

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL *IN VITRO* E ANTIMETASTÁTICA *IN VIVO* DO TETRADECIL GALATO¹

Débora Regina de Carvalho²
Claudriana Locatelli³

RESUMO: O câncer de pele é a forma mais comum de câncer e atualmente é considerado o câncer de mais fácil prevenção. No entanto, sua ocorrência é alarmante. O melanoma apresenta alta capacidade metastática atingindo principalmente o sistema nervoso central e pulmão. O tratamento do melanoma é difícil, pois este apresenta grande resistência aos quimioterápicos disponíveis atualmente. O ácido gálico e seus derivados são ácidos fenólicos de ocorrência natural que apresentam uma grande variedade de ações biológicas. Estudos epidemiológicos indicam que compostos fenólicos encontrados na dieta reduzem muito os riscos a patologias como a aterosclerose, doenças neurodegenerativas, câncer entre outras. Estudos mostram que alguns derivados sintéticos do ácido gálico apresentam atividade antitumoral, promovem a morte por apoptose e inibem a proliferação celular em linhagens de células de tumor linfocítico. Alterações químicas na molécula de ácido gálico podem modificar suas propriedades farmacodinâmicas, alterando a solubilidade e o coeficiente de partição (Log P) e consequentemente suas propriedades biológicas. Portanto, este estudo teve como objetivo avaliar a atividade antitumoral e antimetastática do tetradecilgalato *in vitro* e *in vivo*. O tetradecilgalato é um derivado sintético do ácido gálico, o qual apresenta uma alta lipossolubilidade. Para realização do mesmo estudo *in vitro* foi utilizada uma linhagem de melanoma murino B16F10 com alto potencial metastático. Para o estudo *in vivo* foram utilizados camundongos fêmeas Swiss. Os resultados encontrados mostraram que o tetradecilgalato foi capaz de induzir a morte das células de melanoma B16F10, além de inibir a metástase *in vitro*. Observou-se também que este composto apresenta importante atividade antimetastática *in vivo* além de aumentar a sobrevivência dos animais em torno de 54%. Portanto, pode-se dizer que este derivado sintético do ácido gálico pode ser uma importante estratégia terapêutica para o tratamento do melanoma metastático.

Palavras chaves: melanoma, tetradecilgalato, metástase.

ABSTRACT: The skin cancer is the most common form of cancer and is now considered the easiest of cancer prevention. However, their occurrence is alarming. The metastatic melanoma has a high capacity reaching primarily the central nervous system and lung. The treatment of melanoma is difficult because it has great resistance to currently available chemotherapeutics. The gallic acid and its derivatives are naturally occurring phenolic acids with a variety of biological actions. Epidemiological studies indicate that phenolic compounds found in diet greatly reduce the risks to diseases such as atherosclerosis, neurodegenerative diseases, cancer and others. Studies show that some synthetic derivatives of gallic acid have antitumor activity, promote the death by apoptosis and inhibit cell proliferation in tumor cell lines of lymphocytic. Chemical changes in the molecule of gallic acid can modify its pharmacodynamic properties, changing the solubility and partition coefficient (log P) and consequently their biological properties. Therefore, this study aimed to evaluate the antitumor activity and antimetastática of tetradecilgalato *in vitro* and *in vivo*. The tetradecilgalato is a synthetic derivative of gallic acid, which presents a high liposolubility. To achieve the same *in vitro* study we used a strain of melanoma murine B16F10 with high metastatic potential. To study the *in vivo* female

Swiss mice were used. The results showed that the tetradecilgalato was able to induce cell death of B16F10 melanoma, and inhibit metastasis *in vitro*. It was also observed that this compound shows significant activity *in vivo* antimetastática besides increasing the survival of animals around 54%. So we can say that this synthetic derivative of gallic acid may be an important therapeutic strategy for the treatment of metastatic melanoma.

Key words: melanoma, tetradecilgalato, gallic acid, metastasis.

INTRODUÇÃO

O melanoma é uma neoplasia maligna caracterizada pela alta capacidade de infiltração no sistema nervoso central, corresponde ao terceiro tumor metastático mais comum, depois dos cânceres de pulmão e mama (HAWKINS, *et al.*, 1981; ALMEIDA, *e. al.*, 2001). Este pode surgir a partir da pele normal ou de uma lesão pigmentada. A manifestação da doença na pele normal se dá a partir do aparecimento de uma pinta escura de bordas irregulares acompanhada de coceira e descamação.

Sua incidência vem apresentando taxas de crescimento alarmantes, aumentado cerca de 6% ao ano em todo mundo e no Brasil estimou-se mais de estimou-se mais de 5.920 novos casos de melanoma para o ano de 2008 (INCA, 2008). Apesar da baixa incidência se comparado aos outros cânceres este é responsável por aproximadamente 65% das causas de morte por câncer de pele, associado a prognóstico desfavorável com sobrevida média de 8 a 9 meses (INCA, 2008).

Apesar dos avanços na compreensão da biologia e da história natural do melanoma, seu tratamento ainda permanece desapontador, pois apresenta mecanismos de resistência ao tratamento farmacológico, produzindo metástase e atingindo órgãos como pulmão e cérebro. A doença é altamente invasiva e não responde satisfatoriamente ao tratamento quimioterápico, pois na grande maioria dos casos ocorre desenvolvimento de resistência ao tratamento além da morbidade associada aos quimioterápicos utilizados nos protocolos de tratamento.

As opções terapêuticas atuais incluem a quimioterapia, imunoterapia e a associação das duas (bioquimioterapia), sem apresentar grande impacto na sobrevida global, além disso, a cirurgia raramente tem potencial curativo e a radioterapia é apenas paliativa. Apenas 10% a 20% dos pacientes em tratamento com quimioterapia têm resposta satisfatória em geral de curta duração (EWEND, CAREY, BREM, 1996).

Considera-se que o insucesso da quimioterapia, na cura de várias formas de câncer metastático, deve-se à perda da eficácia dos fármacos ao longo do tratamento. A maior causa de falhas destes tratamentos pode surgir por exposições a concentrações inadequadas do fármaco, resultando na resistência clínica. Aproximadamente 90% de todos os óbitos estão relacionados à resistência das células tumorais aos fármacos antineoplásicos.

Vários trabalhos mostram que os níveis intracelulares de glutathione (GSH), um potente antioxidante endógeno, parece estar relacionado com a alta capacidade de metástase em células de melanoma, e que os níveis de GSH estão associados à resistência ao estresse oxidativo ou nitrosativo, gerado durante o processo de síntese de melanina (FRANK *et al.*, 2001; BENLLOCH *et al.*, 2005). A síntese de melanina ocorre após sucessivas reações oxidativas do aminoácido tirosina, o que resulta na formação de dois pigmentos, as eumelaninas de coloração preta formada pela polimerização de precursores indólicos, e as feomelaninas de coloração vermelha ou marrom, formadas pela incorporação de cisteína durante a oxidação da tirosina. Durante estes processos há uma grande geração de peróxido de hidrogênio e dopaquinona (DQ), estas substâncias são altamente reativas e

podem levar a peroxidação lipídica e a alteração em aductos de DNA o que desencadeia o processo de carcinogênese (FRANK *et al.*, 2001). Portanto, a GSH está envolvida na síntese de melanina, pois conjuga-se com DQ através da ação da enzima glutationa – S – transferase (GST) e reduz o peróxido de hidrogênio por intermédio da ação da glutationa peroxidase, dessa forma, a GSH protege o melanócito do efeito tóxico do peróxido de hidrogênio durante a síntese de melanina (PROTA, 1992). Níveis altos de GSH são importantes na manutenção da viabilidade dos melanócitos e das células de melanoma (FRANK *et al.*, 2001).

A depleção de GSH e a inibição da γ -glutamyl-cisteina sintase aumentam o efeito citotóxico de agentes quimioterápicos como a 1,3 bis (2-cloroetil)-1-nitrosourea, cisplatina e mefalan, o que inibe a síntese de DNA ou o crescimento das linhagens de células de melanoma *in vitro*, bem como prolonga a sobrevivência de camundongos infectados com melanoma (CEN, *et al.*, 2002).

O conteúdo intracelular de GSH é um parâmetro importante para a progressão da metástase, que contribui muito para sobrevivência das células com alto poder metastático (ORTEGA, *et al.*, 2003), além de que, está diretamente associada com a capacidade dos tumores malignos em desenvolver o mecanismo de resistência a múltiplos fármacos (BENLLOCH, *et al.*, 2005).

A conjugação de moléculas eletrofílicas, incluindo agentes antitumorais, com a GSH é catalizada pela GST, este mecanismo está envolvido na proteção das células tumorais contra os agentes antineoplásicos. Ortega e colaboradores (2003) relataram que é necessário uma co-expressão de GST, GSH e MRP para a proteção das células contra os agentes antitumorais e o desenvolvimento de resistência.

Com o propósito de alcançar resultados mais eficazes, o meio científico tem intensificado os estudos farmacológicos com compostos extraídos de plantas medicinais, bem como derivados sintéticos destes compostos naturais. Dentre estes, destacam-se os flavonóides. Estes compostos estão comumente presentes em várias plantas e são conhecidos por ter efeitos benéficos, por seu amplo efeito antioxidante, inibitório da atividade de crescimento do tumor e indutor da apoptose, em várias linhagens de células tumorais. Iwashita e colaboradores (2000) demonstraram que os flavonóides isoliquiritigenina e buteina inibiram a proliferação celular e induziram a apoptose em linhagens celulares de melanoma B16F10. Nas células tratadas com estes compostos ocorreu a condensação do núcleo e a fragmentação do DNA nuclear (IWASHITA *et al.*, 2000).

Um derivado fenólico de plantas com importante ação antitumoral entre outras, é o ácido gálico. O qual é um fenol de ocorrência natural nas plantas, obtido através da hidrólise dos taninos, e, possui várias atividades farmacológicas (INOUE *et al.*, 1995). Os derivados do ácido gálico são amplamente utilizados na indústria, como antioxidantes alimentares e na indústria de cosméticos e farmacêutica, alguns estudos demonstram que estes compostos apresentam potentes atividades terapêuticas incluindo propriedades anticarcinogênica, antimicrobiana, anti-herpética além de uma potente atividade antioxidante, atuando como scavenger de espécies reativas de oxigênio (EROs) (OW & STUPANS, 2003; SAVI *et al.*, 2005). Estudos realizados por Kawada e colaboradores (2001), mostraram que o ácido gálico é capaz de induzir apoptose em linhagens de células de câncer de pulmão humano. A associação de ácido gálico com cisplatina apresentou um aumento na apoptose das células tumorais quando comparado com o tratamento de cisplatina sozinha, estes dados sugerem que a combinação do ácido gálico com outros fármacos antitumorais poderia ser efetiva em protocolos de tratamento do câncer de pulmão (KAWADA *et al.*, 2001). Sakaguchi e colaboradores (1999) demonstraram que derivados do ácido gálico apresentaram maior citotoxicidade do que o ácido gálico em algumas linhagens de células tumorais, com uma IC₅₀ que variou entre 2,9 a 114,4 μ M, estas concentrações foram muito menores que a IC₅₀ do ácido gálico. Entretanto, quando células normais foram submetidas a diferentes concentrações de ácido gálico este não apresentou citotoxicidade, enquanto que seus derivados apresentaram alta citotoxicidade. O ácido gálico parece inibir a proliferação celular em cultura de células de tumor metastático como a P815 (mastócito murino), B16

(melanoma murino) e L5178 (linfoma murino), com $I_{cs_{50}}$ de 6,5; 8,0 e 3,6 μ M respectivamente (OHNO, INOUE, OGIHARA, 2001). Estes estudos demonstram uma possível aplicação do ácido gálico e ou de seus derivados no tratamento do câncer, especialmente no tratamento dos cânceres resistentes a fármacos antitumorais que vêm sendo utilizados na clínica (OHNO *et al.*, 1999).

Kawada e col. (2001), mostraram que o ácido gálico é capaz de induzir apoptose em linhagens de células de câncer de pulmão humano, enquanto outros estudos mostraram que derivados do ácido gálico também apresenta ação inibitória da P-gp (KITAGAWA, *et al.*, 2005). Neste estudo Kitagawa e col. (2005) mostrou que um derivado do ácido gálico o dodecil galato é capaz de inibir a função da P-gp em linhagem de células resistentes que expressam esta proteína, e que a inibição da enzima pelo galato está diretamente relacionada com sua estrutura. Os autores sugeriram que a mobilidade hidrofóbica deste composto pode ser importante para a interação com o sítio ativo da P-gp enquanto, os grupos hidroxil ligados ao anel benzênico são importantes para a ligação dos compostos com o sítio de ligação do ATP, inibindo assim a atividade da P-gp.

Com base nestes achados, e no fato de que existem diversas classes de compostos produzidos pelos vegetais, como flavonóides, alcalóides ou terpenóides, estes se tornam uma fonte inesgotável de novas substâncias com efeitos sobre sistemas biológicos ainda a serem descobertos. Este estudo veio com o intuito de avaliar o efeito antitumoral em linhagem celular de melanoma e o potencial antimetastático do tetradecil galato em camundongos após a administração de linhagem de célula de melanoma B16F10. A sensibilidade da linhagem celular de melanoma ao derivado do ácido gálico tetradecil galato foi avaliada através da viabilidade celular. O potencial antimetastático foi verificado através da indução de metástase tumoral em camundongos pela administração da linhagem de melanoma B16F10, para tanto se verificou o número de nódulos pulmonares após administração das células em camundongos; bem como, verificou-se a incidência de morte nos camundongos com metástase pulmonar tratado e não tratados com tetradecil galato.

MATERIAIS E MÉTODOS

Cultura de Células

As células foram mantidas em garrafas plásticas apropriadas suplementado com soro fetal bovino, penicilina, estreptomicina, HEPES, em pH 7,4 em estufa a 37°C em 5% de CO₂. Sendo aplicadas a cada 3-4 dias e avaliada o número de células viáveis pelo método Azul de Trypan.

Tratamento

O derivado sintético do ácido gálico, tetradecil galato foi adicionado em concentrações crescentes às células.

Ensaio de Viabilidade Celular (Testes do MTT) – atividade antitumoral *in vitro*

O MTT é um sal de tetrazólio que é reduzido a um derivado formazan de cor azulada pela atividade oxidativa de células, funcionando, portanto, como um indicador da função mitocondrial e, por conseguinte, da viabilidade celular. Após 24h de incubação com o derivado do ácido gálico as placas foram centrifugadas, o sobrenadante foi removido e o meio de cultura fresco com solução de

MTT foi adicionado. Passado o período de incubação de 3 h a 37°C, as placas foram centrifugadas novamente, e o sobrenadante, removido. Finalmente, ao decantado celular será adicionado álcool isopropílico/HCl 0,04 N. Após 10 minutos, os restos celulares serão removidos por centrifugação, e o sobrenadante límpido será transferido para outra placa, onde será lido em leitor de placas a 540 nm. A densidade óptica obtida do grupo controle, ou seja, das células sem tratamento, será considerada como equivalente a 100% de células viáveis. Portanto, quanto maior a densidade óptica obtida no ensaio, maior será o número de células viáveis.

Efeito do tetradecil galato na inibição da formação de nódulos pulmonares – atividade antimetastática *in vivo*

O efeito do tetradecil galato na invasão pulmonar das células tumorais foi avaliado em camundongos. A linhagem celular de melanoma apresenta uma alta capacidade de metástase, a qual é capaz de formar metástase após a inoculação em animais principalmente no pulmão.

Para avaliar o efeito antimetastático do tetradecil galato foram utilizados três grupos com 8 camundongos fêmeas. As células B16F10 em um número de 1×10^6 células/0,1 mL de salina serão injetadas na veia lateral da calda dos três grupos de animais, com o objetivo de induzir metástase.

O grupo 1 foi o grupo controle que recebeu somente solução salina por via intraperitoneal.

O grupo 2 foi o grupo tratado com tetradecil galato por via intraperitoneal na dose de 20 μ M/Kg de peso e o grupo 3 recebeu tetradecil galato por via intraperitoneal na dose de 100 μ M/Kg de peso. A administração do tetradecil galato foi realizada a cada 7 dias e no final dos 21 dias os animais foram sacrificados por deslocamento cervical após anestesia com éter etílico e o pulmão foi retirado para verificar a possível inibição da metástase pulmonar, através da contagem do número de nódulos presentes no pulmão (MENON, KUTTAN, KUTTAN, 1995).

Efeito do tetradecil galato sobre a sobrevida dos animais com tumor metastático

Para avaliar o aumento da sobrevida dos animais após o término do tratamento utilizou-se a fórmula: % de aumento da sobrevida = $[(T - C)/C] \times 100$, onde T é foi igual ao número de dias de sobrevivência dos animais tratados e C o número de dias de sobrevivência dos animais controle (MENON, KUTTAN, KUTTAN, 1995).

Análise Estatística

Os resultados são expressos como a média \pm erro-padrão da média (EPM). A análise dos resultados foi feita pelo teste *t* de Student. Um valor de $p < 0,05$ e foi considerado estatisticamente significativo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Muitas substâncias naturais vêm demonstrando um importante potencial terapêutico em uma grande variedade de ensaios animais (HSU, et al., 2007), entre estes compostos podemos citar os derivados fenólicos que reportam atividade antimutagênica, anticarcinogênica e reduzem o risco de desenvolvimento de doenças (GALATI & O'BRIEN, 2004). Os derivados do ácido gálico mostram uma importante atividade citotóxica contra uma grande variedade de linhagens tumorais, além de significativa atividade antioxidante e anti-herpética (SAVI, et al., 2005).

No presente estudo observamos que o derivado sintético do ácido gálico, tetradecil galato, induziu uma considerável morte celular na linhagem de melanoma B16F10 quando incubado em concentrações que variaram de 0 a 150 μM durante 24, 48 e 72 h. Este galato apresentou valores de IC_{50} de 60, 9,62 e 4,67 μM respectivamente após 24, 48 e 72 h de incubação. A figura 1 mostra que as IC_{50} deste composto são relativamente pequenas. Este resultado é importante, uma vez que a linhagem de células de melanoma é resistente a morte celular. A resistência desta linhagem está diretamente relacionada com seu alto conteúdo de glutathiona o que lhe confere grande poder metastático (BENLLOCH, et al., 2005). O efeito citotóxico do tetradecil galato observado na figura 1 mostra que o mesmo pode apresentar potencial antimetastático, o qual foi comprovado pelo estudo realizado *in vivo*.

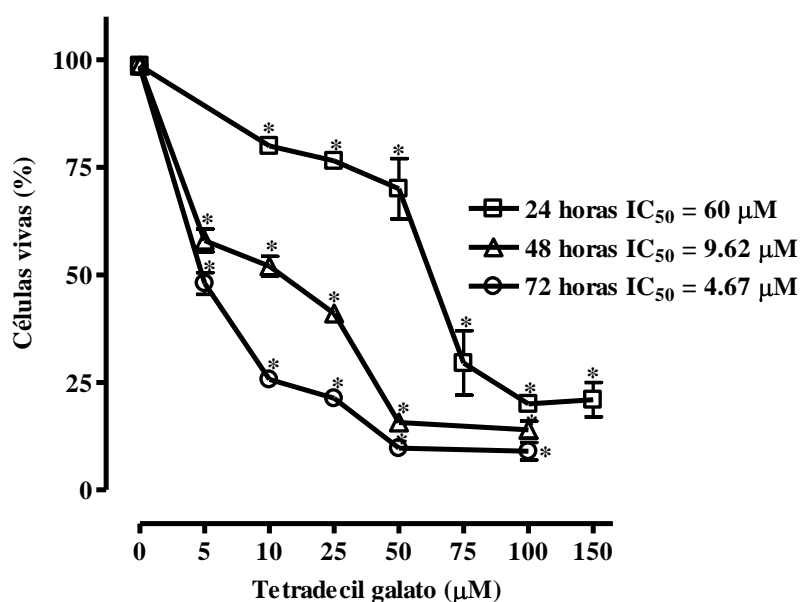


Figura 1. Efeito citotóxico do tetradecil galato sobre linhagem de células de melanoma B16F10. As células foram incubadas com o tetradecil galato, pó 24, 48 e 72 horas. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. A densidade óptica do grupo controle (0, células sem tratamento) foi considerada como 100% de viabilidade celular. Cada ponto representa a média \pm E.P.M. Um valor de * $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo quando comparado com o controle, usando ANOVA seguido de teste *t* de Bonferroni.

A habilidade das neoplasias malignas de produzirem metástase em órgãos distantes ao do tumor primário (origem) é um evento clínico de ocorrência letal em muitas doenças neoplásicas (DORA, et al., 2006). Os principais sítios de invasão dos tumores metastáticos são o pulmão e o fígado. Um importante modelo experimental para avaliar o potencial antimetastático de novos compostos é a administração direta em camundongos de células tumorais na circulação.

As células de melanoma B16F10 apresentam um grande potencial metastático. Quando administradas por via parenteral através da veia da calda de camundongos demonstram efetiva metástase pulmonar (POSTE, et al., 1980). Neste estudo o efeito do tetradecil galato sobre a metástase pulmonar espontânea foi verificada em camundongos fêmeas após a administração pela veia lateral da calda da linhagem B16F10. Neste caso a eficácia terapêutica do tetradecil galato foi verificada pela sua capacidade de inibir a metástase pulmonar nestes animais, conforme podemos verificar nas figuras 2 e 3.

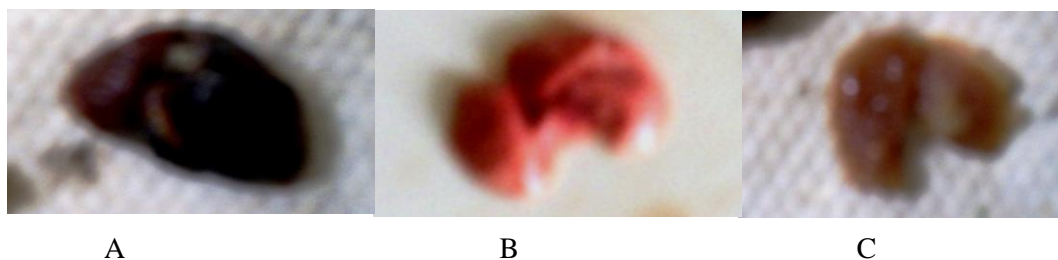


Figura 2. Efeito do tetradecil galato na inibição da metástase pulmonar em camundongos fêmeas. As fotos acima mostram a aparência do pulmão de camundongos injetados intravenosamente com a linhagem de melanoma altamente metastático B16F10 (5×10^4 células) após o tratamento com (A) controle positivo; (B) controle negativo; (C) tratados com tetradecil galato 122 mg/Kg de peso corporal por via intraperitoneal a cada 3 dias durante 28 dias.

A figura 2 A mostra o pulmão dos camundongos controle positivo que receberam além das células tumorais somente o veículo DMSO 2%, enquanto a figura 2 C mostra o pulmão dos animais que receberam o tratamento com tetradecil galato 122 mg/Kg de peso corporal. Nestas imagens pode-se verificar que o controle positivo apresentou nódulos tumorais pulmonares em grandes quantidades, enquanto os animais que receberam o tratamento apresentaram menor número de nódulos pulmonares. Analisando as figuras 2 e 3 podemos inferir que o tetradecil galato apresenta uma importante atividade antimetastática. Estes resultados são importantes uma vez que a principal causa de morte por melanoma é sua capacidade metastática o que dificulta o tratamento quimioterápico (STANFORD, et al., 2008). O bloqueio da metástase nos tumores ajuda os pacientes com câncer a prolongar a vida, portanto, o estudo de novas substâncias com potencial antimetastático é extremamente importante como uma nova estratégia terapêutica.

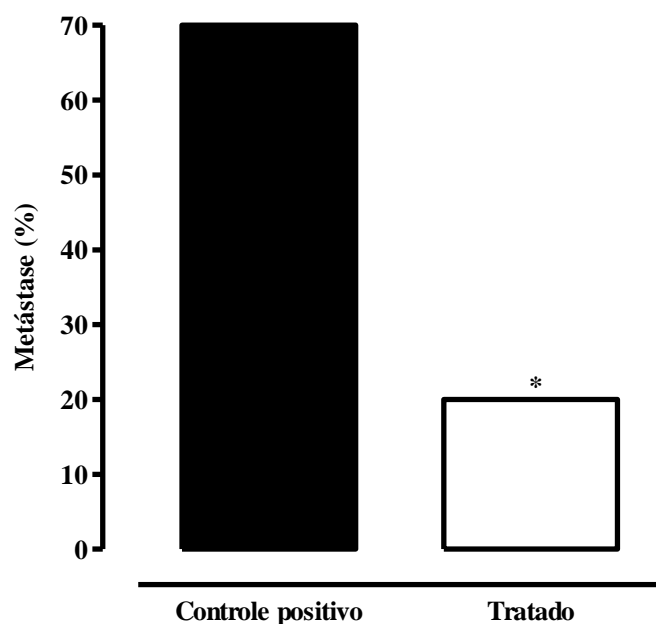


Figura 3. Porcentagem de inibição da metástase pulmonar em camundongos fêmeas tratadas com tetradecil galato. 10 camundongos por grupo receberam 1×10^6 células/0,1 mL de B16F10 injetadas na veia lateral da calda. O grupo controle recebeu somente o veículo a cada 3 dias durante 28 dias, enquanto o grupo tratado recebeu tetradecil galato 122 mg/Kg de peso corporal por via intraperitoneal. Após o término do tratamento os animais foram sacrificados e o número de metástase pulmonar determinadas.

O tratamento do melanoma metastático, ainda permanece desapontador. As opções terapêuticas atuais incluem a quimioterapia, imunoterapia e a associação das duas (bioquimioterapia), sem apresentar grande impacto na sobrevida global, além disso, a cirurgia raramente tem potencial curativo e a radioterapia é apenas paliativa. Apenas 10% a 20% dos pacientes em tratamento com quimioterapia têm resposta satisfatória em geral de curta duração (EWEND, CAREY, BREM, 1996). Os tratamentos quimioterápicos disponíveis para o melanoma não apresentam aumento na expectativa de vida do paciente que em geral não passa dos 8 meses. Os resultados obtidos com a sobrevida dos animais tratados com tetradecil galato (Figura 4), mostram que este composto apresenta significativo aumento na sobrevida dos animais, uma vez que os animais controle apresentaram um tempo médio de vida de 85 dias e os tratados de 110 dias. Portanto, pode-se dizer que o tratamento com tetradecil galato aumento aproximadamente 54% a sobrevida dos animais.

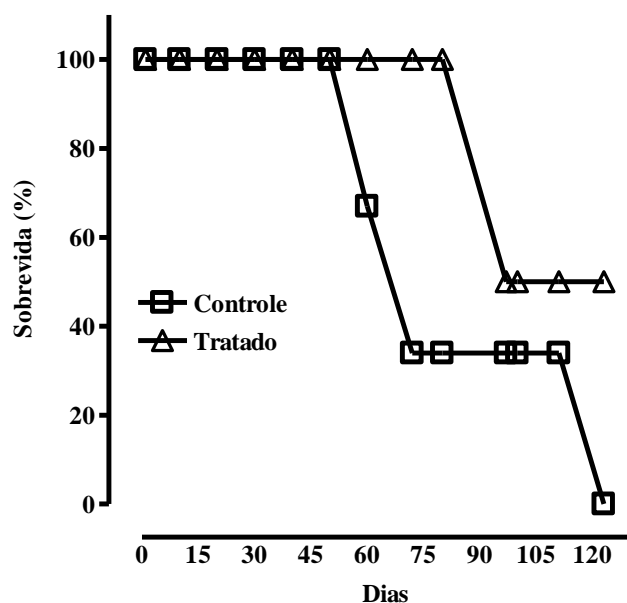


Figura 4. Análise da sobrevida. Avaliou-se a quantidade de tempo que os animais tratados sobreviveram em relação ao grupo controle, conforme materiais e métodos.

Os resultados mostrados neste estudo indicam que o tetradecil galato pode ser uma importante estratégia terapêutica para o tratamento do melanoma metastático.

CONCLUSÃO

Neste estudo pode-se concluir que o tratamento do melanoma metastático com o derivado tetradecil galato teve resultados positivos expressando sua eficácia na atividade antitumoral e antimetastática *in vitro* e *in vivo* com significativa sobrevida dos camundongos após serem tratados com o derivado do ácido gálico, tornando o tetradecil galato uma fonte de estudos para uma possível alternativa no tratamento do câncer. Os resultados mostrados neste relatório são importantes, uma vez que o melanoma é um câncer de difícil tratamento e altamente resistente ao tratamento quimioterápico disponível, portanto o tetradecil galato pode ser uma alternativa para o tratamento do câncer metastático.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, F.A.; ALMEIDA, G. O. O; MICHALANY, N. Melanoma cutâneo, aspectos clínicos. In: Neeves, E. G. **Câncer de pele**. Rio de Janeiro: Medsi, 225-239, 2001.

BENLLOCH, M.; ORTEGA, A.; FERRER, P.; SEGARRA, R.; OBRADOR, E.; ASENSI, M.; CARRETERO, J.; ESTRELA, J. M. Acceleration of glutathione efflux and inhibition of γ -

glutamyltranspeptidase sensitize metastatic B16 melanoma cells to endothelium-induced cytotoxicity. **The Journal of Biological Chemistry**. Vol. 25, 280(8), p. 6950-6959, 2005.

CEN, D.; GONZALEZ, R.I.; BUCKMEIER, J.A.; KAHLON, R.S.; TOHIDIAN, N. B.; MEYSKENS, F.L. Disulfiram induces apoptosis in human melanoma cells: a redox-related process. **Molecular Cancer Therapeutics**. Vol. 1, p. 197-204, 2002.

DORA C. L., ALVAREZ-SILVA M., TRENTIN A. G., FARIA T. J., FERNANDES D., COSTA R., STIMAMIGLIO M., LEMOS-SENNA E. Evaluation of antimetastatic activity and systemic toxicity of camptothecin-loaded microspheres in mice injected with B16F10 melanoma cells. **J. Pharm Pharmaceut Sci**. vol. 9(1), p. 22-31, 2006.

EWEND, M. G.; CAREY, L.A.; BREM, H. Treatment of melanoma metastases in the brain. **International Seminars in Surgical Oncology**, v. 12(6) p. 429-435, nov., 1996

FRANK, L.; MEYSKENS, J.R.; PATRICK FARMER, JOHN P. FRUEHAUF. Redox Regulation in Human Melanocytes and Melanoma. **Pigment Cell Res**. Vol. 14, p. 148-154, 2001.

HAWKINS, B.R.; DAWKINS, R.L.; HOCKEY, A.; HOULISTON, J.B. Evidence for linkage between HLA and malignant melanoma. **Tissue Antigens**, 17, 540-541, 1981.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Disponível em: <www.inca.gov>. Acesso em: 22 jun. 2007.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Disponível em: <www.inca.gov>. Acesso em: 06 mar. 2008.

INOUE, M.; SUZUKI, R.; SAKAGUCHI, N.; LI, Z.; OGIHARA, Y.; JIANG, B. Y.; CHEN, Y. Selective induction of cell death in cancer by gallic acid. **Biol Pharm Bull**. Vol. 18(11), p. 526-530, 1995.

IWASHITA, K.; KOBORI, M.; YAMAKI, K.; TSUSHIDA, T. Flavonoids inhibit cell growth and induce apoptosis in B16 melanoma 4A5 cells. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 64, p. 1813-1820, 2000.

KAWADA, M.; OHNO, Y.; RI, Y.; IKOMA, T.; YUUGETU, H.; ASAI, T.; WAATANABE, M.; YASUDA, N.; AKAO, S.; TAKEMURA, G.; MINATOGUCHI, S.; GOTOH, K.; FUJIWARA, H.; FUKUDA, K. Anti-tumor effect of gallic acid on LL-2 lung cancer cells transplanted in mice. **Anticancer Drugs**. Vol. 12(10), p. 847-852, 2001.

OHNO, T.; INOUE, M.; OGIHARA, Y. Cytotoxic activity of gallic acid against liver metastasis of mastocytoma cells P-815. **Anticancer Res**. Vol. 21(6A), p. 3875-3880, 2001.

OHNO, Y.; FUKUDA, K.; TAKEMURA, G.; TOYOTA, M.; WATANABE, M.; YASUDA, N.; XINBIN, Q.; MARUYAMA, R.; AKAO, S.; GOTOU, K.; FUJIWARA, T.; FUJIWARA, H. Induction of apoptosis by gallic acid in lung cancer cells. **Anticancer Drugs**. Vol. 10(9), p. 845-851, 1999.

OW, Y. Y.; STUPANS, I. Gallic acid and gallic derivatives: effects on drug metabolizing enzymes. **Curr Drug Metab**. Vol. 4(3), p. 241-248, 2003.

POSTE G., DOLL J., HART I. R., FIDLER I. J. In vitro selection of murine B16 melanoma variants with enhanced tissue-invasive properties. **Cancer Res**. vol. 40, pag. 1636-1644, 1980.

PROTA, G. **Melanins and melanogenesis**. San Diego: Academic Press Inc; p.55, 1992.

SAVI, L.A.; LEAL, P.C.; VIEIRA, T.O.; ROSSO, R.; NUNES, R.J.; YUNES, R.A.; CRECZYNSKI-PASA, T.B.; BARARDI, C.R.; SIMOES, C.M. Evaluation of anti-herpetic and antioxidant activities, and cytotoxic and genotoxic effects of synthetics alkyl-esters of gallic acid. **Arzneimittelforschung**. vol. 55(1), p. 66-75, 2005.

STANFORD M. M., SHABAN M., BARRETT J. W., WERDEN . J., GILBERT P. A., BONDY-DENOMY J., MACKENZIE L., GRAHAM K. C., CHAMBERS A. F., McFADDEN G. Myxoma virus oncolysis of primary and metastatic B16F10 mouse tumors in vivo. **The American Society of Gene Therapy**. Vol. 16(1), pag. 52-59, 2008.

¹ Artigo de conclusão de projeto de pesquisa financiado pelo fundo de apoio à pesquisa (FAP) na forma de bolsa de pesquisa.

² Deborah Regina de Carvalho: acadêmica da 7ª fase do curso de Farmácia UnC/Çaçador. E-mail: dehrc1@hotmail.com UnC – Universidade do Contestado – Campus Caçador.

³ Claudriana Locatelli: professora orientadora MSc – UnC/ Caçador; Farmacêutica Bioquímica, professora de bioquímica e toxicologia na UnC – campus Caçador, Mestre em Farmácia FÁrmaco Medicamentos. e-mail: claudrilocatelli@gmail.com