

Modulação da atividade antibacteriana do tecido adiposo da *Gallus gallus domesticus* (Linnaeus, 1758)

Henrique Coutinho^{1*}, Pedro Aquino², Jéssica Leite², Livia Leandro²,
Fernando Figueredo¹, Edinaldo Matias², Tássia Guedes².

¹Universidade Regional do Cariri, Crato, CE, Brasil

²Faculdade Leão Sampaio, Juazeiro do Norte, CE, Brasil

*Autor correspondente, e-mail: hdmcoutinho@gmail.com

Resumo

Baseado na crença popular, em que se utiliza a gordura de *G. g. domesticus* (galinha doméstica), para combater processos infecciosos e inflamatórios, este trabalho possui como objetivo avaliar a ação antibacteriana dos lipídeos no tecido adiposo desses animais além verificar associação com antibióticos observando o efeito modulador dos produtos naturais, frente a linhagens padrões de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e multiresistentes de *Staphylococcus aureus* provenientes de isolados clínicos. Foi avaliada a atividade antibacteriana das amostras, determinando a Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo método da microdiluição. E logo após realizou-se ensaios para verificar a possível ação sinérgica entre as amostras e os antimicrobianos, utilizando os tecidos adiposos em uma concentração subinibitória. As interações dos aminoglicosídeos com as amostras em concentrações de 128 µg/mL (CIM 1/8) foram eficazes frente a *S. aureus* 358, tendo a atividade da amicacina associada ao TAGc com a mais representativa redução da CIM de 64 para 8 µg/mL. Os resultados obtidos neste trabalho indicam que o TAGc e o TAGi são uma fonte alternativa de produtos naturais com ação antibacteriana, já que possibilitam à potencialização da atividade dos aminoglicosídeos frente às linhagens de *S. aureus* 358. Ambos merecendo continuidade para elucidação da ação antimicrobiana e toxicológica.

Palavras-chaves: aminoglicosídeos, *Gallus gallus domesticus*, *Staphylococcus aureus*, tecido adiposo

Modulatory antibacterial activity of body fat from *Gallus gallus domesticus* (Linnaeus 1758)

Abstract

Based on the popular belief, which uses fat from *G. g. domesticus* (domestic chicken), to combat infectious and inflammatory processes, this work aims to evaluate the antibacterial action of lipids in adipose tissue of these animals besides verifying association with antibiotics observing the modulating effect of natural products against standard strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* and multiresistant of *Staphylococcus aureus* from clinical isolates. We evaluated the antibacterial activity of the samples, determining the minimum inhibitory concentration (MIC) by microdilution method. And after testing was conducted to verify the possible synergistic action between the samples and the antimicrobials using fat tissues in a sub inhibitory concentration. The interactions of aminoglycosides with the samples at concentrations of 128g/ml (MIC 1/8) were effective against *S. aureus* 358, and amikacin activity associated with the TAGCc with most representative reduction from 64 to 8 µg/mL. The results of this study indicate that the TAGc and TAGi are an alternative source of natural products with antibacterial action, as possible to potentiate the activity of aminoglycosides against the strains of *S. aureus* 358. Both deserving continuing to elucidate the antimicrobial and toxicological action.

Keywords: aminoglycosides, fat tissue, *Gallus gallus domesticus*, *Staphylococcus aureus*

Recebido: 21 Fevereiro 2013
Aceito: 05 Março 2014

Introdução

Durante séculos o homem tem procurado alternativas para eliminar seus males físicos, de forma empírica ou intuitiva. Assim sendo, a medicina baseada no saber popular mantém-se viva no cotidiano da população (SIQUEIRA et al., 2006).

Usados desde os tempos pré-históricos, os animais e os produtos derivados a partir deles são importantes ingredientes na preparação de vários medicamentos tradicionais. Nesse contexto, uma das formas alternativas bastante utilizadas, é o tecido adiposo da galinha doméstica (*Gallus gallus domesticus*) principalmente para combate das afecções do aparelho respiratório. Isto porque, a medicina positiva dos indígenas quanto à zooterapia, resumia-se à aplicação de banhas de galinha e de outros animais com outras finalidades de diversas curas (FERREIRA et al., 2010)..

Na composição química do tecido gorduroso do *G. g. domesticus* encontram-se alguns tipos de ácidos graxos que compõem a família dos ômega-6, que ajudam no desenvolvimento humano, e por isso é importante o seu consumo. Segundo Lee e Foglia (2000), os ácidos graxos insaturados compõem cerca de 60% da gordura do frango. Dentre eles está o ácido oléico, um ácido graxo monoinsaturado que possui um papel importante na redução do risco de doença arterial coronariana. Além do ácido oléico, há outro ácido que se destaca na composição, o ácido graxo linoléico, derivado do ácido oléico, com 18 carbonos e duas insaturações, de fórmula química $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$. A gordura de galinha é, entre todas as fontes animal, a que possui em sua composição a mais alta quantidade de ácido linoléico, utilizado na biossíntese de ácido araquidônico e, conseqüentemente, algumas prostaglandinas presentes nos processos inflamatórios (IFA, 2011).

Assim, a utilização do tecido gorduroso de galinhas caipiras, em que, diferentemente da galinha de corte e frangos industriais, cujo principal objetivo é a obtenção de alta produtividade, não se tem interesse de acelerar o crescimento por meio de promotores como antibióticos e hormônios, e nem aumentar a

digestibilidade e a eficiência digestiva por meio de enzimas e aminoácidos sintéticos, sendo a grande maioria dos produtos que compõem a dieta desses animais naturais de origem vegetal (BRASIL, 2007).

Dessa forma, a crescente incidência de resistência microbiana aos antibióticos, germicidas e desinfetantes, efeitos adversos associados às drogas convencionais e também a existência de drogas com janelas terapêuticas muito estreitas obrigam aos pesquisadores buscarem cada vez mais produtos naturais que apresentem eficiência no tratamento destas infecções, bem como apresentem baixa toxicidade para os pacientes. Sendo assim, o estudo de produtos naturais com atividade antimicrobiana apresenta uma alternativa viável para essas problemáticas. (RECIO & RIOS, 1989).

Portanto, objetivou-se avaliar a atividade antibacteriana presentes no tecido adiposo do *G. g. domesticus* contra bactérias de linhagens padrões e multirresistentes de origem clínica, bem como a atividade moduladora do produto combinado ao antibiótico da classe dos aminoglicosídeos.

Materiais e Métodos

Material bacteriano

As cepas bacterianas utilizadas foram isolados clínico de *E. coli* (EC27), *S. aureus* (SA358) e cepas padrão de *Escherichia coli* (ATCC25922) e *S. aureus* (ATCC12692) com o perfil de resistência descritos na Tabela 1. Todas as cepas foram mantidas em agar Müeller Hinton. Antes do ensaio, as células foram cultivadas durante a noite a 37 ° C no cérebro coração infusão de caldo (BHI, Difco Laboratories Ltda.)

Obtenção do material

Dois exemplares de *Gallus gallus domesticus* foram obtidas na cidade de Juazeiro do norte, Ceará, Brasil; um de criação doméstica (caipira) e o outro obtido de uma granja industrial. Sendo que as obtenções das banhas foram realizadas de forma caseira, como é usada na medicina popular, onde os tecidos adiposos foram retirados e levados ao fogo até serem liquefeitos.

Tabela 1. Origem das linhagens bacterianas e perfil de resistência a antibióticos

Bactéria	Origem	Perfil de Resistência
<i>Escherichia coli</i> 27	Ferida cirúrgica	Ast, Ax, Amp, Ami, Amox, Ca, Cfc, Cf, Caz, Cip, Clo, Im, Can, Szt, Tet, Tob
<i>Escherichia coli</i> ATCC10536	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 358	Ferida cirúrgica	Oxa, Gen, Tob, Ami, Can, Neo, Para, But, Sis, Net
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	-	-

Ast – Aztreonam; Ax – Amoxicilina; Amp – Ampicilina; Ami – Amicacina; Amox – Amoxicilina; Ca – Cefadroxil; Cfc – Cefaclor; cf – Cefalotina; Caz – Ceftazidima; Cip – Ciprofloxacina; Clo – Cloranfenicol; Im – Imipenem; Can – Canamicina; Szt – Sulfametrim; Tet – Tetraciclina; Tob – Tobramicina; Oxa – Oxacilina; Gen – Gentamicina; Neo – Neomicina; Para – Paramomicina; But – Butirosina; Sis – Sisomicina; Net – Netilmicina; (-) Ausência de resistência ou resistência sem relevância.

Teste de atividade antibacteriana

A CIM (concentração inibitória mínima) foi determinada em ensaio de microdiluição em caldo (NCCLS 2003) utilizando-se um inóculo de 100 µL de cada linhagem, suspensas em caldo BHI que apresentava uma concentração de 10⁵ UFC/mL em placas de microtitulação com 96 poços, com diluições em série 1/2. Em cada poço foi adicionado 100µL de solução de cada amostra. As concentrações finais das banhas variaram entre 512 – 8 µg/mL. Para os controles foram utilizados os antibióticos padrões amicacina, gentamicina e neomicina cujas concentrações finais variaram entre 512 µg/mL – 8,0 µg/mL. As CIMs foram registradas como as menores concentrações para a inibição do crescimento. O ensaio antibacteriano foi realizado em triplicata e os resultados foram expressos como média das repetições.

Avaliação da interferência das amostras sobre a resistência aos aminoglicosídeos.

Para avaliar as amostras como moduladores da ação antibiótica, a CIM de antibióticos da classe dos aminoglicosídeos foram avaliados na presença e na ausência das banhas em microplacas estéreis. Os antibióticos foram avaliados nas concentrações variando de 2500 a 2,44µg/mL. Todos os antibióticos testados foram obtidos junto a sigma.

Execução e leitura dos ensaios

As amostras foram misturadas em caldo BHI 10% em concentrações subinibitórias, obtidos e determinados após a realização de teste de avaliação da CIM, sendo que para o teste de modulação a concentração da solução das amostras foi reduzida 8(oito) vezes(CIM/8). A preparação das soluções de antibióticos foi realizada com a adição de água destilada

estéril em concentração dobrada (5000µg/mL) em relação à concentração inicial definida e volumes de 100µL diluídos seriadamente 1:1 em caldo BHI 10%. Em cada cavidade com 100µL do meio de cultura continha a suspensão bacteriana diluída (1:10). Os mesmos controles utilizados na avaliação da CIM para os extratos foram utilizados durante a modulação (COUTINHO *et al.*, 2008). As placas preenchidas foram incubadas a 35°C por 24 horas e após esse período a leitura foi evidenciada pelo uso da Resazurina.

Resultados e Discussão

Para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) um ensaio piloto utilizando apenas o DMSO foi realizado, mas nenhuma atividade antibacteriana ou moduladora foi verificada, indicando não apresentar toxicidade. Após a Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do tecido adiposo da galinha caipira (TAGc) e do tecido adiposo da galinha de industrial (TAGi) testados contra *E. coli* e *S. aureus* referência e multirresistentes, foi demonstrado que as amostras TAGc e TAGi apresentaram comparativamente a mesma CIM de ≥1024µg/mL.

Os presentes resultados demonstram uma atividade antibacteriana irrelevante clinicamente. Corroborando com trabalhos similares realizados com tecidos adiposos de répteis; Ferreira *et al.* (2009) demonstra a falta de atividade antimicrobiana in vitro de gordura corporal de *Tupinambis merianae*, usado na medicina popular contra infecções bacterianas causadas por *Escherichia coli* e *S. aureus*. Santos *et al.* (2011) também apresentou resultados muito semelhantes com atividade antimicrobiana de produtos naturais da pele dos lagartos *Tropidurus semitaeniatus* e *Tropidurus hispidus*, que vivem

no semi-árido nordestino. O mesmo com os estudos de Ferreira et al. (2011) usando a gordura corporal da serpente *Boa constrictor*.

Modificadores da atividade antibiótica é a denominação dos produtos de origem vegetal ou animal que possam alterar o efeito de antibióticos, seja aumentando ou reduzindo suas atividades (COUTINHO et al. , 2008; RODRIGUES et al. , 2009). Foram em seguida realizados os testes de modulação da atividade antibiótica frente às cepas gram positivas multiresistente de *S. aureus*.

A Tabela 2 mostra a interferência das amostras sobre a atividade de aminoglicosídeos, demonstrando uma interferência na atividade dos antibióticos, com redução das CIMs frente

às linhagens Gram positivas de *S. aureus*, o que corrobora com o uso tradicional já que são frequentemente mais utilizadas para infecções do aparelho respiratório superior, que geralmente são colonizadas por bactérias gram positivas como o *S. aureus*.

O efeito mais representativo foi na associação do TAGc em concentração de 128 µg/mL (CIM 1/8) com os antibióticos no meio de cultura, observando um reforço na atividade da amicacina associada ao TAGc frente à SA 358 com redução da CIM de 625 para 39,06 µg/mL. No entanto algumas associações dos produtos naturais com os antibióticos e com linhagens Gram positivas, não foram observadas interferência da atividade antibiótica.

Tabela 2. Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos aminoglicosídeos na presença e na ausência das TAGc e TAGi, em uma concentração CIM/8 (128 µg/mL)

<i>Staphylococcus aureus</i> - SA358	TAGc	TAGi	Controle
Amicacina(µg/mL)	39,06	78,15	625
Neomicina(µg/mL)	78,12	78,12	78,12
Gentamicina(µg/mL)	19,53	2,44	19,53

TAGc- Tecido adiposo da galinha caipira; TAGi- Tecido adiposo da galinha industrial. SA – *Staphylococcus aureus*

O TAGc (Tecido adiposo da galinha caipira) apresentou melhores resultados se comparado ao TAGi (Tecido adiposo da galinha industrial) contra os antibióticos específicos, fato este que pode ser justificado pela alimentação que é diferente nas duas raças. Produtos oriundos da alimentação de ambas poderiam ter influenciado nos presentes resultados (BRASIL, 2007; MEDEIROS et al. , 2009).

A atividade sinérgica observada pode ser devido a constituição de metabolitos secundários ainda não elucidados, como vários componentes de muitos extratos e produtos que podem atuar como permeabilizantes de células, sendo capazes de alterar a parede celular ou destruir a membrana plasmática facilitando absorção das drogas (TSUCHIYA et al. , 1996; MATIAS et al. ,2010; FIGUEREDO et al., 2013).

Devido à absorção para o espaço intracelular, a toxicidade celular é comum para todos os aminoglicosídeos com exceção da estreptomina. Nefrotoxicidade, ototoxicidade e bloqueio neuromuscular são os mais importantes efeitos tóxicos dos aminoglicosídeos (VALLEJO et al. , 2001; OLIVEIRA, 2006).

A combinação das amostras com os

aminoglicosídeos pode ser uma alternativa para minimizar os efeitos indesejáveis desses antibióticos, quando utilizadas para o tratamento de bactérias Gram positivas uma vez que associação acarreta em um efeito sinérgico reduzindo significativamente a CIM destas drogas , diminuindo então a dose necessária para que haja sucesso terapêutico.

Esta diminuição substancial na concentração de aminoglicosídeos seria um melhoramento promissor no tratamento das infecções (FIGUEREDO et al., 2013).

Trabalhos como os de Zheng et al. (2005) afirmam que os ácidos graxos podem mostrar atividade antibacteriana, principalmente os insaturados, por afetar a síntese endógena dos ácidos graxos bacterianos. No entanto Das (2008) também observou que os ácidos graxos podem agir diretamente no processo inflamatório como parte da resposta imunitária provocada por antígenos; a fosfolipase A2 (PLA2) na membrana plasmática produz ácido araquidônico (AA), que é oxidado para formar prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos que são responsáveis por os sintomas visíveis de inflamações.

Os resultados de um estudo feito por

Ferreira et al. (2010) sobre atividade anti-inflamatória tópica da gordura corporal dos lagartos *Tupinambis merianae*, mostrou significativa atividade anti-inflamatória tópica, justificando seu uso como um agente anti-inflamatório na medicina tradicional. Seus componentes possivelmente possuem uma atividade anti-inflamatória semelhantes aos das drogas que diminuem metabólitos do ácido araquidônico, atuando na produção de mediadores eicosanóides ou inibição da COX e / ou enzimas LOX.

Henry et al. (2002) observou que o ácido oléico a 100 ppm possui uma atividade inibitória de cerca de 25% contra COX-1. O ácido linoleico (n-6 poli-insaturado) possui efeitos tanto pró-inflamatórios como anti-inflamatórios. Seu efeito pró-inflamatório pode ser atribuído ao fato de que é um precursor de AA. No entanto, o seu efeito anti-inflamatório pode ser justificado pelo fato de que o ácido linoleico é um precursor do ácido 13-hidroxi-octadecadienóico (13-HODE) por meio de 15-LOX, uma substância que inibe a produção de superóxidos, reduzindo a migração de leucócitos polimorfonucleares através do endotélio, que é ativado por citocinas, promovendo a vasodilatação arterial da aorta, modulando as ações de leucotrienos e prostanoídes (FRITSCH, 2008). O ácido linoleico também pode atuar como um inibidor in vitro de COX-1 e COX-2 (RINGBOM et al., 2001; HENRY et al., 2002).

Conclusão

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que o TAGc e o TAGi são uma fonte alternativa de produtos naturais com ação antibacteriana, já que possibilitam à potencialização da atividade dos aminoglicosídeos frente às linhagens de *S. aureus* 358. Ambos merecendo continuidade para elucidação da constituição química e toxicológica, além de surgir através deste estudo a necessidade de compreender como estas substâncias agem de modo a modular a atividade desta classe de antibióticos.

Referências

Brasil. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) Meio-Norte.

Sistemas de Produção. 2007. <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Ave/SistemaAlternativoCriacaoGalinhaCaipira/Alimentacao.htm> <Acesso em: 17 set. 2012>.

Coutinho, H.D.M., Costa, J.G.M., Siqueira-JR, J.P., Lima, E.O. 2008. *In vitro* anti-staphylococcal activity of *Hyptis martiusii* Benth against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-MRSA strains. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 18:670-675.

Das, U.N. Essential fatty acids and their metabolites could function as endogenous HMG-CoA reductase and ACE enzyme inhibitors, anti-arrhythmic, anti-hypertensive, anti-atherosclerotic, anti-inflammatory, cytoprotective, and cardioprotective molecules. 2008. *Lipids in Health and Disease* 7: 30-37.

Ferreira, F.S, Saraiva, B, R.A., Araruna, M.K.A., Menezes I.R.A., Costa, J.G.M., Coutinho, H.D.M., Almeida, W.O, Alves, R.R.N. 2010. Topical anti-inflammatory activity of body fat from the lizard *Tupinambis merianae*. *Journal of Ethnopharmacology* 130: 514-520.

Ferreira, F.S., Brito, S.V, Silva, N.L.G., Matias, E.F.F., Brito, S.L.V., Oliveira, F.G., Costa, J. G.M., Coutinho, H.D.M., Almeida, W.O., Alves, R.R.N. 2009. Is the body fat of the lizard *Tupinambis merianae* effective against bacterial infections?. *Journal of Ethnopharmacology* 126:233-237.

Ferreira, F.S., Brito, S.V., costa, J.G.M., Coutinho, H.D.M., Almeida, W.O., Alves, R.R.N. Potentiation of aminoglycoside antibiotic activity using the body fat from the snake *Boa constrictor*. 2011. *Revista Brasileira de Farmacognosia /Brazilian Journal of Pharmacognosy* 21:503-509.

Figueredo, F.G., Ferreira, E.O., Lucena, B.F.F., Torres, C.M.G., Lucetti, D.L., Lucetti, E.C.P., Silva, J.M. FL., Santos, F.A.V., Medeiros, C.R., Oliveira, G.M.M., Colares, A.V., Costa, J.G.M., Coutinho, H.D.M., Menezes, I.R.A., Silva.J.C.F., Kerntopf, M.R., Figueiredo, P.R.L., Matias, E.F.F. 2013. Modulation of the Antibiotic Activity by Extracts from *Amburana cearensis* A. C. Smith and *Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan. *BioMed Research Internationa* 1: 1-5.

Fritsche, K.L., 2008. Too much linoleic acid promotes inflammation – doesn't it? *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 79:173-175.

IFA, Gestis, Substance Database. 2011. Linolic Acid. Alemanha [http://gestis-en.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis_en/1/014230.xml?f=templates\\$fn=default.htm\\$3.0](http://gestis-en.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis_en/1/014230.xml?f=templates$fn=default.htm$3.0) < Acesso em 11 de Ago de 2011>.

Coutinho, H.D. M.;Costa J.G.M., Lima E.O.,

- Falcão, V.S., Siqueira, J.P. 2008. "Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine," *Chemotherapy* 54: 328–330.
- Henry, G.E., Momin, R.A., Nair, M.G., Dewitt, D.L. 2002. Antioxidant and cyclooxygenase activities of fatty acids found in food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 2231–2234.
- Lee K.T., Foglia T.A. Synthesis, purification, and characterization of structured lipids produced from chicken fat. 2000. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 77:1027-1034.
- Matias, E.F.F., Santos, K.K.A., Almeida, T.S., Costa, J.G.M. Coutinho, H.D.M. Enhancement of Antibiotic Activity by *Cordia verbenacea* DC. 2010. *Latin American Journal of Pharmacy* 29:1049-1052.
- Medeiros, Patrícia Tomazini, Padilha, Marília Terezinha Sangoi, Padilha, José Carlos Fiac, Espíndola, Filipe, Maggioni, Rogério. 2009. Efeito de promotores de crescimento alternativos no desempenho e no custo de produção de frangos de corte. *Biotemas* 22 : 157-163.
- Oliveira, J.F.P., Cipullo, J.P., Burdmann, E.A. 2006. Nefrotoxicidade dos aminoglicosídeos. *Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery* 21: 444-452.
- Recio, M.C., Rios, J.L. 1989. A review of some antimicrobial compounds isolated from medicinal plants reported in the literature 1978-1988. *Phytotherapy Research* 3 : 117-125.
- Rodrigues, F.F.G., Costa, J.G.M., Coutinho, H.D.M. 2009. Synergy effects of the antibiotics gentamicin and the essential oil of *Croton zehneri*. *Phytomedicine* 16: 1052-1055.
- Ringbom, T., HUSS, U., Stenholm, Å. 2001. COX-2 inhibitory effects of naturally occurring and modified fatty acids. *Journal of Natural Products* 64: 745–749.
- Santos, I.J.M., Matias, E.F.F., Santos, K.K.A., Braga, M.F.B.M., Andrade, J.C., Souza, T.M., Santos, F.A.V., Sousa, A., Costa, , Menezes, , Alves, R.R.N., Almeida, W.O, Coutinho, H.D.M. 2012. Evaluation of the Antimicrobial Activity of the Decoction of *Tropidurus hispidus* (Spix, 1825) and *Tropidurus semitaeniatus* (Spix, 1825) Used by the Traditional Medicine. Hindawi Publishing Corporation *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2012:1- 6.
- Siqueira, K.M.S., Barbosa, M.A., Brasil, V.V., Oliveira, L.M.C., Andraus, L.M.S. 2006. Crenças populares referentes à saúde: apropriação de saberes sócio-culturais. *Texto Contexto Enferm* 15: 68-73.
- Tsuchiya, H., Sato, M., Miyazaki, T., Fujiwara, S., Tanigaki, S., Ohyama, M., Tanaka, T., Jinuma, M. 1996. Comparative study on the antibacterial Activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Ethnopharmacology* 50: 27–34.
- Vallejo, J.C., Silva, M.N., Oliveira, J.A.A., Carneiro, J.J., Rocha, L.S.O., Figueiredo, J.F.C., Chiosi, M.F.V. 2001. Detecção precoce de ototoxicidade usando emissões otoacústicas produtivas de distorção. *Revista Brasileira Otorrinolaringologia* 67: 845-851.
- Zheng, C.J., Yoo, J.S, Lee, T.G., Cho, H.Y., Kim, Y.H., Kim, W.G. 2005. Fatty acid synthesis is a target for antibacterial activity of unsaturated fatty acids. *FEBS Letters* 579:5157-5162.