementação de novas abordagens terapêuticas, incluindo imunoterapias, quimioterápicos citotóxicos e terapias-alvo. No entanto, a ocorrência de efeitos adversos significativos e toxicidades associadas a esses tratamentos ainda limita seu impacto na sobrevida dos pacientes (PALLIYAGE *et al.*, 2021).

Diante desse cenário, a investigação de compostos bioativos naturais, como os polifenóis, tem despertado crescente interesse, devido ao amplo espectro de propriedades farmacológicas (POP & DIACONEASA, 2021). Entre esses compostos, o ácido tânico (AT) tem se destacado por seu potencial terapêutico em diversos modelos experimentais, incluindo aqueles relacionados ao estresse oxidativo, processos inflamatórios e doenças neurodegenerativas (BONA *et al.*, 2020; MEINE *et al.*, 2020; LUDUVICO *et al.*, 2020).

Além disso, os efeitos antitumorais do AT podem ser potencializados por estratégias de nanoencapsulação, que aumentam sua estabilidade, biodisponibilidade e permitem liberação controlada no sítio-alvo (YOUNESS *et al.*, 2021; MUHAMMAD *et al.*, 2022; SIMÕES *et al.*, 2024). Nanocápsulas revestidas com zeína (Z), por exemplo, têm se mostrado uma abordagem promissora para otimizar a entrega de compostos bioativos e reduzir limitações farmacocinéticas (LUDUVICO *et al.*, 2024). Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos das nanocápsulas de AT sobre a proliferação e viabilidade de linhagens de melanoma murino (B16F10) e humano (A375), avaliando seu potencial efeito citotóxico.

2. METODOLOGIA

2.1 Síntese de nanocápsulas

A nanoencapsulação do AT foi realizada mediante a técnica de *electrospraying*, conforme descrito por RADÜNZ *et al.* (2020), empregando Z como matriz polimérica. A solução de revestimento foi formulada com 9% (p/v) de Z em uma solução de etanol/água (70:30, v/v), incorporando 1,5% (p/p) de AT. Nanocápsulas controle foram simultaneamente preparadas sob condições idênticas, utilizando exclusivamente Z como material de matriz, sem inclusão do AT (LUDUVICO *et al.* 2024).

2.2 Cultivo celular

As linhagens de melanoma murino (B16F10) e humano (A375) foram obtidas da American Type Culture Collection e cultivadas em DMEM suplementado com 10% de

soro fetal bovino, seguindo protocolos padronizados de cultura celular. As células foram semeadas a uma densidade de 5×10^3 células/poço e mantidas sob condições controladas (37°C , 5% CO_2), conforme metodologia estabelecida por BONA *et al.* (2020) para ensaios de citotoxicidade. Posteriormente, as culturas foram submetidas à exposição de AT, Z e nanocápsulas de ácido tânico (NAT) nas concentrações de 125, 150 e 175 $\mu\text{g/mL}$ por 72 h, visando comparar o efeito citotóxico relativo desses tratamentos. Células não tratadas foram utilizadas como controle (CT).

2.3 Ensaios de citotoxicidade

A proliferação celular foi avaliada por meio da coloração de proteínas celulares utilizando o reagente sulforodamina B (SRB), conforme descrito por SKEHAN *et al.* (1990). A viabilidade celular foi determinada por meio do ensaio MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenilbrometo de tetrazólio), seguindo o protocolo descrito por MOSMANN (1983).

2.4 Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão da média e submetidos à análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida pelo teste *post hoc* de Tukey usando o software GraphPad Prism 10. Valores estatisticamente significativos foram considerados quando $P < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No ensaio de SRB, a proliferação das células B16F10 foi significativamente reduzida por Z (175 $\mu\text{g/mL}$), AT (150 e 175 $\mu\text{g/mL}$) e por todas as concentrações de NAT, com diminuição máxima de 47,18% em relação ao controle (CT). As concentrações de NAT (150 e 175 $\mu\text{g/mL}$) apresentaram efeito citotóxico superior ao observado nas concentrações mais elevadas de Z (21,71% e 32,05%, respectivamente) e AT (15,49% e 25,83%, respectivamente) (**Figura 1A**). Em células A375, além das mesmas concentrações eficazes, observaram-se reduções adicionais com Z (150 $\mu\text{g/mL}$) e NAT, atingindo diminuição de até 68,29%. A NAT (175 $\mu\text{g/mL}$) mostrou citotoxicidade maior do que as concentrações máximas de Z (22,65%) e AT (49,90%), enquanto NAT (150 $\mu\text{g/mL}$) promoveu redução de 29,49% em comparação ao AT (**Figura 1C**).

Resultados semelhantes foram observados no ensaio de MTT. A viabilidade de B16F10 foi reduzida quando expostas à Z (150 e 175 $\mu\text{g/mL}$), AT (150 e 175 $\mu\text{g/mL}$) e todas as concentrações de NAT, com redução de até 49,01% em relação ao CT. Novamente, NAT (150 e 175 $\mu\text{g/mL}$) apresentou efeito citotóxico superior às maiores concentrações de Z (15,55% e 28,67%, respectivamente) e AT (13,98% e 27,10%, respectivamente) (**Figura 1B**). Em A375, NAT reduziram a viabilidade em até 57,76%, sendo a concentração de 175 $\mu\text{g/mL}$ mais eficaz que Z (27,38%) e AT (30,26%) (**Figura 1D**).

Esses resultados indicam que AT e Z possuem atividade citotóxica em linhagens de melanoma, efeito significativamente potencializado na forma nanoencapsulada, especialmente em A375. Achados prévios corroboram esses resultados, demonstrando que AT exerceu citotoxicidade tanto na forma livre (BONA *et al.*, 2020) quanto nanoencapsulada (SIMÕES *et al.*, 2024) em linhagens tumorais de glioblastoma. Adicionalmente, nanopartículas de AT mostraram efeito seletivo, sem citotoxicidade em astrócitos primários (LUDUVICO *et al.*, 2024). Por sua vez, a Z também tem sido descrita como capaz de exercer efeito citotóxico isoladamente em células tumorais, embora geralmente com menor intensidade que polifenóis ativos, sendo sua principal função como transportadora ou estabilizante em sistemas de nanoencapsulação (KHAYAT *et al.*, 2022).

A atividade citotóxica do AT pode envolver a ativação de vias apoptóticas mitocondriais, com clivagem de PARP e caspase-3 e aumento de proteínas pró-apoptóticas, conforme descrito em carcinoma vesical (LI *et al.*, 2024). O efeito intensificado observado nas NAT pode ser atribuído à nanoestrutura, que facilita internalização e liberação controlada, aumentando a disponibilidade intracelular (KHAYAT *et al.*, 2022). Além disso, a formação de complexos estáveis entre AT e Z, mediada por pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas e ligações eletrostáticas, confere elevada estabilidade física e melhora a biodisponibilidade do polifenol (LUDUVICO *et al.*, 2024), sugerindo um mecanismo plausível para o aumento da eficácia antitumoral.

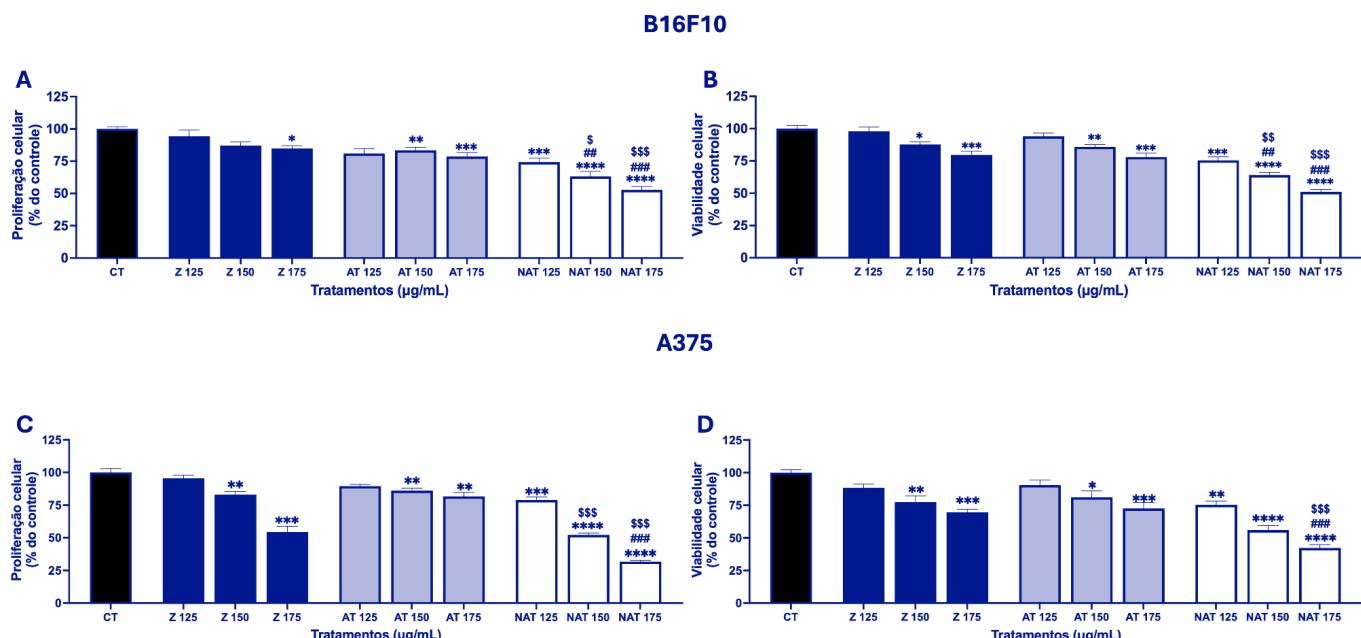


Figura 1. Tratamentos com zeína, ácido tânico isolado e nanocápsulas de ácido tânico após 72 h sobre a proliferação (A e C) e viabilidade celular (B e D) de B16F10 (A e B) e A375 (C e D). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey e expressos como média \pm desvio padrão. (*) $P<0,05$, (**) $P<0,01$, (***) $P<0,001$ e (****) $P<0,0001$ significativamente diferente do grupo controle. (##) $P<0,01$, (###) $P<0,001$ significativamente diferente do grupo zeína. (\$) $P<0,05$, (\$\$) $P<0,01$, (\$\$\$) $P<0,001$ significativamente diferente do grupo ácido tânico isolado. Abreviações: CT: Controle; Z: Zeína; AT: Ácido tânico e NAT: Nanocápsulas de ácido tânico.

4. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que as NAT demonstraram potente efeito citotóxico em linhagens de melanoma B16F10 e A375, possivelmente decorrente do sinergismo entre o AT e a Z na forma nanoencapsulada, uma vez que ambos os compostos isoladamente também apresentaram atividade citotóxica.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BONA, N. *et al.* Tannic acid elicits selective antitumoral activity in vitro and inhibits cancer cell growth in a preclinical model of glioblastoma multiforme. **Metabolic Brain Disease**, v. 35, n. 2, p. 283-293, 2020.

KHAYAT, M. *et al.* Intensification of resveratrol cytotoxicity, pro-apoptosis, oxidant potentials in human colorectal carcinoma HCT-116 cells using zein nanoparticles. **ScientificReports**. v. 12, n. 1, p. 15235, 2022.

LI, C. et al. Tannic Acid Impedes the Proliferation of Bladder Cancer Cells by Elevating Mitochondrial Pathways of Apoptosis. **Cell Biochemistry and Biophysics**, vol. 82,2 n. 1325-1333, 2024.

LUDUVICO, K. et al. Antidepressant Effect and Modulation of the Redox System Mediated by Tannic Acid on Lipopolysaccharide-Induced Depressive and Inflammatory Changes in Mice. **Neurochemical Research**, v. 45, n. 9, p. 2032–2043, 2020.

LUDUVICO, K. et al. Electrospraying and electrospinning of tannic acid-loaded zein: Characterization and antioxidant effects in astrocyte culture exposed to *E. coli* lipopolysaccharide. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 267, n. 131433, 2024.

MEINE, B. et al. Ameliorative effect of tannic acid on hypermethioninemia-induced oxidative and nitrosative damage in rats: Biochemical-based evidence in liver, kidney, brain, and serum. **Amino Acids**, v. 52, n. 11–12, p. 1545–1558, 2020.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MUHAMMAD, P. et al. Carbon dots supported single Fe atom nanozyme for drug-resistant glioblastoma therapy by activating autophagy-lysosome pathway. **Nano Today**, v. 45, n. 101530, 2022.

POP, T. & DIACONEASA, Z. Recent Advances in Phenolic Metabolites and Skin Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22(18), n. 9707, 2021.

PUCKETT, Y. et al. Melanoma Pathology. [Updated 2024 Jul 2]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459367/>.

RADÜNZ, M. Glucosinolates and phenolic compounds rich broccoli extract: Encapsulation by electrospraying and antitumor activity against glial tumor cells. **Colloids and Surf B: Biointerfaces**, v. 192, n. 111020, 2020.

SIMÕES, W. et al. Antitumoral Activity of Electrospray-Nanoencapsulated Tannic Acid on C6 and U87MG Glioblastoma Cell Lines. **BioNanoScience**. v. 14, n. 2886–2898, 2024.

SKEHAN, P. et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, n. 13, p. 1107-1112, 1990.

YOUNESS, R. et al. Recent Advances in Tannic Acid (Gallotannin) Anticancer Activities and Drug Delivery Systems for Efficacy Improvement. A Comprehensive Review. **Molecules**, v. 26, n. 5, p. 1486, 2021.